

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Optimización de la producción de celulasa a partir de *Fusarium sp.*

Optimization of cellulase production by *Fusarium sp.*

Nataly Bonilla Ospina

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Minas, Departamento de Procesos y
Energía Grupo de Investigación Bioprocesos y
Flujos Reactivos Medellín, Colombia

2020

Optimización de la producción de celulasa a partir de *Fusarium sp.*

Optimization of cellulase production by *Fusarium sp.*

Nataly Bonilla Ospina

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ingeniería Química

Directora:

Ph. D., Ángela Adriana Ruíz-Colorado

Línea de Investigación
Bioprocesos Grupo de
Investigación: Bioprocesos y
Flujos Reactivos

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Minas, Departamento Procesos y
Energía Medellín, Colombia

2020

A mi Familia

Agradecimientos

Gracias a mis padres por ser los principales promotores de mis sueños, gracias a ellos por cada día confiar y creer en mí y en mis expectativas, gracias por cada consejo y por cada una de sus palabras que me guiaron durante este proceso. A mis hermanos Andrea y Danilo Jr. Y a mi sobrina Sophy por ser parte de mi vida, representar unidad familiar y por llenar mi vida de alegría y amor cuando lo necesitaba.

A la profesora Adriana, le agradezco la confianza, apoyo, dedicación y por haber compartido conmigo sus conocimientos. Al grupo de investigación Bioprocesos y Flujos reactivos de la Universidad Nacional de Colombia por sus aportes, ideas y apoyo.

A mis amigas y amigos por el apoyo emocional y porque estuvieron conmigo siempre dándome la fuerza para continuar.

Resumen

El uso de enzimas en diferentes sectores industriales es una alternativa a los procesos químicos convencionales. Las enzimas son atractivas, debido a ventajas técnico-económicas en el proceso, como bajas temperaturas (30°C - 50°C), pH (4,0 - 5,5) y concentraciones de solventes orgánicos, entre otros. Las enzimas, ofrecen alta especificidad al sustrato, condiciones de proceso moderadas a suaves comparadas con procesos industriales convencionales, baja toxicidad y pureza del producto. En consecuencia, reducción de impactos ambientales negativos. Las celulasas, son el segundo tipo de enzimas predominantes en la industria biotecnológica ya que tiene numerosas aplicaciones en diferentes campos, incluyendo la industria textil, pulpa y papel, alimentos, producción de biocombustibles, farmacéutica, entre otras. Su biosíntesis es controlada por mecanismos como la inducción y la regulación nutricional (regulación de las fuentes de carbono o nitrógeno), principalmente.

Diferentes microorganismos son capaces de producir el complejo enzimático celulasas, sin embargo, hongos como *Fusarium sp.* son ampliamente estudiados, por su buen rendimiento en la producción de enzimas y su habilidad de secretar el complejo extracelularmente.

En este estudio, Carboximetilcelulosa fue usada como única fuente de carbono para la producción de enzimas celulolíticas (celulasas y endoglucanasas), por *Fusarium sp.* bajo fermentación en estado sólido (FES). Los efectos de la humedad (65% - 80%), la temperatura (28-35°C), el pH (4,5 - 6,0 Unidades) y el tiempo de fermentación (2-6 días) sobre la producción enzimática, fueron determinados siguiendo la metodología de superficie de respuesta. La condición ideal para la producción por *Fusarium sp.*, tanto de celulasas como endoglucanasas fueron 10 días de fermentación, 71,74% de humedad, pH 5,02 y temperatura 28,8 °C.

La síntesis de celulasa fue reprimida en presencia de xilosa y fructosa, mientras que, fue inducida en presencia de lactosa y sacarosa. Finalmente, se caracterizó el extracto enzimático a diferentes temperaturas y pH, lo que permitió determinar que la actividad relativa para endoglucanasa se presenta a 50°C y pH 5,0, mientras que para actividad celulasa, se presenta a 60°C y pH 6,0.

Palabras clave: (*Fusarium sp.*, Enzimas, Celulasas, Endoglucanasa, Metodología superficie de respuesta).

Abstract

The use of enzymes in different industrial sectors is a conventional alternative to chemical processes, it is attractive due to technical and economic advantages in the process, such as low temperatures (30°C - 50°C), pH (4,0 -5,5) and concentrations of organic solvents, among others. Enzymes provide high substrate specificity, moderate to mild process conditions, low toxicity and product purity, thus reducing negative environmental impacts. Cellulases, the second type of enzymes predominant in the industry, are mainly controlled by mechanisms such as induction and nutritional regulation (regulation of carbon or nitrogen sources). Different microorganisms can produce complex cellulase enzymes; however, fungi like *Fusarium* sp. are widely studied for their good yield in the production of enzymes and their ability to secrete the complex extracellularly.

Carboxymethylcellulose was used as the sole source of carbon to produce cellulolytic enzymes, by *Fusarium* sp. under solid state fermentation (FES, by its acronym in Spanish). The effects of moisture (65-80%), temperature (28-35°C), pH (4.5 - 6.0 Units) and fermentation time (2-6 days) on enzymatic production were determined following the surface response methodology. The ideal condition for endoglucanase production was 4 days of fermentation 70% humidity, pH 4.5 and temperature 30 ° C, these factors being of significant influence on *Fusarium* sp.

The cellulase synthesis was repressed in the presence of xylose and fructose, while it was induced in the presence of lactose and sophorose. Finally, the enzyme extract was characterized at different temperatures and pH, which determined the highest relative activity for endoglucanase is presented at 50 °C and pH 5.0, while for cellulase activity, it is presented at 60 °C and pH 6.0.

Keywords: (*Fusarium* sp., Enzymes, Cellulase, Endoglucanases, Response Surface Methodology)

Contenido

Resumen	5
Abstract	6
1. Introducción	10
2. Marco teórico	12
2.1. <i>Fusarium sp.</i>	12
2.2. Biomasa lignocelulósica	14
2.2.1. Celulosa	15
2.2.2. Hemicelulosa	16
2.2.3. Lignina	16
2.3. Celulasas	17
2.3.1. Mecanismo catalítico de las celulasas	19
2.4. Producción de celulasas	21
2.4.1. Fermentación en estado sólido (FES)	25
2.4.2. Factores ambientales que afectan la producción de celulasas.	25
• Actividad de agua / Humedad	27
• pH	27
• Temperatura	27
• Tiempo de fermentación	27
• Fuente de carbono e inductores	28
• Fuente de nitrógeno	31
3. Materiales y métodos	34
3.1. Reactivación del microorganismo	34
3.2. Optimización de la producción de celulasa y endoglucanasa mediante fermentación en estado sólido.	34
3.2.1. Inóculo	34
3.2.2. Selección de la fuente de carbono para la producción enzimática.	35
3.2.3. Influencia de factores ambientales en la producción de celulasas y endoglucanasas.	36
3.2.4. Influencia de los inductores en la producción de Endoglucanasa.	36
3.2.5. Caracterización fisicoquímica del extracto enzimático.	37
3.3. Métodos de análisis	37
3.3.1. Extracto enzimático	37
3.3.2. Actividad enzimática celulasas	37

3.3.3. Actividad enzimática Endoglucanasa.	39
4. Resultados y discusión.	39
3.1. Optimización de factores físicos a través de la metodología de superficie de respuesta (MSR)	41
Interacción entre las variables	45
Efecto de la Temperatura y Tiempo de fermentación en la actividad enzimática	47
3.3. Efecto de los inductores en la producción de celulasas y endoglucanasas.	51
3.4. Caracterización fisicoquímica del extracto enzimático.	53
5. Conclusiones	55
6. Recomendaciones	56
7. Referencias	57

Lista de Gráficas

Figura 2-1 Composición de la biomasa lignocelulósica.....	15
Figura 2-2 Endoglucanasa; Fuente: (Juturu & Wu, 2014).	18
Figura 2-3 Exoglucanasa; Fuente: (Juturu & Wu, 2014).	19
Figura 2-4 Betaglucosidasa; Fuente: (Juturu & Wu, 2014).	19
Figura 2-5 Mecanismo por inversión; Fuente: (Davis et al., 1995)	20
Figura 2-6 Mecanismo por retención.; Fuente: (Davis et al., 1995)	20
Figura 2-7 Modelo de inducción de celulasas en <i>T. reesei</i> , los números corresponden a la descripción del texto Donde: BGL: β -glucosidasa; CBH: 1,4- β -D-glucano celobiohidrolasa; EGL: endo-1,4- β -D-glucanasa.	24

Lista de Gráficas

Gráfica 4-1 Efecto de la fuente de carbono en la producción de celulasas y endoglucanasas	40
Gráfica 4-2 Efecto de la concentración de CMC en la producción de celulasa y endoglucanasa	41
Gráfica 4-3 Efecto de la interacción entre temperatura y humedad en (A) Celulasa y (B) endoglucanasa.....	45
Gráfica 4-4 Efecto de la interacción entre pH y temperatura en (A) Celulasa y (B) endoglucanasa.	46
Gráfica 4-5 Efecto de la interacción tiempo y temperatura en (A) Celulasa y (B) endoglucanasa	47
Gráfica 4-6 Efecto de la interacción humedad y pH en (A) Celulasa y (B) endoglucanasa.	48
Gráfica 4-7 Efecto de la interacción pH, tiempo de fermentación en (A) Celulasa y (B) endoglucanasa.	48
Gráfica 4-8 Efecto de la interacción tiempo de fermentación, humedad en (A) Celulasa y (B) endoglucanasa	50
Gráfica 4-9 Validación de los puntos óptimos para la producción de celulasa y endoglucanasa.....	50
Gráfica 4-10 Efecto de inductores en la producción de celulasa (FPU/g).....	52
Gráfica 4-11 Efecto de inductores en la producción de endoglucanasa (CMC/g).	53
Gráfica 4-12 Efecto de la temperatura en la actividad enzimática (A) Celulasa y (B) endoglucanasa.	54
Gráfica 4-13 Efecto del pH en la actividad enzimática (A) Celulasa y (B) endoglucanasa.	54

Lista de Tablas

Tabla 2-1 celulasas y sus aplicaciones industriales.....	12
Tabla 2-2 Clasificación de material lignocelulósico de acuerdo con su contenido de lignina, celulosa y hemicelulosa.	15
Tabla 2-3 Celulasas comerciales, productores y sus fuentes.....	17
Tabla 2-4 Ventajas y desventajas de FES y FS.....	21
Tabla 2-5 Clasificación taxonómica para <i>Fusarium</i> sp. y <i>Trichoderma reesei</i>	23
Tabla 2-6 Fuente de carbono usadas para la producción de celulasas de <i>Fusarium</i> sp.	29
Tabla 2-7 Inductores estudiados en la producción de celulasa por <i>Fusarium</i> sp.	31
Tabla 2-8 Fuentes de nitrógeno usadas para la producción de celulasas de <i>Fusarium</i> sp.	32
Tabla 3-1 Composición del medio de fermentación (Mandels & Weber, 1969).	35
Tabla 3-2 Factores ambientales y rangos por evaluar	36
Tabla 4-1 Resultados diseño de experimentos.....	42
Tabla 4-2 Coeficientes de regresión estimados para actividad celulasa	43
Tabla 4-3 Coeficientes de regresión estimados para CMC	44

1. Introducción

Las celulasas son un sistema enzimático, que consiste principalmente en tres componentes, Endoglucanasas (EC 3.2.1.4) que hidrolizan al azar los enlaces β -1,4-glucosídicos internos de la celulosa amorfa, (2) Exoglucanasas, que incluyen las Celobiohidrolasas (CBHs) (EC3.2.1.91), estas actúan de una manera progresiva en los extremos reductores y no reductores de las cadenas del polisacárido, liberando glucosa (glucanohidrolasas) o celobiosa (celobiohidrolasas) y (3) β -glucosidasas (BG) (EC 3.2.1.21) que hidrolizan las celobiosas a monómeros de glucosa, producto final (Davis et al., 1995; Rajeev K Sukumaran, Singhanian and Pandey, 2005; Zhang, Zhang and User, 2013; Singhanian et al., 2017).

Las celulasas microbianas han demostrado su gran potencial en diferentes industrias debido a su versatilidad catalítica. Estas son usadas en un gran número de campos incluyendo biocombustibles, textiles, alimentos, pulpa y papel, agricultura, entre otras (Rajeev K. Sukumaran, Singhanian and Pandey, 2005; Singhanian et al., 2010; Zhang, Zhang and User, 2013; Juturu and Wu, 2014).

La biodegradación de la celulosa y los complejos celulolíticos, producidos por numerosos microorganismos, representan el mayor flujo de carbono, desde los sumideros de carbono fijados al CO₂ atmosférico (Percival Zhang, Himmel and Mielenz, 2006). Es así, como el desarrollo de tecnologías para convertir eficazmente los residuos agrícolas y forestales, en azúcares fermentables, así como productos de la plataforma química como surfactantes, polímeros, solventes, fibras, etc., ofrecen beneficios potenciales a través de: (1) seguridad estratégica mejorada, (2) disminución de los déficits comerciales, (3) economías rurales más sanas, (4) mejor calidad ambiental, (5) tecnología exportaciones, y (6) un suministro de recursos de energía sostenible. La conversión efectiva de lignocelulosa recalcitrante a los azúcares fermentables requiere tres pasos secuenciales: (1) reducción de tamaño, (2) pretratamiento / fraccionamiento, y (3) hidrólisis enzimática (Piñeros, 2012). Uno de los más importantes desafíos tecnológicos y difíciles, es superar el alto costo de producción de las celulasas, una reducción significativa en el costo será importante para su uso comercial en biorrefinerías (Percival Zhang, Himmel and Mielenz, 2006; Guoweia et al., 2011; Ramanjaneyulu and Rajasekhar Reddy, 2016; Hu, Du, Pensupa, Sze, et al., 2018). El gran potencial de mercado y el importante papel que desempeñan las celulasas en las industrias emergentes de bioenergía y productos biológicos, proporcionan motivación para

desarrollar mejores complejos enzimáticos de celulasa para la hidrólisis de celulosa en la pared celular de las plantas. Estos avances también deberán incluir características necesarias para biorrefinerías, como una mayor eficacia catalítica sobre sustratos celulósicos insolubles, una mayor estabilidad a temperatura elevada y a ciertos niveles extremos ácidos o básicos de pH, así como, una mayor tolerancia a la inhibición del producto final.

Hoy en día, se ha dedicado importante atención al conocimiento de la producción de celulasa y los desafíos en la investigación en celulasa, especialmente en la dirección de mejorar la economía de procesos de diversas industrias (Kuhad et al., 2015). En términos de tecnología de producción, las enzimas de bajo costo se pueden producir por la optimización del proceso y la ingeniería genética de cepas microbianas productoras de celulasa. En este estudio, se evaluó el efecto de carboximetilcelulosa, celulosa, glucosa, maltosa, etc. como única fuente de carbono para la producción de enzimas celulolíticas (exoglucanasas, betaglucosidasas y endoglucanasas) por *Fusarium sp* bajo fermentación en estado sólido. Usando la metodología de superficie de respuesta, se evaluaron los efectos de la humedad (65% -80%), temperatura (28-35 °C), pH (4.5-6.0) y tiempo de fermentación (2-6 días) sobre la producción de enzimas. Se evaluó el efecto de inducción o represión de Lactosa, xilosa, soforosa, fructosa en la síntesis de celulasa y endoglucanasa. Finalmente, se caracterizó el extracto enzimático a diferentes temperaturas y niveles de pH, lo que permitió determinar.

2. Marco teórico

2.1. *Fusarium sp.*

Los hongos filamentosos, o simplemente el moho, son organismos de importancia médica, ecológica e industrial. En la naturaleza, los hongos filamentosos son ubicuos y pueden aislarse de una amplia gama de condiciones en términos de temperatura, pH, actividad del agua, etc., (Adnan *et al.*, 2017). Muchos hongos filamentosos como el *Fusarium sp.*, son endófitos, lo que implica que habitan en las plantas sin causar síntomas aparentes de enfermedad. De acuerdo con diferentes estudios fue posible demostrar la capacidad de producción de compuestos activos de este tipo de hongos que le confieren protección a su hospedera contra el ataque de patógenos y herbívoros, constituyendo una vía para la obtención de diversos precursores o moléculas novedosas de utilidad en la agricultura y en la medicina (Covarelli *et al.*, 2012; Bhat, 2000; Juturu & Wu, 2014; Sukumaran, Singhania, & Pandey, 2005).

Fusarium sp., se encuentra clasificado como hongo filamentosos de la clase *Ascomycetos* y ha sido previamente reportado con actividad enzimática celulasas, hemicelulasas, así como, enzimas auxiliares de la degradación de biomasa lignocelulósica como xilanasas, responsables de la degradación del xilano que es el mayor constituyente de la hemicelulosa (Gao *et al.*, 2011). Los metabolitos primarios como las Hemi (celulasas) aislados de hongos endófitos poseen una gran diversidad química y algunos de estos pueden ser ampliamente usados en industrias de biocombustibles, alimentos, farmacéutica y textil. En la Tabla 2-1 se listan algunas aplicaciones que tienen las hemi (celulasas) fúngicas.

Tabla 2-1 celulasas y sus aplicaciones industriales

Industria	Función	Aplicación	Referencia
Alimentos	Hidrólisis de componentes de la pared celular; Disminuyendo la viscosidad y manteniendo la textura del zumo de fruta	Extracción de jugo de frutas, colorantes alimentarios, Alteración de las propiedades sensoriales de frutas y verduras y aceite de aceitunas y sopas, Control de enfermedades coronarias y aterosclerosis; Reducción del deterioro de los alimentos.	(Bhat, 2000; Yang <i>et al.</i> , 2017)

Industria	Función	Aplicación	Referencia
Alimentación animal	Pretratamiento de ensilaje agrícola y alimentación de grano para la hidrólisis parcial de materiales lignocelulósicos	Mejora en la calidad nutricional de los alimentos para animales; Aumento de peso por pollos de engorde y gallinas; Disminución de la colonización de bacterias patógenas en el intestino grueso	(Merillon and Ramawat, 2017)
Vinos y cervezas	Hidrólisis de polisacáridos de pared celular de plantas, Modificación de residuos aromáticos.	Mejora en la maceración de la piel y la extracción de color de la uva, calidad, estabilidad y clarificación y aroma de los vinos.	(Bayer <i>et al.</i> , 1998; Wilson, 2011; Juturu and Wu, 2014)
Textiles y lavandería	Actúan sobre el tejido de algodón y rompen los extremos de las pequeñas fibras en el tejido de algodón, aflojando así el tinte después del lavado, prevención o eliminación permanente de la formación de pelusa y pilling, Bio-pulido de algodón y telas (no Denim), desfibrilación de lyocell	Bio-apedreamiento de tejidos de mezclilla: biopolímero de telas no Denim, desfibrilación de tejidos que contienen Lyocell y biofinado, producción de polvos de lavado de alta calidad y amigables con el ambiente. Producción de tejidos de alta calidad	(Cavaco-Paulo, 1998)
Pulpa y papel	Elaboración mecánica de pasta, biomodificación de las fibras, eliminación del revestimiento de tinta y tóner del papel	Aumentar la resistencia a la tracción y las altas calidades de las fibras, reducir el consumo de energía, mejorar el drenaje de las fábricas de papel y la fabricación de papeles suaves como toallas de papel y papeles higiénicos	(Kuhad, Gupta & Singh, 2011)
Agricultura	Solubilización de las paredes celulares de las plantas o hongos, Inhibición de la germinación de las esporas, alargamiento del tubo germinal y crecimiento de hongos	Producción de protoplastos vegetales o fúngicos, cepas híbridas y mutantes, fertilidad del suelo, crecimiento de las plantas	(Liu and Kokare, 2017)
Biocombustibles	Conversión de material celulósico en glucosa y otros azúcares fermentables	Producción de proteína de una sola célula o productos de fermentación como etanol	(Davies and Henrissat, 1995; Liu

Industria	Función	Aplicación	Referencia
			and Kokare, 2017)
Farmacéutica	Digestión de fibras de celulosa	Preparación de la digestión, hidrólisis rápida de los polímeros de celulosa, hemicelulosa y betaglucano en los alimentos	(Liu and Kokare, 2017)
Gestión de residuos	Degradación de residuos celulósicos	Reducción de la contaminación ambiental	(Merillon and Ramawat, 2017)

2.2. Biomasa lignocelulósica

La Lignocelulosa natural es la fuente de materia orgánica renovable más abundante sobre la tierra. Existe una gran variedad de biomásas, que se encuentran desde los bosques hasta los océanos, además nueva biomasa se está generando constantemente a través de la fotosíntesis (Estela and Luis, 2013; Chen, 2014; Dusselier, Mascal and Sels, 2014). De acuerdo con estudios recientes hay aproximadamente 1.8×10^{11} toneladas de biomasa sobre la tierra y cerca de 4.0×10^7 de toneladas en los océanos. Para el mejor uso de los materiales celulósicos, es importante entender sus características, descritas a continuación (Chen, 2014).

- a. Son una fuente extensiva, ya que se encuentran en grandes cantidades y son renovables.
- b. Se encuentran en una configuración multiforme, con celulosa, hemicelulosa y lignina que tienen estructuras y composiciones diferentes.
- c. Son materiales de bajo costo y actualmente son considerados como residuos.

Por lo tanto, los materiales lignocelulósicos tienen potencial para solucionar problemas actuales, como escasez de alimentos, crisis energéticas, contaminación ambiental, entre otros, que enfrenta el mundo. Sin embargo, su complejidad dificulta los procesos de bioconversión de lignocelulosa, (Chen, 2014) pues estos materiales están formados principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina, la suma de estos componentes representa más del 80% de su peso total y están unidas entre sí mediante enlaces covalentes (Chen, 2014; Menon & Rao, 2012). El porcentaje restante se distribuye en proteínas, grasas, cenizas, agua, pectina, carbohidratos de bajo peso molecular, entre otros. El tamaño y forma de la pared celular, así como, la composición química de los materiales lignocelulósicos varía de acuerdo con cada

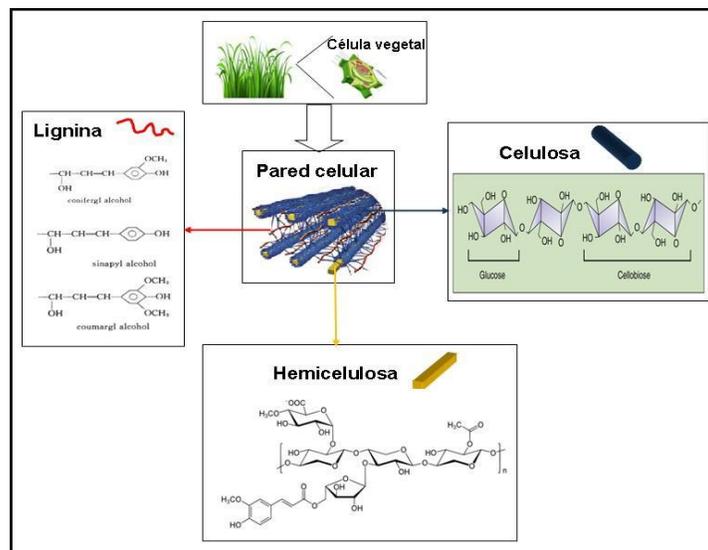
especie, estos pueden ser clasificados como se lista en la **Tabla 2-2** y en la **Figura 2-1** se muestra gráficamente.

Tabla 2-2 Clasificación de material lignocelulósico de acuerdo con su contenido de lignina, celulosa y hemicelulosa.

Material	Lignina (%)	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)
Maderas duras	18-25	45-55	24-40
Maderas blandas	25-35	45-50	25-35
Herbáceas	25-30	25-40	25-50

Fuente: (Menon and Rao, 2012)

Figura 2-1 Composición de la biomasa lignocelulósica.



Adaptada de (Isikgor and Becer, 2015)

2.2.1. Celulosa

La celulosa es uno de los compuestos más abundantes en la naturaleza, se encuentra en la pared celular de las plantas, es sintetizada por estas y por algunos organismos como animales marinos y bacterias del género *Bacillus*, *Acetobacter*, *Agrobacterium*, *Rizhobium*, entre otras. Es un polisacárido de fórmula es $(C_6H_{10}O_5)_n$. y en combinación con la hemicelulosa y la lignina constituye la fracción lignocelulósica la cual se genera en grandes

cantidades durante las actividades agrícolas y madereras. Adicionalmente, la celulosa está compuesto por D-Glucosa unidos por enlaces β -1,4-glicosídicos, que contiene regiones cristalinas y amorfas. La cristalina crea el segmento principal de la celulosa, mientras que una pequeña cantidad se encuentra organizada de forma amorfa (Ergun, Guo, & Huebner-Keese, 2015; Guleria, Kumari, & Saravanamurugan, 2019). La Celobiosa es la unidad estructural que se repite creada a través de este enlace y compone las cadenas de celulosa. Las largas cadenas de celulosa se estabilizan mediante enlaces fuertes de hidrógeno y Van der Waals para crear microfibrillas en las paredes celulares de las plantas (Chen, 2014; Toth, 2016).

2.2.2. Hemicelulosa

La hemicelulosa es el segundo polímero más abundante. Contrario a la celulosa, la hemicelulosa tiene una estructura aleatoria y amorfa, compuesta de varios heteropolímeros incluyendo xilano, galactomanano, glucuronoxilano, arabinoxilano, glucomanano y xiloglucano. Por otra parte, las hemicelulosas también varían en su composición; hemicelulosas de madera dura contienen principalmente xilanos, mientras que las de madera blanda contienen principalmente glucomananos. Los heteropolímeros de hemicelulosa se componen de monosacáridos de 5 y 6 Unidades de carbonos; pentosas (xilosa, arabinosa), hexosas (manosa, glucosa, galactosa) y azúcares acetilados. Finalmente, las hemicelulosas están incrustadas en las paredes celulares de la planta formando una compleja red de enlaces que proporcionan resistencia estructural al unir fibras de celulosa a microfibrillas y enlaces cruzados con lignina.

2.2.3. Lignina

Lignina es el nombre de un grupo de sustancias, su gran variabilidad se refleja en que su composición cambia de acuerdo con las especies de plantas, la duración del tiempo de crecimiento, así como, partes de las plantas. Este complejo es de naturaleza hidrofóbica y se une a través de enlaces covalentes a la hemicelulosa y celulosas lo que genera la estructura compleja de la lignocelulosa (Toth, 2016). La lignina es un complejo compuesto por unidades de fenilpropano unidas de forma no lineal y aleatoria; Los tres monómeros principales son alcohol cumáryl, alcohol coniferílico y alcohol sinapílico (Chen and Qiu, 2010).

2.3. Celulasas

Las celulasas son las segundas enzimas de mayor producción económica a nivel mundial y su demanda está constantemente en incremento debido a la variedad de aplicaciones como en el procesamiento de algodón, en el reciclaje de papel, enzimas de detergentes, en extracción de jugos, aditivos de alimentación para animales, en la industria farmacéutica, entre otras industrias (Shukla and Pletschke, 2013). Adicionalmente, desde 2005 con el resurgimiento de la producción de bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos vía enzimática se incrementó mundialmente la investigación en torno a la producción y mejoramiento de esta enzima (X.-Z. Zhang, Zhang, & User, 2013; Pandey, Negi, & Soccol, 2017; Rivero et al., 2017; Singhania, Adsul, Pandey, & Patel, 2017).

A nivel mundial, se encuentran dos grandes productores de celulasa para la conversión de biomasa “Genencor ahora DuPont, y Novozymes” (Pandey et al., 2017).

De acuerdo con la **Tabla 2-3**, las especies de hongos más usados para la producción de celulasas se encuentran *Trichoderma* y *Aspergillus*; sin embargo, diferentes investigaciones reportan *Fusarium sp.*, como una especie capaz de metabolizar celulosa como fuente de energía y secretar el complejo enzimático de celulasa (de Almeida, Falkoski, Guimarães, & de Rezende, 2019; Martínez-Pacheco, Flores-García, Zamudio-Jaramillo, Chávez-Parga, & Alvarez-Navarrete, 2020; Juturu & Wu, 2014; Juturu & Wu, 2014; Bhat, 2000; x).

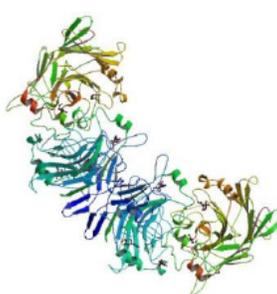
Tabla 2-3 Celulasas comerciales, productores y sus fuentes.

Enzima	Proveedor	Método	Actividad enzimática (FPA/ml)	Fuente
Cellubrix (celluclast)	Novozymes	FS	56	<i>T.Longibrachiatum</i>
Cellulase 2000L	Rhodia-Danisco	FS	10	<i>A.Niger</i>
Rohament CL	Rohm –AB Enzymes	FS	50	<i>T.longibrachiatum</i> / <i>T.reesei</i>
Viscotar 150L	Dyadic	FS	33	<i>T.longibrachiatum</i> / <i>T.reesei</i>
Multifect CL	Genencor international	FS	64	<i>T.longibrachiatum</i> / <i>T.reesei</i>
Cellulyve 50L	Novozymes	FS	24	<i>T.longibrachiatum</i> / <i>T.reesei</i>
Spezyme CP	Genencor	FS	49	<i>T.longibrachiatum</i> / <i>T.reesei</i>

GC220	Genencor	FS	116	<i>T.longibrachiatum</i> / <i>T.reesei</i>
Cellulase TRL	Amano Enzyme	FS	95	<i>A.niger</i>
Econase CE	Solvay Enzymes	FS	40	<i>T.longibrachiatum</i> / <i>T.reesei</i>
Biocellulase TRI	Amano Enzyme	FS	68	<i>T. Virade</i>
Ultra-Low Microbial (ULM)	Quest International	FS	88	<i>A.niger</i>

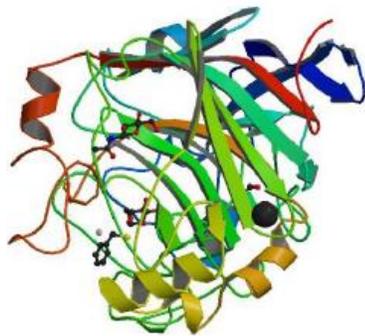
Tomada de: (Pandey et al., 2017; Rivero et al., 2017).

Las investigaciones sobre celulasas y relacionados con polisacáridos iniciaron en los años 50's debido al enorme potencial de convertir materiales lignocelulósicos a glucosa y azúcares solubles (Tamboli, Waghmare, Khandare, & Govindwar, 2017). Las celulasas son un sistema enzimático que consiste principalmente en tres componentes, Endoglucanasas (EC 3.2.1.4) que cortan al azar en el interior de la celulosa amorfa, generando oligosacáridos de varias longitudes y, en consecuencia, nuevos extremos de cadena, (2) Exoglucanasas, que incluyen las Celobiohidrolasas (CBHs) (EC3.2.1.91), estas actúan de una manera progresiva en los extremos reductores y no reductores de las cadenas del polisacárido, liberando glucosa (glucanohidrolasas) o celobiosa (celobiohidrolasas) y (3) β -glucosidasas (BG) (EC 3.2.1.21) que hidrolizan las celodextrinas solubles y la celobiosa a glucosa, el producto final, las figuras (**Figura 2-2**, **Figura 2-3**, **Figura 2-4**), muestran las estructuras de cada una de la enzimas que pertenecen al complejo enzimático (Zhang, Zhang and User, 2013; Rivero et al., 2017).



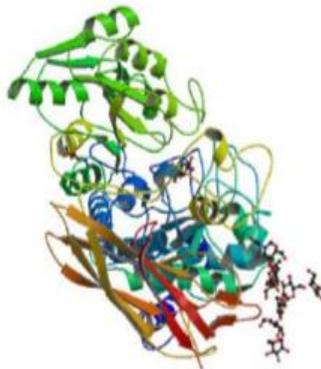
Endo- β -1,4-glucanase (EG) EC 3.2.1.4
Accepted name:
Cellulase
Alternative name(s):
Avicelase
Beta-1,4-endoglucan hydrolase
Beta-1,4-glucanase
Carboxymethyl cellulase
Celludextrinase
Endo-1,4-beta-D-glucanase
Endo-1,4-beta-D-glucanohydrolase
Endo-1,4-beta-glucanase
Endoglucanase

Figura 2-2 Endoglucanasa; Fuente: (Juturu & Wu, 2014).



Exo- β -1,4-cellobiohydrolase (CBH) EC 3.2.1.91
Accepted name:
Cellulose 1,4-beta-cellobiosidase
Alternative name(s):
1,4-beta-cellobiohydrolase.
4-beta-D-glucan cellobiohydrolase
Avicelase
Exo-1,4-beta-D-glucanase
Exocellobiohydrolase
Exoglucanase

Figura 2-3 Exoglucanasa; Fuente: (Juturu & Wu, 2014).



β -glucosidase (β G) EC 3.2.1.21
Accepted name:
Beta-glucosidase.
Alternative name(s):
Amygdalase
Beta-D-glucoside glucohydrolase
Cellobiase
Gentobiase

Figura 2-4 Betaglucosidasa; Fuente: (Juturu & Wu, 2014).

2.3.1.Mecanismo catalítico de las celulasas

Las glucohidrolasas cortan enlaces glucosídicos mediante el uso de catálisis ácido-base. La hidrólisis se realiza mediante dos residuos catalíticos de la enzima: un ácido general (donante de protones) y un nucleófilo / base (Zhang, Zhang and User, 2013). Esta hidrólisis se produce a través de dos mecanismos principales que dan lugar a una retención general, o una inversión, de configuración anomérica (Davis et al., 1995). Tanto en los mecanismos de retención como de inversión, la posición del donante de protones es idéntica, es decir, está dentro de la distancia de enlace de hidrógeno del oxígeno glicosídico. En la retención de enzimas, la base catalítica nucleofílica está muy cerca del carbono anomérico de azúcar. Esta base, sin embargo, es más distante en las enzimas inversoras que deben

acomodar una molécula de agua entre la base y el azúcar. Esta diferencia da como resultado una distancia promedio entre los dos residuos catalíticos de $\sim 5.5 \text{ \AA}$ en la retención de enzimas en oposición a $\sim 10 \text{ \AA}$ en las enzimas inversoras (Davis et al., 1995; Zhang, Zhang and User, 2013), en las **Figura 2-5** y **Figura 2-6** se muestra gráficamente los mecanismos por inversión y retención respectivamente.

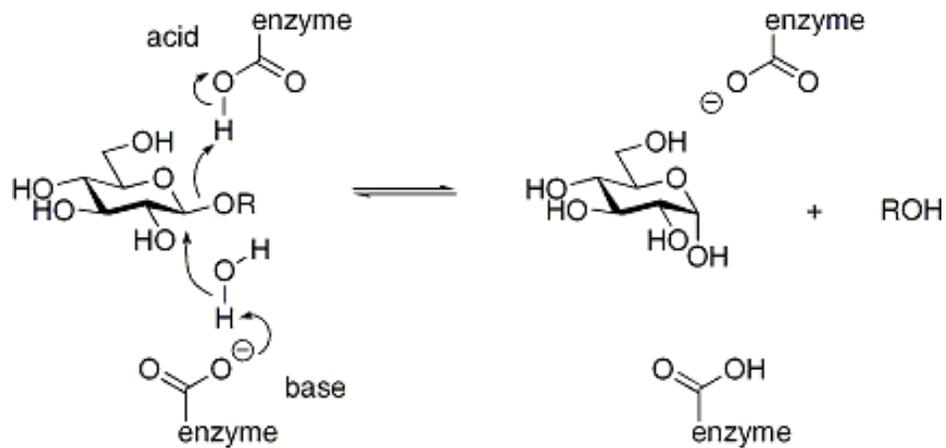


Figura 2-5 Mecanismo por inversión; Fuente: (Davis et al., 1995)

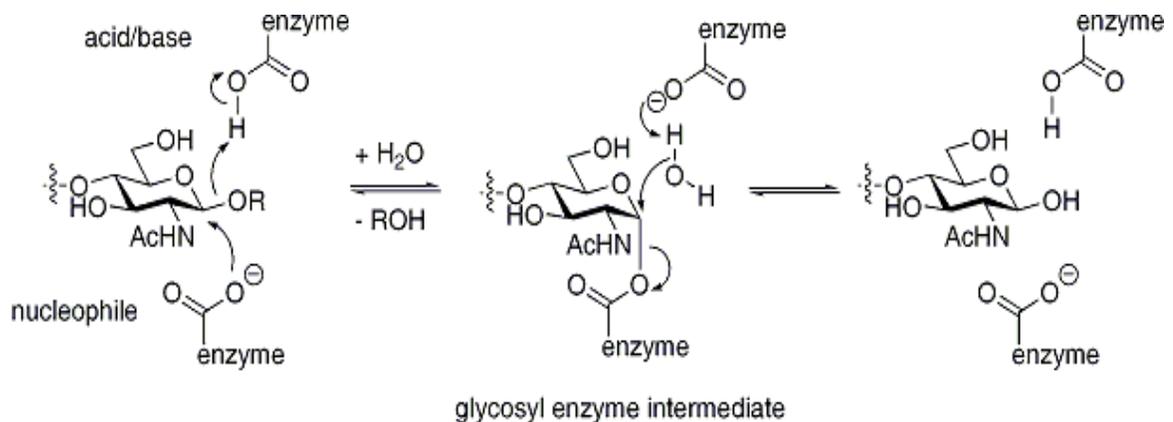


Figura 2-6 Mecanismo por retención.; Fuente: (Davis et al., 1995)

Finalmente, la configuración única de este complejo enzimático tiene varias ventajas: 1. Adhesión directa y específica al sustrato de interés, lo que permite una eficiente competencia con otros microorganismos que tengan el mismo nicho ecológico; 2. La proximidad de la célula a la celulosa asegura la toma de los celo-oligosacáridos solubles. Desde el punto de vista enzimático, este permite una actividad consensuada y sinergismo de las celulasas; evita la adsorción no productiva de las celulasas, además, evita la

competencia innecesaria entre varias celulasas por el sitio de adsorción, por último, permite una óptima capacidad de procesamiento de las celulasas a lo largo de la fibra de celulosa (Golan, 2011; Juturu and Wu, 2014; Singhanía et al., 2017).

2.4. Producción de celulasas

Hasta ahora, la producción industrial de celulasas se consigue principalmente mediante técnica de fermentación sumergida (FS) (Srivastava et al., 2018) Sin embargo, la fermentación en estado sólido (FES) es una tecnología alternativa de bajo costo y bajo consumo de energía que puede llevar a una reducción en el valor comercial de estas enzimas. Algunas ventajas de esta tecnología, como menor susceptibilidad a la contaminación bacteriana, permite mayor productividad enzimática para muchas enzimas, menos susceptible a la inhibición por sustrato, entre otras (Hölker, Höfer, & Lenz, 2004; Merillon & Ramawat, 2017; Sondhi & Saini, 2019). En la **Tabla 2-4** se presenta una comparación entre fermentación sumergida y en estado sólido.

Tabla 2-4 Ventajas y desventajas de FES y FS.

Fermentación en estado sólido	Fermentación sumergida
<ul style="list-style-type: none"> Menor diversidad de productos obtenidos y de microorganismos aptos para crecer en estas condiciones. 	<ul style="list-style-type: none"> Mayor demanda energética asociada a la esterilización del medio y purificación del producto del medio de fermentación.
<ul style="list-style-type: none"> Menor posibilidad de contaminación, debido a la ausencia de agua libre en el sistema. 	<ul style="list-style-type: none"> Pese a la menor concentración de productos obtenida en la fermentación sumergida, la purificación de esas moléculas es facilitada por la ausencia o baja concentración de partículas de sustrato.
<ul style="list-style-type: none"> Menor disponibilidad de información en temas como fenómenos de transporte, cinéticas de crecimiento y producción enzimática. 	<ul style="list-style-type: none"> El alto contenido de agua y la naturaleza diluida del medio facilitan el control de la temperatura del cultivo, reduciendo la degradación del producto, en especial en enzimas con baja termoestabilidad.
<ul style="list-style-type: none"> El extracto obtenido está alrededor de 3 o 4 veces menos diluido que en la FS, así que la productividad y concentración del producto final son mayores en la FES. 	<ul style="list-style-type: none"> Cuando se opera con altas concentraciones de sustrato es posible tener problemas de reología en el sistema.

<ul style="list-style-type: none"> • Menor susceptibilidad a inhibición por sustrato. 	<ul style="list-style-type: none"> • Mayor conocimiento de los fenómenos que la rigen para el aumento de escala.
<ul style="list-style-type: none"> • Mayor dificultad en el control del proceso y en la adición de soluciones deseadas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Los procesos de difusión son facilitados en el sistema debido a la homogeneidad del sistema.
<ul style="list-style-type: none"> • Menor volumen de residuos generados, reduciendo el procesamiento aguas abajo. 	<ul style="list-style-type: none"> • Mayor disponibilidad de tecnologías de monitoreo y control <i>On line</i>.
<ul style="list-style-type: none"> • No necesita disolventes orgánicos, menores costos de capital y operación y agitación reducida. 	<ul style="list-style-type: none"> • El principal inconveniente de la fermentación sumergida son los largos tiempos de fermentación con menor producción

Fuente: (De Almeida, 2013; Machado De Castro & Pereira Jr. Nei, 2010; Rodrigues Pires, 2013).

No es posible hacer una comparación directa entre FES y FS debido a las diferencias en las condiciones de los cultivos microbianos utilizados en las dos tecnologías, pues, los microorganismos involucrados en FES tienen un metabolismo más alto, ya que proliferan de forma casi natural en el medio ambiente, es decir, bajo condiciones de agua libre limitada y con un sólido apoyo para el crecimiento. FES se basa en proporcionar al microorganismo cultivado un entorno lo más cercano posible a su entorno natural de donde son aislados, lo que aparentemente permite que los microorganismos tengan un mejor desempeño y se obtengan mayores rendimientos de los productos en comparación con la fermentación sumergida incluso en condiciones óptimas de operación para el (Thomas, Larroche, & Pandey, 2013).

De acuerdo con lo anterior, es evidente que tanto la fermentación sumergida como en estado sólido son técnicas exitosas, los hongos como *Fusarium sp.*, producen con gran efectividad bioproductos de valor comercial como las enzimas. Finalmente, el rendimiento de estas técnicas depende de la capacidad de la fuente para sintetizar la proteína de interés, algunas condiciones del bioproceso y, adicionalmente, las estrategias de separación de enzimas y purificación (Stanbury, Whitaker, & Hall, 2017).

La regulación y mecanismos de inducción del complejo enzimático en hongos filamentosos, ha sido objeto de numerosas investigaciones usando *Trichoderma reesei* como modelo de microorganismo celulítico por excelencia. Las vías para la síntesis de N-glucanos y O-glucanos se conservan en gran medida a través de especies de hongos (Beckham et al., 2012; Deshpande, Wilkins, Packer, & Nevalainen, 2008), así mismo, este hongo es taxonómicamente similar al *Fusarium sp.* (**Tabla 2-5**) y su mecanismo y regulación posiblemente se asemeje a *T.reesei*.

Tabla 2-5 Clasificación taxonómica para *Fusarium* sp. y *Trichoderma reesei*.

Clarificación	<i>Trichoderma Reesei</i>	<i>Fusarium Sp.</i>
Super Reino	<i>Eukaryota</i>	<i>Eukaryota</i>
Reino	<i>Fungi</i>	<i>Fungi</i>
Subreino	<i>Dikarya</i>	<i>Dikarya</i>
Phylum	<i>Ascomycota</i>	<i>Ascomycota</i>
Subphylum	<i>Pezizomycotina</i>	<i>Pezizomycotina</i>
Clase	<i>Sordariomycetes</i>	<i>Sordariomycetes</i>
Subclass	<i>Hypocreomycetidae</i>	<i>Hypocreomycetidae</i>
Orden	<i>Hypocreales</i>	<i>Hypocreales</i>
Familia	<i>Hypocreaceae</i>	<i>Hypocreaceae</i>
Nectriaceae	<i>Nectriaceae</i>	<i>Nectriaceae</i>
Genero	<i>Trichoderma</i>	<i>Fusarium</i>

Tomada de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>

La hipótesis propuesta por diferentes autores (Bisaria, Mishra, & Eveleigh, 1989; Kubicek, 1987; Rastegari, 2018; Suto & Tomita, 2001), se define en seis etapas la síntesis de celulasas, explicadas a continuación (**Figura 2-7**).

1. La celulasa basal que se encuentra en los conidios entra en contacto con la celulosa que es degradada a celooligosacaridos, luego hidrolizados a glucosa y transglucosidados a soforosa.
2. Los conidios germinan y la glucosa como fuente de carbono y la soforosa como inductor entran en la célula. La β -glucosidasa, unida a la membrana plasmática, convierte los celooligosacáridos en soforosa y glucosa.
3. La soforosa induce la síntesis de celulasas que son secretadas fuera de la célula.
4. Las celulasas secretadas degradan la celulosa causando un aumento en la cantidad de celooligosacáridos y de glucosa
5. La glucosa es asimilada, los celooligosacáridos son hidrolizados a glucosa y transglucosilados para formar soforosa
6. El ciclo continúa hasta que el sustrato se agota o el sistema es reprimido por represión catabólica

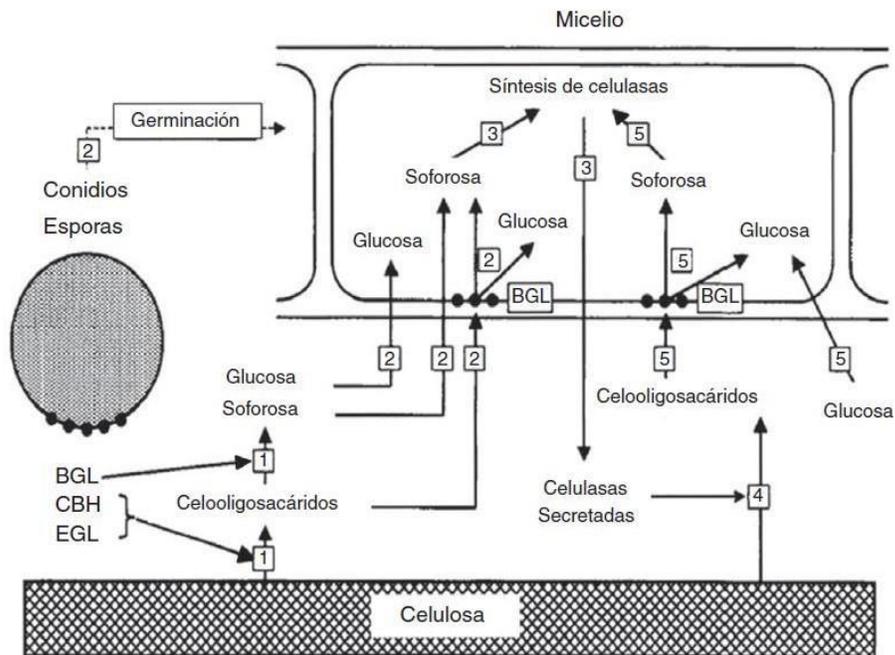


Figura 2-7 Modelo de inducción de celulasas en *T. reesei*, los números corresponden a la descripción del texto Donde: BGL: β -glucosidasa; CBH: 1,4- β -D-glucano celobiohidrolasa; EGL: endo-1,4- β -D-glucanasa.

Tomada de:(Gutiérrez-Rojas, Moreno-Sarmiento, & Montoya, 2015).

Las celulasas son enzimas inducibles y la regulación de la producción de estas es controlada por el mecanismo de activación y represión (Amore, Giacobbe, & Faraco, 2013; Meenu, Singh, & Vishwakarma, 2014). La producción de enzimas celulolítica se induce solo en presencia del sustrato celulosa o alguno de sus derivados, y se reprime cuando azúcares de fácil acceso están disponibles, siendo la lactosa, el único inductor soluble y del cual su mecanismo no está claro aún (Amore et al., 2013; Klaubauf et al., 2014; Rastegari, 2018).

En general, estas enzimas secretadas por hongos carbohidratos-activas, presentan enlaces N- glicosídicos y O-glicosídicos, que es la unión covalente de carbohidratos al lado apropiado de la cadena de aminoácidos. Para *N-glicosilación*, el carbohidrato es atado a un grupo β -amida en asparagina, mientras que para *O-glicosilación* ocurre a un grupo β -hidróxil de serina o treonina. La glicosilación es una modificación postraduccional ubicua, que cumple muchas funciones biológicas en reconocimiento y señalización. Así mismo, se encuentra en el 50% de las proteínas eucariotas, es típicamente requerido para la secreción de celulasas en hongos filamentosos y a pesar del importante papel de la glicosilación en la secreción de celulasas, se sabe relativamente poco sobre las consecuencias bioquímicas de la glicosilación proteica de las celulasas fúngicas (Beckham

et al., 2012; Pena, Costa, & Batista, 2020; Xu et al., 2014). La glicosilación de celulasa varía con la expresión heteróloga y las condiciones ambientales, con cambios concomitantes a la afinidad y actividad de unión.

2.4.1. Fermentación en estado sólido (FES)

La fermentación en estado sólido – FES, es definida como la fermentación en ausencia o cerca a la ausencia de agua libre, es un proceso heterogéneo de 3 fases sólido, líquido y fase gaseosa (Singhania, Kumar Patel, Soccol, & Pandey, 2009; Singhania, Sukumaran, Patel, Larroche, & Pandey, 2010; Thomas, Larroche, & Pandey, 2013). En los últimos años ha generado gran interés en las industrias biotecnológicas debido a su potencial en aplicaciones como la producción de metabolitos secundarios activos, así como, alimentos, combustibles, productos químicos industriales, etc., convirtiéndola en una buena alternativa a la fermentación sumergida (Singhania et al., 2009).

Como se mencionó anteriormente la FES se lleva a cabo en ausencia, o cerca a la ausencia de agua, sin embargo, el sustrato usado debe contener suficiente humedad para soportar el crecimiento y la actividad metabólica de los microorganismos. La matriz sólida puede actuar como fuente de carbono (y otros nutrientes), o como un material inerte que soporta el crecimiento del microorganismo impregnado con la solución de crecimiento (Ray & Behera, 2016; Singh nee' Nigam & Pandey, 2009; Singhania et al., 2009).

Como ha sido definido, el potencial de FES es proveer al microorganismo cultivado un ambiente lo más cercano posible a su ambiente natural, donde existen y de donde fueron aislados. Estas condiciones, son aparentemente lo que permite los mayores rendimientos comparado con la fermentación sumergida.

2.4.2. Factores ambientales que afectan la producción de celulasas.

Hay varios factores que generan gran impacto en esta tecnología en particular que necesitan ser consideradas para el desarrollo de esta. Incluye; la selección del microorganismo y sustrato, parámetros óptimos de proceso y la purificación del producto, que sigue siendo uno de los más grandes retos de esta tecnología. La selección del microorganismo generalmente depende del tipo de sustrato sólido, los requerimientos de crecimiento y el producto final objetivo. Estos criterios generales afectarán el diseño de fermentación y el procesamiento posterior. Los hongos filamentosos continúan dominando

como un microorganismo importante en la SSF debido a su modo de crecimiento micelial, así como a sus capacidades fisiológicas neutrales (Chen & He, 2012; Webb, 2017).

El establecimiento de una relación entre la fisiología de los microorganismos y los factores fisicoquímicos es el objetivo de un modelo apropiado. Las condiciones de operación como la composición del medio de fermentación, la duración, la temperatura, el pH, la aireación, la actividad de agua y la humedad, naturaleza del sustrato empleado, pueden afectar negativamente la producción de celulasas (Behera & Ray, 2016; Wan Yoon, Nam Ang, Cheng Ngho, & Seak May Chua, 2014).

El medio de fermentación utilizado en FES consiste en fuente de carbono, fuente de nitrógeno, fósforo y elementos minerales. El efecto de diferentes fuentes de carbono en la producción de celulasa y endoglucanasa ha variado con diferentes cepas de hongos (Kachlishvili, Penninckx, Tsiklauri, & Elisashvili, 2006), por lo tanto, es importante tener una combinación adecuada de medio, sustrato y cepa de hongos para maximizar la producción de enzimas en FES. El medio Mandels and Webber se usa comúnmente para la producción de celulasa (Siqueira, Rodrigues, Vandenberghe, Woiciechowski, & Soccol, 2020) y la fuente de carbono en el sustrato sirve para inducir la generación de celulasa y endoglucanasa, ya que juega un papel importante en el metabolismo celular.

La secreción de proteínas tanto estructurales como enzimas juegan un rol importante en hongos filamentosos como *Fusarium sp.* Las enzimas son liberadas desde la superficie de la membrana plasmática hacia el espacio periplasmático, donde pueden ser incorporadas a la pared celular, o en el caso particular de las celulasas son secretadas a través de la pared celular al medio exterior (Peberdy, 1994). Si bien la inducción transcripcional directa de los genes involucrados en la degradación de la pared celular de la biomasa lignocelulósica es el primer paso de la producción de enzimas, existen muchas señales competitivas que controlan si se producirán estas enzimas. Uno de estos mecanismos conocida como represión del catabolito de carbono (CCR) por sus siglas en inglés, implica la regulación negativa de los genes necesarios para el consumo de una fuente de carbono menos preferida con respecto a otra (Huberman, Liu, Qin, & Glass, 2016).

Aunque la producción de celulasa comercial se realiza vía fermentación sumergida, estas enzimas también se pueden producir mediante fermentación en estado sólido (Wan Yoon et al., 2014). La síntesis del sistema celulasas es regulada por inducción y por represión catabólica y no en todos los hongos celulolíticos, alcanza tal nivel como para generar azúcares fermentables in vitro. Esta actividad enzimática está condicionada por múltiples factores variables como la temperatura, pH, humedad, presencia de otros carbohidratos,

concentración de nutrientes y productos que afectan significativamente el crecimiento microbiano y la producción de celulasas (Brahmachari, 2016; Chambergo and Valencia, 2016).

- **Actividad de agua / Humedad**

El contenido de humedad es un factor crítico para el proceso de fermentación en estado sólido porque, es una variable que influencia el crecimiento y la biosíntesis de la celulasa (Ray & Behera, 2017; Singhanian et al., 2009; Wan Yoon et al., 2014). Sin embargo, los requerimientos de humedad del microorganismo deben ser definidos en términos de actividad de agua, más que, en contenido de humedad del sólido (Van Dyk & Pletschke, 2012).

- **pH**

Debido a la dificultad de monitorear el pH durante el proceso, el pH no es controlado y se ajusta solamente al inicio de la fermentación. Las variaciones del pH durante FES están relacionadas con la actividad metabólica del hongo. Generalmente, el intervalo de pH para el crecimiento de hongos filamentosos es muy amplio y varía entre 3 y 7 unidades. Sin embargo, para la producción de celulasas en hongos filamentosos se reportan en un intervalo de pH entre 4 y 6, siendo 5 el más usado (Das et al., 2013; Dinis et al., 2009; Falkoski et al., 2013; Xiros et al., 2008b). A pH más elevados aumenta la producción de proteínas extracelulares lo que tiene un efecto negativo sobre la actividad específica de las celulasas (Xiros et al., 2008a). Por el contrario, la disminución de este parámetro provoca una inhibición del crecimiento fúngico.

- **Temperatura**

La temperatura es un parámetro Hongo-dependiente que influencia la producción de celulasa. Por ejemplo, el hongo *Phanerochaete chrysosporium* es normalmente cultivado a 37 °C, sin embargo, con el objetivo de producir celulasa vía SSF se cultiva a menores temperaturas (25 -27 °C). La temperatura óptima para la producción de celulasa y el crecimiento del hongo puede ser diferente. La temperatura óptima para la producción de celulasa normalmente varía entre 25 – 35 °C (Chambergo & Valencia, 2016; Liu & Kokare, 2017; Wan Yoon et al., 2014).

- **Tiempo de fermentación**

Cuando se cultivan hongos de podredumbre blanca o café en sustrato celulósico en condiciones adecuadas, los hongos inician su crecimiento extendiendo sus puntas hifales, luego el micelio fúngico se propaga por todo el sustrato formando una red de micelios. La formación primordial, que implica el desarrollo de una estera de micelio densa y progresiva, tiene lugar hasta el siguiente la superficie del sustrato está casi colonizada por la esterilla de micelio. Estudios de producción de celulasas mostraron la primera señal de crecimiento de hongos en el día 2 de la FES. Después de 7 a 11 días, el hongo cultivado podría haber colonizado completamente el sustrato, dependiendo de la cantidad del sustrato utilizado (Brandl & Andersen, 2017; Chen & He, 2012; Delabona et al., 2013; Kumaran, Sastry, & Vikineswary, 1997; Webb, 2017). En la etapa final del crecimiento de hongos, el basidioma y el cuerpo fructífero de los hongos podrían haberse desarrollado.

La actividad de la celulasa alcanza su punto máximo durante la fase de colonización del crecimiento de hongos y disminuye rápidamente en la etapa posterior durante la formación del cuerpo fructífero. Es posible que la máxima actividad celulasa se produzca cuando la actividad metabólica del hongo y la concentración de azúcar soluble en el agua se encuentren en su punto máximo (Wan Yoon et al., 2014).

- **Fuente de carbono e inductores**

La celulasa es un sistema de enzimas inducibles, en el cual varias fuentes de carbono han sido probadas con el fin de identificar el mejor inductor. La celulosa en sí misma es reconocida como uno de los mejores inductores del complejo celulasa, otros importantes inductores de la producción de celulasas son soforosa y la lactosa (Gautam SP et al., 2010; Loewenberg & Chapman, 1977; Sternberg & Mandels, 1979). (Ryu & Mandels, 1980) determinaron que la celulosa, celobiosa y lactosa son inductores efectivos solo si se encuentran en el medio en altas concentraciones. Por otra parte, estudios realizados por (Behera & Ray, 2016; Erickson, Nelson, & Winters, 2012; Sanchez & Demain, 2008; Suto & Tomita, 2001) indicaron que la glucosa produce represión catabólica en la biosíntesis de celulasa.

La regulación de la producción de celulasas mediante la fuente de carbono es conocida comúnmente como represión de catabolitos por carbono- CCR por sus siglas en inglés, este es uno de los mecanismos conservativos que protege en contra del desgaste de la maquinaria que permite sintetizar proteínas de las células, opera cuando hay más de un sustrato utilizable en el medio de crecimiento. La célula produce enzimas para catabolizar

la fuente de carbono asimilable más rápidamente mientras que la síntesis de sustrato es reprimida hasta que la primera fuente sea agotada. Las enzimas reprimidas son usualmente inducibles, en el caso de la producción de celulasa esta represión es causada por la glucosa (Merillon & Ramawat, 2017; Sánchez & Demain, 2008).

Entre las fuentes de carbono para la producción de enzimas celulolíticas, hemicelulolíticas y xilanolíticas para hongos filamentosos, es posible deducir que el aumento de la actividad enzimática usa como fuente de carbono la celulosa, como se muestra en la **Tabla 2-6**.

Tabla 2-6 Fuente de carbono usadas para la producción de celulasas de *Fusarium* sp.

Hongo Filamentoso	Composición del medio (C)	Producción de celulasa (Uml-1)				Tiempo (días)	Referencia	
		EG	Ex G	FPA	BG			
<i>Fusarium Sp.</i>	CMC	5,9	2,3		8,4		(Stewart & Parry, 1981)	
	Lactosa	5,8	2,4		9,0			
	Glucosa	3,2	1,2		5,2			
	CMC+	3,0	1,05		5,2			
Glucosa								
<i>Fusarium Sp.</i>	CMC+	0,8	2,3		8,9		(Trivedi & Rao, 1981)	
	celobiosa							
	CMC	3,7	1,0		6,8			
	Alfa-Celulosa	5,1	2,0		7,6			5
	Lactosa	0,3	0		0,6			
	Solka floc 5%	76,2		11,3				
<i>Acremonium Cellolyticus</i>	Lactosa 1%			1,2			(Fang, Yano, Inoue, & Sawayama, 2008)	
	Celobiosa 1%			0,7	8			
	Solka floc 4% + 1% lactosa	92,2		16,7				
	Celulosa+ lactosa	4,2		5,02				5
	Celulosa + CMC+ Lactosa	2,1		1,4				4
<i>T. reesei</i>	Celulosa + Lactosa	3,8		2,3		5	(Ahamed & Vermette, 2008)	
	Glucosa + Lactosa	2,0		1,4		5		
	Lactosa 1%	27						
	CMC	0,9						
<i>Aspergillus sp.</i>	Maltosa	14					(Chellapandi & Jani, 2009)	
	Xilosa	16						
	Arabinosa	21						2

	Lactosa	30					
<i>Fusarium sp.</i>	CMC	10					
	Xilosa	20					
	Arabinosa	26					
<i>Fusarium Oxysporum</i>							(Ramanathan, Banupriya & Abirami, 2010)
	CMC	1,92		1,34	1,98	8	
<i>Aspergillus terreus</i>	(OPEFB) (10gl-1)	8,64		0,76	6,81	6	(Shahriarinnour et al., 2011)
<i>Aspergillus terreus</i>	Corn cob	1,14				6	(Nazir, Soni, Saini, Kaur, & Chadha, 2010)
	Corn cob + Fructosa	1,31					
	Corn cob + Celobiosa	1,39					
<i>A. Zeae</i>	Corn straw	0,09		0,51			(Maíra Nicolau De Almeida et al., 2011)
<i>(EA802)</i>	Caña de azúcar	0,09		0,14		10	
<i>Aeromonium sp. (EA0810)</i>	Corn straw	0,18		0,18			
	Caña de azúcar	0,15		0,55			
<i>Fusarium chlamyosporum</i>	Bagazo de caña	281,8 *		95,2 *	135,2 *		(Qin, He, Li, Ling, & Liang, 2010)
<i>Mycekiophthora sp</i>	Wheat bran	23,3					(Zanelato, Shiota, Gomes, da Silva, & Thoméo, 2012)
<i>Mycekiophthora sp</i>	BC+WB	58,53		0,55			
<i>Fusarium verticillioides</i>	WS	0,7		0,1			(Ravalason et al., 2012)
<i>Fusarium solani</i>	Glucosa	11,7		9,6			(Obruca, Marova, Matouskova, Haronikova, & Lichnova, 2012)
	WB	46,7		35,9			
	CB	248		219		3	
<i>Aspergillus sydowii</i>	Lactosa	1,32	3,99	1,33	9,24	6	(Matkar, Chapla, Divecha, Nighojkar, & Madamwar, 2013)

*U/g

EG: Endoglucanasa; ExG: Exoglucanasa; FPA: Actividad celulasa; BG: Betaglucosidasa (OPEFB): Oil palm empty fruit bunch.

La inducción por otra parte es un mecanismo de control donde el sustrato (o componente estructuralmente similar al sustrato o compuesto relacionado metabólicamente), “inicia” la síntesis de la enzima, que normalmente se encuentran relacionadas con la degradación del sustrato. Las enzimas que son sintetizadas como resultado de genes activados son llamadas enzimas inducibles y el compuesto químico que activa el gen es conocido como inductor. Las enzimas inducibles son producidas como una respuesta a la presencia del sustrato, y en esta medida, solo son producidas cuando se necesitan (Merillon & Ramawat, 2017; Sánchez & Demain, 2008). (Mandels, Parrish, & Reese, 1962) determinaron que la producción de celulasa por *Trichoderma R.* en medio líquido era inducida por azúcares como la celobiosa, pero con mayor potencial por la soforosa. Algunos inductores más estudiados en la producción de celulasas con *Fusarium* se muestran en la **Tabla 2-7**.

Tabla 2-7 Inductores estudiados en la producción de celulasa por *Fusarium* sp.

Actividad enzimática	Inductor	Concentración	*Producción U/mL	Referencia
Celulasa	Lactosa	50g/L	5	(Ahamed & Vermette, 2008)
	Lactosa	1%	16,7 ±0,5	(Fang, Yano, Inoue, & Sawayama, 2008)
	Almidón	0,03%	2,2	(Trivedi & Rao, 1981)
	Soforosa	1%	20	
	Pectina	0.03%	2,2	

● Fuente de nitrógeno

El nitrógeno puede ser asimilado desde fuentes orgánicas e inorgánicas. La asimilación desde una fuente inorgánica requiere la reducción hasta amoníaco, seguido por su incorporación en metabolitos intracelulares. Por otra parte, las fuentes orgánicas, son usualmente fuentes monoméricas o macromoléculas como aminoácidos o nucleobases o compuestos derivados de estos. Algunos productos derivados vegetales, animales y de levadura crudos, se usan comúnmente como fuentes complejas de nitrógeno en procesos de fermentación, ya que además de nitrógeno y carbono, también suministran vitaminas, factores de crecimiento y minerales para el crecimiento microbiano (Adnan et al., 2017; Merillon & Ramawat, 2017; Sánchez & Demain, 2008). Los productos derivados de la levadura se producen generalmente a partir de la levadura de panadería y de cerveza, se cultivan en melazas, extracto de malta u ocasionalmente en otros sustratos como agro-

desechos. Se utilizan extractos de levadura, así como hidrolizados de levadura. Las peptonas se obtienen por hidrólisis enzimática parcial de proteínas de origen animal, lácteo o vegetal (carne, gelatina, caseína, proteína de suero, proteína de soja, entre otros). Todos ellos deben ser probados en cuanto a su viabilidad para una determinada cepa microbiana, que se utiliza en un proceso de fermentación particular (Singh nee' Nigam & Pandey, 2009; Vandamme, 2009). La **Tabla 2-8** muestra las fuentes de nitrógeno usadas para la producción de celulasas a partir de *Fusarium sp.*

Tabla 2-8 Fuentes de nitrógeno usadas para la producción de celulasas de *Fusarium sp.*

Actividad	Fuente de Nitrógeno	Concentración	*Producción U/mL	Referencia
Endoglucanasa	Peptona	0,2%	40	(Chellapandi & Jani, 2009)
	Nitrato de potasio	0,5%	37±1,7	
Celulasa	Urea	1%	1,4	(Lee et al., 2011)
Celulasa	Extracto de levadura	6g/L	0,76±0,01	(Shahriarinnour et al., 2011)
Celulasa	Nitrato de sodio	<5g/L	0,6	(Maíra N. De Almeida et al., 2014)
Xilanasas			80	
Endoglucanasa			8,28	
Celulasa	Extracto de levadura	0,5g/L	5,94±0,91	(King et al., 2009)
Celulasa	Extracto de levadura	10g/L	5	(Ahamed & Vermette, 2008)
Exoglucanasa	Nitrato de sodio	0,03%	2,2	(Trivedi & Rao, 1981)
Endoglucanasa	Nitrato de sodio	0,03%	5,0	
β-glucosidasa	Fosfato dihidrógeno de amonio	0,03%	7,00	
endoglucanasa,	Harina de maíz	7%	26,6*	

cellobiohidrolasa,		7%	4.1*	(Panagiotou et al., 2003)
β -glucosidasa,		1%	0.140*	
Xilanasa		1%	1840*	
β -xylosidasa		5%	0.033*	

*U/g

La celulosa actúa esencialmente como la fuente de carbono y como un inductor para la producción de celulasas. Adicionalmente, la producción de celulasas y el crecimiento de biomasa pueden ser estimuladas también por la fuente de nitrógeno presente durante la fermentación, es así como la peptona es una fuente potencial para la producción del sistema completo de celulasas. Diferentes enzimas del complejo celulolítico pueden ser inducidas por diferentes fuentes de nitrógeno. Lo anterior, se puede deducir por la fuente de nitrógeno, ya que, varios autores coinciden en que es posible obtener mejores resultados utilizando compuestos orgánicos como el extracto de levadura, peptona en concentraciones entre el 0,5% -1%. Finalmente, el efecto de diferentes medios de fermentación para la producción de celulasas y endoglucanasas, varía de acuerdo con los sustratos y cepas de hongos a usar (Hu et al., 2018).

3. Materiales y métodos

3.1. Reactivación del microorganismo

Este trabajo utilizó una cepa fúngica nativa, la cual corresponde a *Fusarium sp.*, aislada en el Urabá Antioqueño por el laboratorio de Bioprocesos y Flujos Reactivos del Departamento de Procesos y Energía de la Facultad de Minas, en la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín (Lopera, 2009). La cepa *Fusarium sp.* fue identificada por técnicas morfológicas, las cuales presentaron potencial lignolítico, en estudios como “Optimización de la hidrólisis enzimática de material lignocelulósico del banano” (Cano, 2011), “Optimización del medio de cultivo para la producción de Lacasa por *Fusarium sp.*” (Certain, 2015) y en “Evaluación de la Separación y Purificación de Lacasa a partir de *Fusarium sp.* para su Aplicación en Materiales Lignocelulósicos” (Tangarife, 2016).

Para la reactivación de la cepa se tomaron muestras de los cultivos de reserva y se sembró en el medio agar papa dextrosa, (PDA, por sus siglas en inglés) durante 7 días a 30°C de acuerdo con la metodología seguida por Kongsak et al. (2008). El medio de cultivo fue preparado siguiendo las instrucciones de las fichas técnicas y se esterilizó a 15 PSI y 120°C durante 15 minutos previos a la inoculación (Nelson, et al. 1994, Prescott, et al. 2004, Best 2013).

3.2. Optimización de la producción de celulasa y endoglucanasa mediante fermentación en estado sólido.

3.2.1. Inóculo

El microorganismo fue cultivado en cajas de Petri a 30°C en medio PDA suplementado con carboximetilcelulosa – CMC al 0,5% p/p, finalizado el crecimiento micelial se inóculo con discos de micelios, cortando pequeños discos de 8mm de diámetro de la periferia de un hongo en crecimiento activo ((Marques et al., 2018).

3.2.2. Selección de la fuente de carbono para la producción enzimática.

El medio Mandels y Webber es usado frecuentemente en la producción de celulasas en sustratos lignocelulósicos (Hu et al., 2018; Xin & Geng, 2010) y debido a que el efecto de diferentes fuentes de carbono en la producción de celulasa y endoglucanasa ha variado con diferentes cepas de hongos (Kachlishvili, Penninckx, Tsiklauri, & Elisashvili, 2006), es importante tener una combinación adecuada de medio, sustrato y cepa de hongos para maximizar la producción de enzimas en FES. Para la producción enzimática, fueron probados diferentes sustratos: Celulosa al 98%, Carboximetilcelulosa con un grado de modificación de 0,72 de grupos carboxilo por cada glucosa anhidra, carboximetilcelulosa sódica (CMC-Na), celulosa, glucosa, maltosa al 1% P/V, así como, CMC al 1% P/V suplementada con arabinosa y xilosa al 0,5% P/V. Las fermentaciones se realizaron en Erlenmeyer de 50mL con 1g de sustratos esterilizados a 121°C durante 20 minutos. Todos los sustratos fueron humedecidos al 70%, teniendo en cuenta que este porcentaje se reporta en estudios como (Hu et al., 2018) con el medio formulado por Mandels & Weber (1969). Luego de la inoculación del microorganismo, los Erlenmeyer fueron mantenidos a 30°C durante 5 días (Hu et al., 2018). El sustrato que presentó mayor producción de enzimas fue usado para la evaluación de los otros parámetros.

Tabla 3-1 Composición del medio de fermentación (Mandels & Weber, 1969).

Reactivo	Unidad	Cantidad
(NH ₄) ₂ SO ₄	g	1,86
KH ₂ PO ₄	g	2,0
Urea	g	0,3
CaCl ₂	g	0,03
MgSO ₄ .7H ₂ O	g	0,3
Extracto de levadura	g	4,08
MnSO ₄ .H ₂ O	mg	1,6
ZnSO ₄ .7H ₂ O	mg	1,4
CoCl ₂	mg	2
Peptona	P/V	0,8
Tween 80	V/V	0,1

3.2.3. Influencia de factores ambientales en la producción de celulasas y endoglucanasas.

La síntesis del sistema celulasas es regulada por inducción y represión catabólica que puede ser condicionada por factores ambientales como la temperatura, pH, humedad, tiempo de fermentación, presencia de otros carbohidratos, concentración de nutrientes y productos que afectan significativamente el crecimiento microbiano y la producción de celulasas (Brahmachari, 2016; Chambergo and Valencia, 2016). Con el fin de optimizar y determinar los efectos de factores ambientales en la producción de celulasa y endoglucanasas, como pH, humedad y tiempo de fermentación, se desarrolló el diseño central compuesto, de 31 corridas y 6 repeticiones del punto central; los niveles de trabajo se muestran en la **Tabla 3-2**.

Tabla 3-2 Factores ambientales y rangos por evaluar

Factor	Unidad	Valor mínimo	Valor máximo
Humedad	%	65	80
pH	Unidades	4,5	6,0
Tiempo de fermentación	días	2	6
Temperatura	°C	28	35

Finalizando cada uno de los ensayos, se obtuvo el extracto enzimático y se determinó la actividad enzimática celulasa y endoglucanasa, siguiendo la metodología (Adney & Baker, 1996a; Ghose, 1987), los cuales fueron las variables respuesta del diseño de experimentos.

3.2.4. Influencia de los inductores en la producción de Endoglucanasa.

Las enzimas inducibles son producidas como una respuesta a la presencia del sustrato, y en esta medida, solo son producidas cuando se necesitan. (Mandels, Parrish, & Reese, 1962; Merillon & Ramawat, 2017; Sánchez & Demain, 2008; Obruca, Marova, Matouskova, Haronikova, & Lichnova, 2012; Fang, Yano, Inoue, & Sawayama, 2008; Nazir, Soni, Saini, Kaur, & Chadha, 2010) determinaron que la producción de celulasa fue inducida por algunos azúcares, pero con mayor potencial por la soforosa. Varios inductores se evaluaron para

determinar su influencia en la producción de celulasas. Para esto, el medio optimizado, se suplementó con fructosa, lactosa, soforosa y xilosa al 1% P/V. Luego de la inoculación del microorganismo, los Erlenmeyer fueron mantenidos a 28,8°C durante 10 días. Finalmente, se midió actividad enzimática celulasa y endoglucanasa a los extractos enzimáticos obtenidos.

3.2.5. Caracterización fisicoquímica del extracto enzimático.

El efecto de la temperatura sobre las actividades enzimáticas se determinó en buffer acetato 50Mm, pH 5 a un rango de temperatura de 30-70°C, incubando el extracto enzimático en un baño María Jubalo SW23 ajustando las temperaturas durante 60 minutos. Por otra parte, para determinar el efecto del pH sobre las actividades enzimáticas, se utilizaron dos soluciones tampón que permitieron alcanzar los rangos de pH definidos. Acetato de sodio 50 mM tampón (pH 3.0–6.0), tampón fosfato 50 mM (pH 6.0–8.0). Bajo las óptimas temperaturas, las enzimas se incubaron en estos tampones entre pH 3.0 – 8.0 y se determinó su pH óptimo para las actividades más altas. Todas las actividades enzimáticas se midieron mediante los métodos descritos por (Adney & Baker, 1996b) y se expresaron como actividades relativas; que se definen como porcentaje de la actividad enzimática más alta obtenida en cada experimento que se realizó por triplicado.

3.3. Métodos de análisis

Para determinar las condiciones óptimas de la producción de celulasa, se desarrollaron los siguientes métodos analíticos.

3.3.1. Extracto enzimático

La extracción de la enzima se realizó adicionando 10mL de solución tampón citrato 0,05 M a pH 5, posteriormente se agitó a 180 RPM durante una hora a 30°C. Finalmente, el medio se centrifugó a 10000RPM en centrífuga THERMO SCIENTIFIC IEC CL31R durante 15 minutos, el sobrenadante fue utilizado para los ensayos enzimáticos (Saratale et al., 2017b).

3.3.2. Actividad enzimática celulasas

La Actividad celulasa fue determinada usando la metodología planteada por National Renewable Energy Laboratory – NREL (Adney & Baker, 1996b). 0,5mg de papel filtro preparado en una solución tampón de citrato 0,05M y pH 5. La mezcla de la reacción contiene cantidades iguales de enzima y sustrato y fue incubado a 50°C durante una hora. La reacción fue desactivada con la adición de ácido dinitrosalicílico - DNS seguido de 5 minutos en baño maría en ebullición y el color desarrollado fue leído a 540 nm. La cantidad de azúcares liberados fueron cuantificados usando como reactivo estándar la glucosa. La **Ecuación 3-1** permitió estimar la concentración de enzima en unidades de papel filtro.

Ecuación 3-1 Cálculo FPU

$$FPU = \frac{0,37}{\text{Concentración de enzima que libera 2,0 mg glucosa}} (U\text{ml}^{-1})$$

La derivación de la unidad FPU se muestra a continuación:

La Unidad FPU es basada en la Unidad Internacional (UI)

1(UI) = 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$ de sustrato convertido

= 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$ de glucosa (Azúcares reductores como azúcar) Formados durante la reacción de hidrólisis.

= 0,18 mg. min^{-1} Cuando el producto es glucosa.

La cantidad absoluta de glucosa liberada durante la actividad enzimática en la dilución crítica es 2.0 mg, dónde:

$$2\text{mg glucosa} = 2/0,18\mu\text{mol}$$

Esta cantidad de glucosa fue producida por 0,5 ml de enzima en 60 minutos, entonces:

$$\begin{aligned} 2\text{mg glucosa} &= \frac{2}{0,18} \times 0,5 \times 60 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ml}^{-1} \\ &= 0,37 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ml}^{-1} (U\text{ml}^{-1}) \end{aligned}$$

Por otra parte, cuando la actividad enzimática es baja, es posible encontrar que aun el extracto enzimático sin dilución libera menor cantidad que la crítica (2 mg de glucosa). En este caso, se calculó la actividad enzimática de la siguiente forma:

Ecuación 3-2 Calculo FPU para baja actividad enzimática

$$FPU = \text{mg de glucosa liberada} \times 0,185$$

Dónde:

$$\begin{aligned} 1 \text{ mg de glucosa} &= \frac{1,0}{0,18} \times 0,5 \times 60 \times 0,18 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ml}^{-1} \\ &= 0,185 U\text{ml}^{-1} \end{aligned}$$

3.3.3. Actividad enzimática Endoglucanasa.

La endo- β -1,4-D-glucanasa (EC 3.2.1.4) corta aleatoriamente enlaces intermoleculares β -1,4glucosídicos accesibles en la superficie de la celulosa (Golan, 2011). Debido a que la celulosa insoluble tiene un fraccionamiento accesible muy bajo de los enlaces de la β -glucosidasa a la celulosa soluble en agua. Los derivados de celulosa, como la CMC y la hidroxietilcelulosa (HEC), se usan comúnmente para los ensayos de actividad de endoglucanasa. La hidrólisis se puede determinar midiendo los cambios en los azúcares reductores, la viscosidad o el color.

La Actividad endoglucanasa fue determinada siguiendo la metodología presentada en (Zhang, Hong, & Ye, 2009) usando CMC al 1% preparado en una solución tampón de citrato (0,05 M, pH 5). La mezcla de la reacción contiene cantidades iguales de enzima y sustrato y fue incubado a 50°C durante 30 minutos. La reacción fue detenida con la adición de ácido dinitrosalicílico - DNS seguido de 5 minutos en agua hirviendo. El color desarrollado fue leído a 540nm la cantidad de azúcares liberados fue cuantificado usando como reactivo estándar la glucosa con una curva de calibración entre 0,11 -1,1M. Finalmente, para estimar la concentración de la enzima las unidades internacionales se calculan usando la Ecuación 3-3 y Ecuación 3-4.

Ecuación 3-3 Calculo actividad CMC

$$CMC = \frac{0,185}{\text{Concnetración de enzima que libera } 0,5 \text{ mg glucosa}} (U/ml^{-1})$$

Ecuación 3-4 Calculo CMC para baja actividad enzimática

$$CMC = \text{mg de glucosa liberada} \times 0,37$$

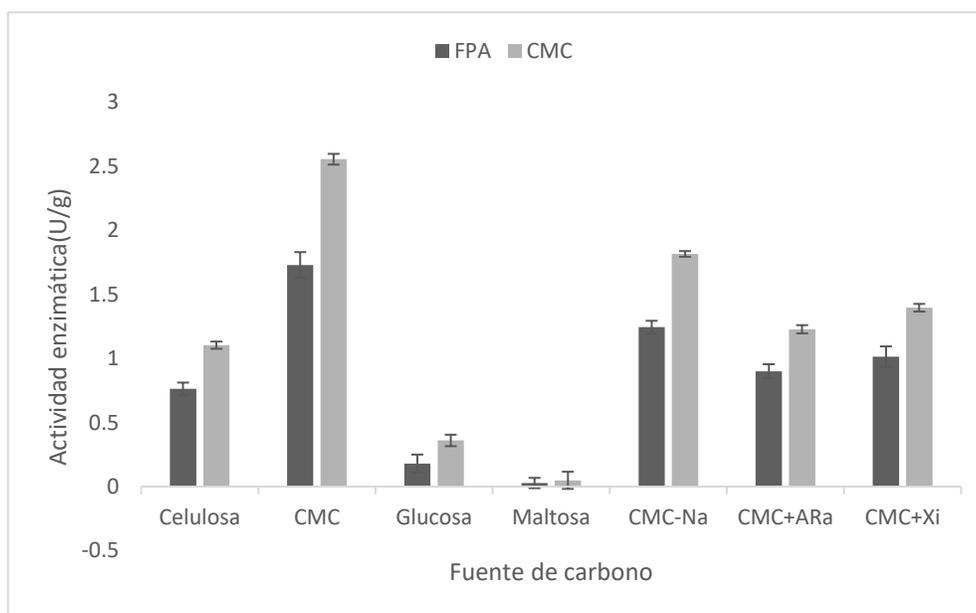
Dónde:

$$\begin{aligned} 1 \text{ mg de glucosa} &= \frac{1,0}{0,18} \times 0,5 \times 30 \times 0,18 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ ml}^{-1} \\ &= 0,37 \text{ U/ml}^{-1} \end{aligned}$$

4. Resultados y discusión.

En este trabajo se evaluó la producción de celulasas, usando las siguientes fuentes de carbono: celulosa, CMC, CMC-Na, glucosa, maltosa al 1%, así como, CMC al 1% suplementada con arabinosa y xilosa al 0,5% (Chellapandi & Jani, 2009; Nazir, Soni, Saini,

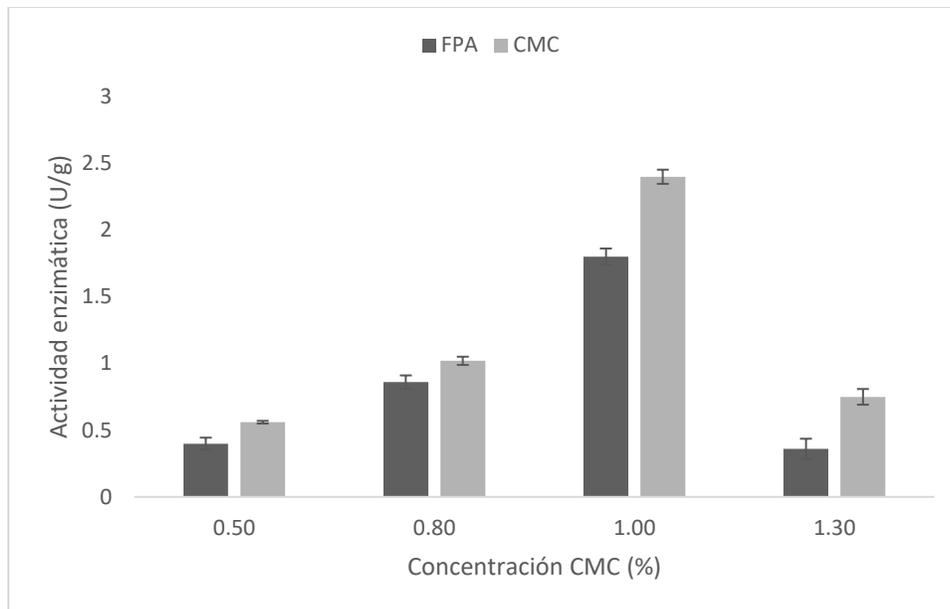
Kaur, & Chadha, 2010) debido a que el efecto de diferentes fuentes de carbono en la producción de celulasa y endoglucanasa ha variado con diferentes cepas de hongos (Kachlishvili, Penninckx, Tsiklauri, & Elisashvili, 2006. Esto permite identificar cual es el mejor inductor del complejo enzimático, ya que este es un sistema inducible por medio de las fuentes de carbono, como ha sido probado en diferentes estudios (Behera & Ray, 2016; Kobakhidze, Asatiani, Kachlishvili, & Elisashvili, 2016; Kumar Bharti, Kumar, Kumar, & Dutt, 2018; Li, Liu, Bai, & Zhao, 2016; Marques et al., 2018; Ries, Beattie, Espeso, Cramer, & Goldman, 2016)



Gráfica 4-1 Efecto de la fuente de carbono en la producción de celulasas y endoglucanasas

Los resultados obtenidos se presentan en la Gráfica 4-1 que indica que la producción de celulasa y endoglucanasa fue significativamente influenciada por el tipo de fuente de carbono. Así, CMC, fue el más efectivo como única fuente de carbono en la producción de enzimas teniendo una actividad enzimática celulasa 1.73U/g y endoglucanasa 2.55U/g; seguido de CMC-Na y celulosa.

A partir de los resultados anteriores, es importante explicar cómo compuestos insolubles en agua como la celulosa y sus modificaciones (CMC y CMC-Na) son mejores inductores de la actividad enzimática FPA y CMC que los compuestos solubles de fácil acceso evaluados en este trabajo, como lo demuestran (H, Shoukry, H Hassan, & El-Shall, 2011; Maíra Nicolau De Almeida et al., 2011; Jun, Kieselbach, & Jönsson, 2011).



Gráfica 4-2 Efecto de la concentración de CMC en la producción de celulasa y endoglucanasa

En experimentos realizados con diferentes concentraciones de carboximetilcelulosa, se identificó la concentración de la fuente de carbono en la que se produzca la mayor actividad enzimática, encontrando que, la producción enzimática aumentó con el incremento en la concentración inicial de la carboximetilcelulosa de 0,5% al 1,0% mientras que al 1,3% se redujo ligeramente el rendimiento. La mayor actividad se presentó a concentración de 1.0%, 1.8U/g y 2.40U/g para celulasa y endoglucanasa respectivamente (Mandels & Weber, 1969), (Ramanathan et al., 2010) y (Gautam SP et al., 2010) también reportaron que las máximas actividades enzimáticas del complejo se obtuvieron en un 1% P/V de sustrato de carbono utilizando diferentes hongos de podredumbre blanca (Gráfica 4-2).

3.1. Optimización de factores físicos a través de la metodología de superficie de respuesta (MSR)

La metodología de superficie de respuesta fue usada con un diseño central compuesto (DCC), dos niveles y seis repeticiones del punto central. Los cuatro factores evaluados fueron: temperatura (A), pH (B), humedad (C) y tiempo de incubación (D). La producción óptima de celulasa y endoglucanasa se obtuvieron a 30°C, pH 5.2, humedad 71,4% y 8 días de incubación. Luego de la validación del punto óptimo, la actividad celulasa fue (3.552 U/g) y endoglucanasas (4.812U/g). La respuesta de este diseño de experimentos permitió evaluar las interacciones entre los cuatro factores, la Tabla 4-1 Resultados diseño de

experimentos muestra los resultados obtenidos en los experimentos.

Respuesta: FPA y CMC

Términos: A B C D AA BB CC DD AB AC AD BC BD CD

Dónde:

A: Temperatura

B: pH

C: Humedad

D: Tiempo

Tabla 4-1 Resultados diseño de experimentos

Orden Est	Orden Corrida	T (°C)	pH	T(días)	Humedad (%)	Actividad enzimática	
						FPA/g	CMC/g
21	1	31,5	5,25	0	72,5	0.4512	0.2679
30	2	31,5	5,25	4	72,5	0.2706	0.1148
29	3	31,5	5,25	4	72,5	2.304	1.8432
19	4	31,5	3,75	4	72,5	3.48	2.232
4	5	35	6	2	65	3.164	2.1131
18	6	38,5	5,25	4	72,5	2.061	1.71
10	7	35	4,5	2	80	2.034	1.683
6	8	35	4,5	6	65	3.6	2.268
28	9	31,5	5,25	4	72,5	3.48	-0.528
14	10	35	4,5	6	80	-0.005	-0.044
2	11	35	4,5	2	65	0.4608	0.2736
26	12	31,5	5,25	4	72,5	1.056	0.8064
23	13	31,5	5,25	4	57,5	0.2624	0.1025
5	14	28	4,5	6	65	0.248	0.096
16	15	35	6	6	80	2.6826	2.2848
17	16	24,5	5,25	4	72,5	3.136	2.5648
27	17	31,5	5,25	4	72,5	0.012	0
25	18	31,5	5,25	4	72,5	0.2747	0.1148
1	19	28	4,5	2	65	2.97	2.068
15	20	28	6	6	80	2.58	2.19
11	21	28	6	2	80	0.072	-0.042
9	22	28	4,5	2	80	0.8246	0.589

Orden Est	Orden Corrida	T (°C)	pH	T(días)	Humedad (%)	Actividad enzimática	
						FPA/g	CMC/g
8	23	35	6	6	65	1.2172	0.9588
20	24	31,5	6,75	4	72,5	0	0
3	25	28	6	2	65	0.555	0.365
7	26	28	6	6	65	1.3248	1.044
31	27	31,5	5,25	4	72,5	1.64	1.328
12	28	35	6	2	80	3.192	2.1774
24	29	31,5	5,25	4	87,5	3.22	0
13	30	28	4,5	6	80	0	0
22	31	31,5	5,25	8	72,5	0.1435	0.007

También fueron estudiados los efectos de las interacciones entre los factores en la actividad enzimática. Los resultados estadísticamente significativos con valores $p < 0.05$ fueron: Lineal (A, C), interacciones (BC, BD) y cuadráticos (A^2 , C^2) para la actividad celulasa. En cuanto a la endoglucanasa, los valores significativos fueron: Lineal (A), interacciones (AD) y cuadráticos (A^2 , B^2 , C^2 , D^2). Un valor positivo en la *t-estadística* indica un efecto lineal que incrementa la producción enzimática, en este caso los datos positivos fueron humedad, tiempo para la celulasa y pH, tiempo para la endoglucanasa. Por el contrario, si los valores de *t-estadística* en los factores lineales son negativos, muestra que la producción enzimática decrece con el incremento de la temperatura y el pH para la celulasa, mientras que para la endoglucanasa es la temperatura y la humedad. La Tabla 4-2 y Tabla 4-3 muestran los coeficientes de regresión obtenidos.

Tabla 4-2 Coeficientes de regresión estimados para actividad celulasa

Término	Coef	SE	T	P
Constante	3.1209	0.2845	10.9680	0.0000
Temperatura (°C)	-0.3053	0.1537	-1.9870	0.0440
pH	0.2157	0.1537	1.4040	0.1800
humedad (%)	-0.2891	0.1537	-1.8810	0.0480
Tiempo (días)	0.2227	0.1537	1.4490	0.1670
Temperatura (°C)*Temperatura(°C)	-0.6434	0.1408	-4.5700	0.0000
pH*pH	-0.2948	0.1408	-2.0940	0.0530
humedad (%) *humedad (%)	-0.5560	0.1408	-3.9500	0.0010
Tiempo (días)*Tiempo (días)	-0.5903	0.1408	-4.1930	0.0010
Temperatura (°C)*pH	0.1450	0.1882	0.7700	0.4520
Temperatura (°C)*humedad (%)	0.1454	0.1882	0.7720	0.4510

Término	Coef SE	Coef	T	P
Temperatura (°C)*Tiempo (días)	0.4174	0.1882	-2.2180	0.0410
pH*humedad (%)	-0.4334	0.1882	-2.3030	0.0350
pH*Tiempo (días)	-0.4050	0.1882	-2.1520	0.0470
humedad (%)*Tiempo (días)	0.3289	0.1882	1.748	0.1

Tabla 4-3 Coeficientes de regresión estimados para CMC

Término	Coef SE	Coef	T	P
Constante	2.181	0.1491	14.628	0.000
Temperatura (°C)	-0.271	0.0805	-3.365	0.004
pH	-0.050	0.0805	-0.621	0.544
humedad (%)	-0.015	0.0805	-0.187	0.854
Tiempo (días)	0.409	0.0805	5.075	0.000
Temperatura (°C)*Temperatura (°C)	-0.513	0.0738	-6.961	0.000
pH*pH	-0.201	0.0738	-2.730	0.015
humedad (%)*humedad (%)	-0.435	0.0738	-5.894	0.000
Tiempo (días)*Tiempo (días)	-0.451	0.0738	-6.109	0.000
Temperatura (°C)*pH	0.102	0.0986	1.029	0.319
Temperatura (°C)*humedad (%)	0.149	0.0986	1.511	0.150
Temperatura (°C)*Tiempo (días)	-0.381	0.0986	-3.861	0.001
pH*humedad (%)	-0.017	0.099	-0.171	0.867
pH*Tiempo (días)	-0.001	0.099	-0.009	0.993
humedad (%)*Tiempo (días)	-0.080	0.099	-0.813	0.428

La variabilidad observada en la respuesta experimental (Factores) y sus interacciones fue medida por el R^2 y R^2 ajustado. Los valores de R^2 fueron 82.66% y 90.76% mientras que los ajustados fueron 67.49% y 82.68% para celulasa y endoglucanasa respectivamente, la cercanía respectiva de estos valores implica que el ajuste lineal, interacciones y términos cuadráticos, pueden explicar el 82.66% y 90.79% de las variaciones, mostrando que el modelo representa adecuadamente el proceso. A continuación, se muestran los modelos obtenidos (Ecuación 4-1 y Ecuación 4-2).

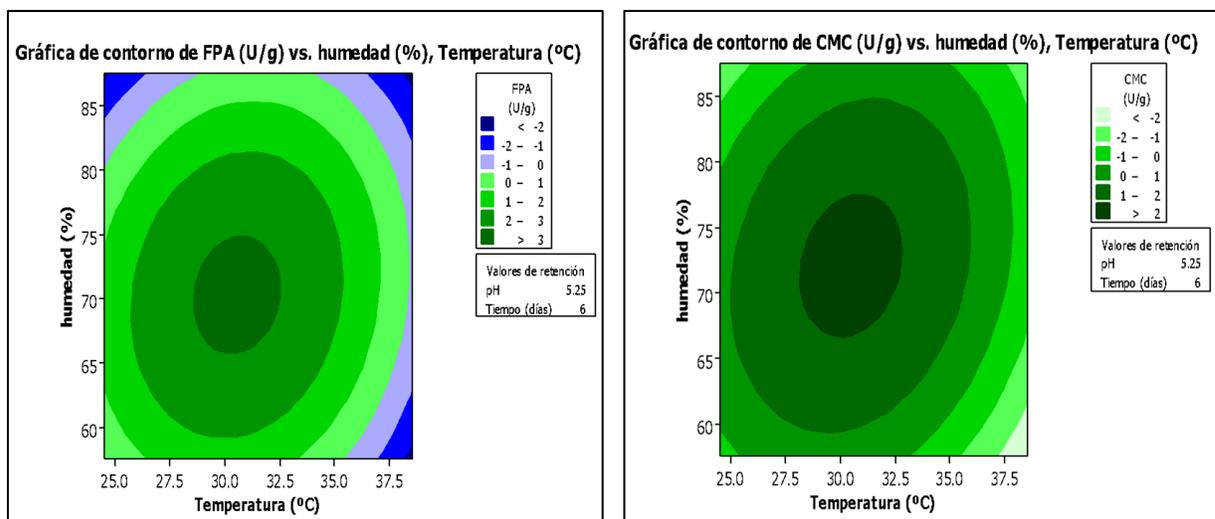
Ecuación 4-1 Modelo para Celulasas

$$\begin{aligned} \text{Celulasas} = & -125.694 + 2.70930A - 10.4464B + 1.55909C + 1.35130D - 0.0525243A^2 - \\ & 0.524085B^2 - 0.00988529 C^2 - 0.0368952D^2 - 0,00508AB + 0.0552238AC + 0.00553714AD - \\ & 0.0770422BC - 0.134988BD + 0.0109642CD \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Endoglucanasa} = & -76.6899 + 2.11198A + 2.69378B + 0.971596C + 1.49208D - 0.0419161A^2 \\ & - 0.358063B^2 - 0.00772863C^2 - 0.0281663D^2 + 0.0386690AB + 0.00567595AC \\ & - 0.0271987AD - 0.00299444BC - 2.89583E-04BD - 0.00267104CD \end{aligned}$$

Interacción entre las variables

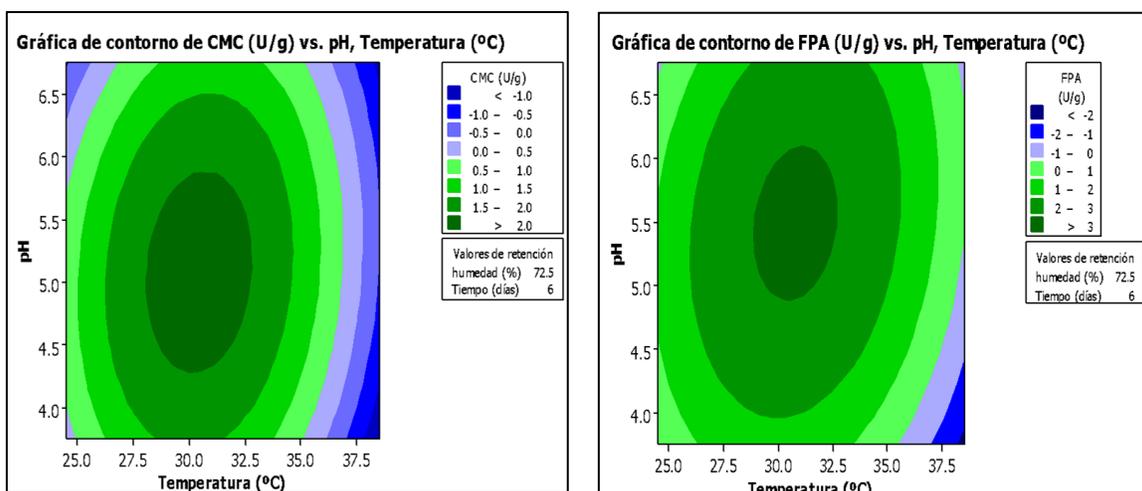
Los efectos sobre la producción de celulasa y endoglucanasas de la interacción entre variables fueron explicados mediante gráficos de contorno en los cuales se fijan los valores del punto central (pH 5.5, 6 días de fermentación, humedad 72.5%, temperatura 31.5°C).



Gráfica 4-3 Efecto de la interacción entre temperatura y humedad en (A) Celulasa y (B) endoglucanasa.

La Gráfica 4-3 de contorno muestra que, para la celulasa las altas temperaturas (mayor a 32°C) y humedad en puntos extremos (75>H<60) decrece la producción enzimática. En cuanto a la endoglucanasa a altas temperaturas y baja humedad la actividad disminuye significativamente para celulasa como para endoglucanasa. La Figura 3-3 muestra las interacciones mencionadas gráficamente. Los resultados coinciden con los obtenidos en temperatura y humedad por (Deswal, Khasa, & Kuhad, 2011; Hamidi-Esfahani, Shojaosadati, & Rinzema, 2004; Jha, Khare, & Gandhi, 1995; Marín, Anchez, & Artola, 2019; Marques et al., 2018; Zeng et al., 2010). El contenido de humedad del sustrato es un parámetro importante en la fermentación en estado sólido, los resultados obtenidos pueden ser explicados desde, la solubilidad de los nutrientes ya que, a baja humedad, esta se limita y dificulta la absorción efectiva de nutrientes por parte del hongo (Behera & Ray,

2016; Da et al., 2013; Wan Yoon, Nam Ang, Cheng Ngoh, & Seak May Chua, 2014). Mientras que, si el contenido de humedad es muy alto, las partículas de sustrato estarán rodeadas por una gruesa capa de agua. En consecuencia, las partículas tienden a pegarse, limitando la difusión del aire entre las partículas y su entorno (Deswal et al., 2011; Hamidi-Esfahani et al., 2004). Adicionalmente, al tener altos contenidos de humedad en FES se aumenta la probabilidad de contaminación, ya que se fomenta el crecimiento de otros microorganismos no favorables para el proceso (Yoon, Ang, Ngoh, & Chua, 2014). Finalmente, es importante tener en cuenta, que la condición óptima de humedad también depende del tipo de sustrato usado en la fermentación, ya que, con este también varía la porosidad y el área superficial, lo que modifica su capacidad de retención de agua y la eficiencia de difusión de aire. Por lo tanto, será necesario optimizar este parámetro cada vez que se cambie el sustrato a usar.



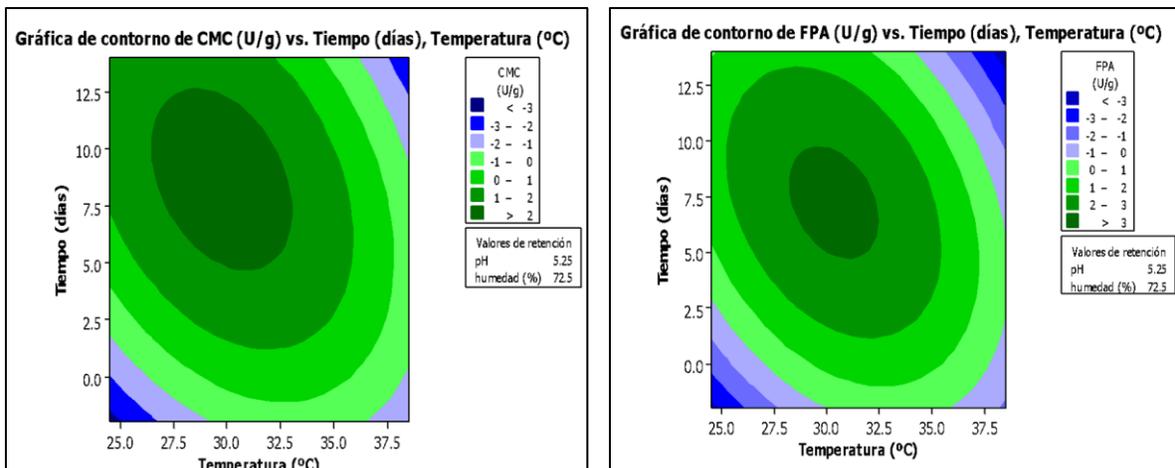
Gráfica 4-4 Efecto de la interacción entre pH y temperatura en (A) Celulasa y (B) endoglucanasa.

La Gráfica 4-4 sugiere que la producción de ambas enzimas a condiciones bajas de pH y altas temperaturas disminuye significativamente, la mayor producción se dio a pH 5.25 y temperatura 31.5°C, 3.22U/g, 2.28 U/g, para celulasa y endoglucanasa respectivamente. Los resultados son comparables con los obtenidos por (Deswal et al., 2011; Sánchez, 2009; Das et al., 2013; Dinis et al., 2009; Falkoski et al., 2013; Xiros et al., 2008b). En general el pH inicial del proceso de fermentación está alrededor de 5 unidades, este puede variar durante el proceso de fermentación, cambio que se debe a las actividades metabólicas de los hongos. Algunos estudios indican que el pH inicial disminuye luego de 4 días de fermentación y aumenta nuevamente al final de la fermentación (Khan, Ali,

Fakhru'l-Razi, & Alam, 2 007; Sánchez, 2009).

Efecto de la Temperatura y Tiempo de fermentación en la actividad enzimática

Esta interacción entre temperatura y tiempo indica que la producción de celulasa y endoglucanasa se incrementa con la disminución de la temperatura y mayor tiempo de fermentación. Sin embargo, a temperaturas mayores de 35°C la actividad enzimática fue menor. El punto óptimo validado de esta interacción fue 10 días de incubación y 28.8°C, en el cual se produjo 3.552 U/g de celulasas y 4.812U/g de endoglucanasa. (Gráfica 4-5). Probablemente, la temperatura de incubación, entre los factores físicos, es la de mayor efecto en la fermentación en estado sólido, las temperaturas más reportadas reportada para la producción de celulasas y endoglucanasas varía entre 25-34°C valores que concuerdan con los resultados obtenidos en este estudio (Ray & Behera, 2016; Singh nee' Nigam & Pandey, 2009; Singhanian, Sukumaran, Patel, Larroche, & Pandey, 2010; Soares et al., 2019). La temperatura, afecta directamente la germinación de esporas, el crecimiento del microorganismo, así como la producción de enzimas en FES (Farinas, Vitcosque, Fonseca, Neto, & Couri, 2011; Liu et al., 2011).

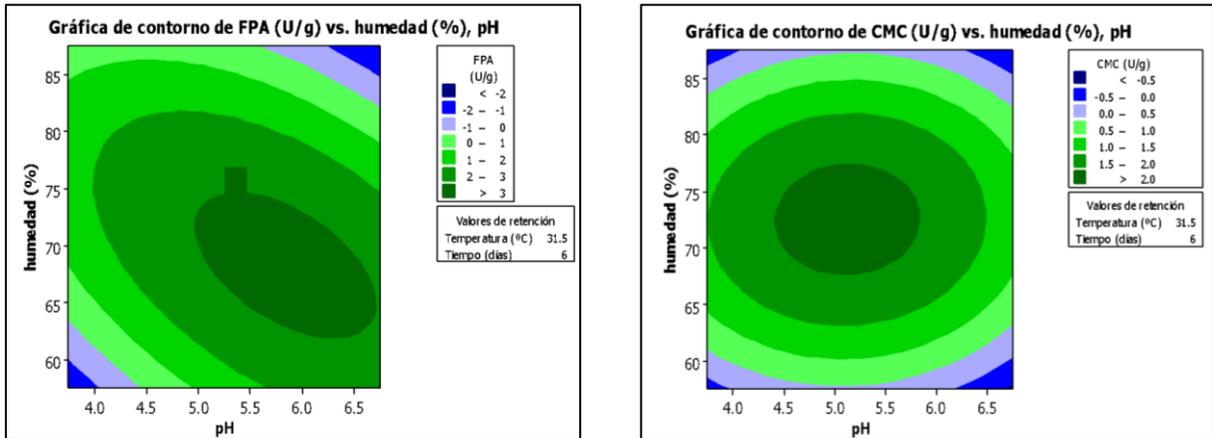


Gráfica 4-5 Efecto de la interacción tiempo y temperatura en (A) Celulasa y (B) endoglucanasa

Efecto del pH y Humedad en la actividad enzimática

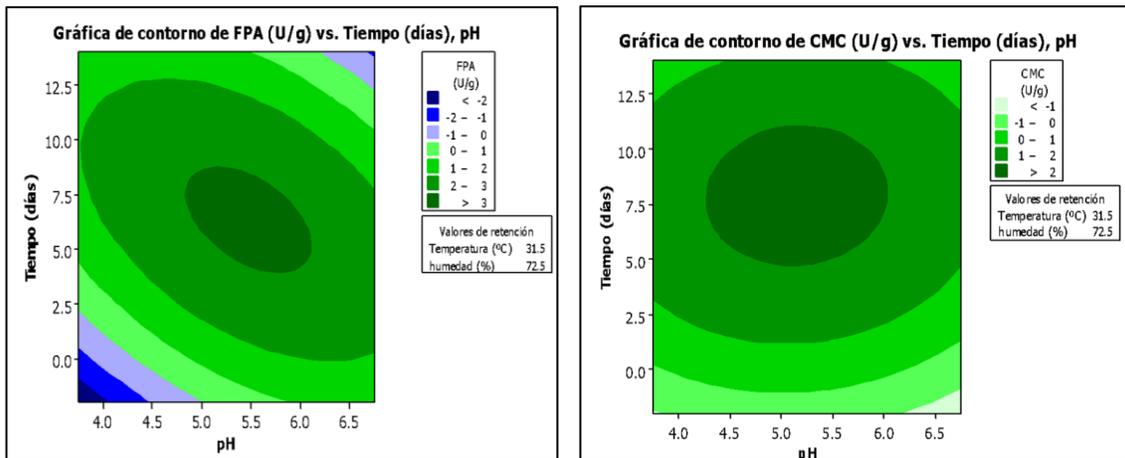
La mayor producción enzimática para esta interacción se dio a pH 5,25 y humedad 72,5%, 3.22U/g, 2.28 U/g para celulasa y endoglucanasa respectivamente. Luego de la validación del punto óptimo, la producción aumentó en un 29% para celulasa y 43% para endoglucanasa. La Figura 3-6 indica que bajo pH y a alta humedad la producción de

celulasa disminuye drásticamente, mientras que la endoglucanasa disminuye a pH cercanos a la neutralidad y humedad menor al 50%.



Gráfica 4-6 Efecto de la interacción humedad y pH en (A) Celulasa y (B) endoglucanasa.

Efecto del Tiempo vs. pH en la actividad enzimática



Gráfica 4-7 Efecto de la interacción pH, tiempo de fermentación en (A) Celulasa y (B) endoglucanasa.

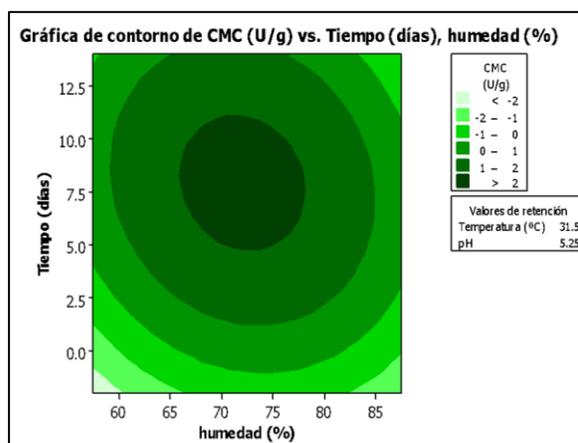
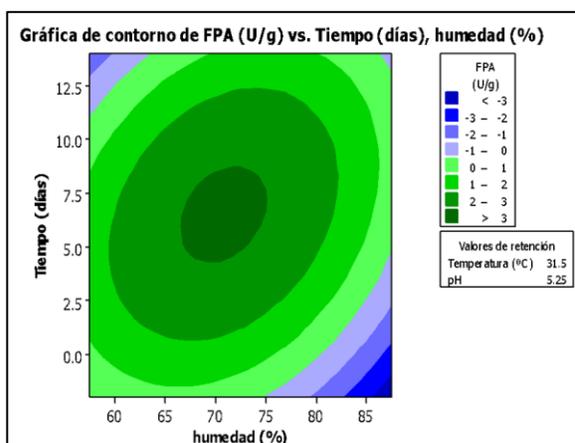
En las gráficas de contorno para la interacción entre tiempo y pH (Gráfica 4-7), explica que a cualquier pH inicial la producción enzimática es baja, pero a mayor tiempo de incubación para endoglucanasa. En cuanto a la celulasa, es posible decir que a pH iniciales bajos la producción es mínima, pero aumenta de forma proporcional con el tiempo de fermentación, mientras que a pH inicial cercano a la neutralidad la producción inicial es alta y puede disminuir después de 10 días de incubación. Lo anterior, puede ser explicado porque los

hongos filamentosos tienen un buen crecimiento en un amplio rango de pH 2-9 unidades, con un rango óptimo de 3,8 a 6,0 unidades (Hald, 2002; Xin & Geng, 2010), sin embargo, la producción enzimática es favorecida en pH bajos (4,5 - 6) y cuando el valor del pH se incrementa en más de 6 unidades, resulta en un decrecimiento de la actividad enzimática (S. S. Behera & Ray, 2016; Singh nee' Nigam & Pandey, 2009). Los valores óptimos obtenidos en este estudio concuerdan con los rangos de pH reportados en diferentes estudios (Imran et al., 2016; Saratale et al., 2017a; Xin & Geng, 2010).

Efecto del Tiempo y Humedad en la actividad enzimática

La

Gráfica 4-8 muestra la interacción de las variables tiempo y humedad. En esta se puede deducir que el tiempo de incubación y humedad para la máxima producción de las dos enzimas es mayor al 70% y cercana a los 10 días. Los primeros signos de crecimiento y producción de celulasas del hongo se dieron a partir del segundo día de proceso, como también lo reporta (Elisashvili et al., 2009; Kumaran, Sastry, & Vikineswary, 1997; Velázquez-Cedeño, Mata, & Savoie, 2002). Luego de 6 días de fermentación el hongo ya había colonizado la totalidad de la superficie del sustrato y la actividad máxima celulasas y endoglucanasas se da después de 10 días como lo registra (Elisashvili, Kachlishvili, & Penninckx, 2008; Kachlishvili, Penninckx, Tsiklauri, & Elisashvili, 2006), las actividades máximas podrían haber ocurrido cuando la actividad metabólica de los hongos y la concentración de azúcar soluble en agua estaban en su valor más alto y disminuye rápidamente luego de esta fase durante la formación del cuerpo fructífero (Wan Yoon et



al., 2014).

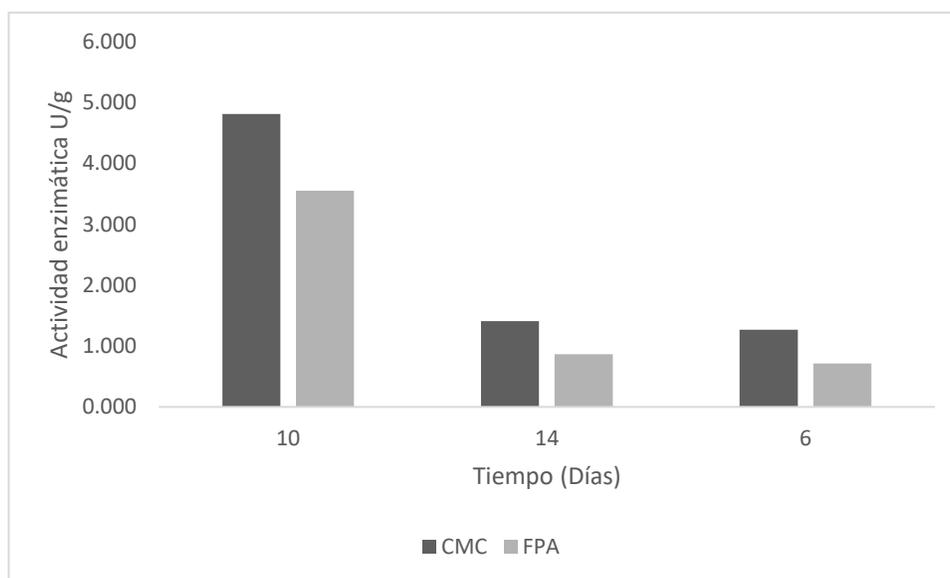
Gráfica 4-8 Efecto de la interacción tiempo de fermentación, humedad en (A) Celulasa y (B) endoglucanasa

Finalmente, se realizó la validación del modelo, buscando que la actividad enzimática de celulasa y endoglucanasa fuera la máxima. La optimización de respuestas ayuda a identificar los valores de configuración de las variables que, en combinación, maximizan una respuesta individual o un conjunto de respuestas. Se usa entonces la optimización de respuestas para determinar la proporción de cada una de las variables que produzca los mejores resultados y se valida en laboratorio. De acuerdo con el programa Minitab 2015®, se evaluaron 3 puntos: el óptimo (señalado en verde en la Tabla 3-4), un punto por encima y otro por debajo (Tabla 3-4). Los resultados obtenidos permiten validar que el modelo obtenido con la metodología de contorno logra predecir de manera adecuada los resultados esperados. La Gráfica 4-9 muestra gráficamente los resultados con una de las variables, tiempo y Actividad enzimática.

Tabla 3-4 Datos usados para la validación del punto óptimo

Orden Corrida	Pt Type	Bloques	Temp. (°C)	pH	Humedad (%)	Tiempo (Días)	FPA/g	Desv Est.	CMC/g	Desv Est.
1	0	1	28,8	5,02	71,74	10	3.552	0.060	4.812	0.078
2	1	1	38,5	6,75	87,5	14	0.864	0.074	1.408	0.092
3	-1	1	24,5	3,75	57,5	6	0.715	0.054	1.270	0.042

Desv Est: Desviación estándar



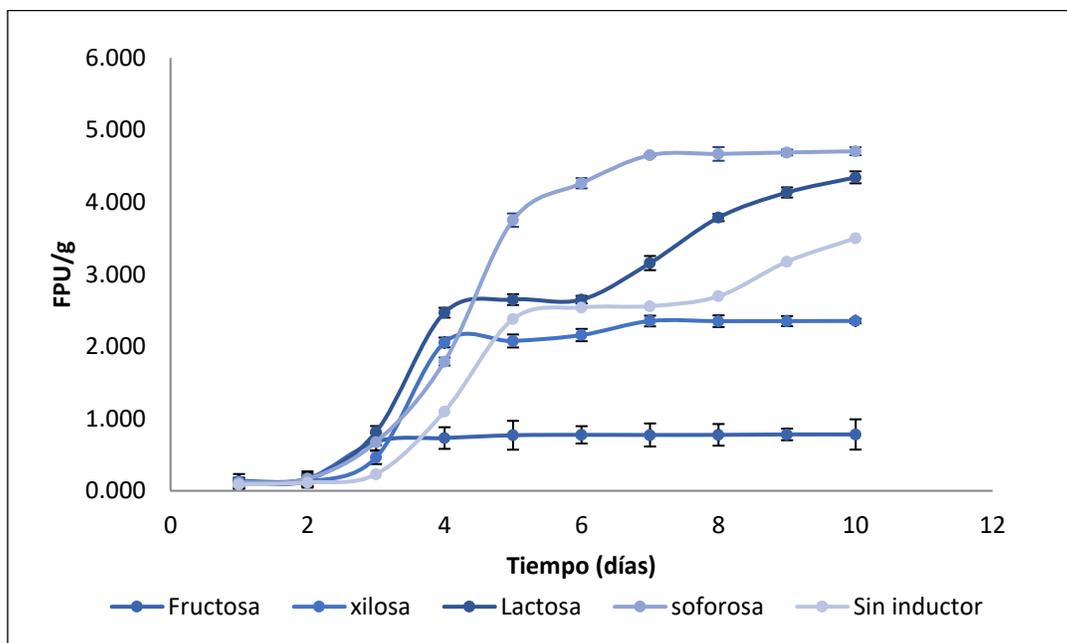
Gráfica 4-9 Validación de los puntos óptimos para la producción de celulasa y endoglucanasa.

3.3. Efecto de los inductores en la producción de celulasas y endoglucanasas.

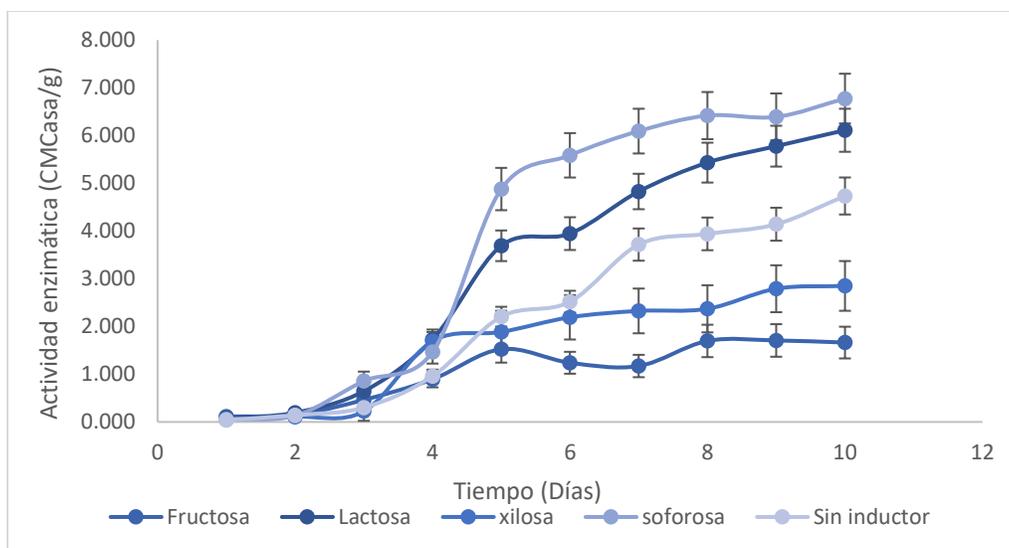
En las gráficas de actividad celulolíticas por *Fusarium sp.*, (Gráfica 4-10 y Gráfica 4-11), se observa que la adición de soforosa y lactosa mejoró significativamente las actividades de enzimas celulolíticas en comparación con el control, la mayor actividad celulasa y endoglucanasa fue inducida por la soforosa alcanzando actividades de 6.774U/g y 4.706U/g que significa 43.1% y 34.1% más de producción en CMCasa y celulasa respectivamente. Adicionalmente, es posible decir que desde el día 5 de fermentación la celulasa alcanzó 3.751U/g valor que supera en 6.9% la producción final sin inductor. De igual forma, la actividad enzimática endoglucanasa supera desde el quinto día (4.879U/g) la producción final en más del 3.1% comparada con el final del ensayo realizado sin la presencia de inductor, donde se produjo 4.734u/g y 3.510U/g para CMC y celulasa. Estos resultados concuerdan con los resultados, en estudios (Gutiérrez-Rojas et al., 2015; Rastegari, 2018; Ries et al., 2016; Siqueira et al., 2020) con hongos filamentosos diferentes a *Fusarium sp.* sin embargo, es necesario enfatizar que, **estas moléculas no parecen ser inductores universales, lo que implica que cada especie puede responder a una señal ligeramente diferente** (Patel, Singhania, & Pandey, 2017) y que es necesario seguir estudiando los mecanismos de inducción para cada especie. Por otro lado, la curva de la lactosa muestra que el incremento de la actividad es notable y que en el día 8 la actividad celulasa es superior al máximo obtenido sin el inductor; para el día 10 de incubación la actividad con la mezcla de lactosa al 1%P/V supera en un 23.7%, obteniendo una actividad máxima de 4.344U/g. En cuanto a la endoglucanasa, la lactosa también tuvo un efecto positivo sobre su producción, en el día 7 de fermentación sobrepasó la producción sin inductor en un 2.0% y al final de la incubación se produjo 6.111U/g de endoglucanasa, que representa un incremento del 29%. Otros estudios como (Ahamed & Vermette, 2008; Chellapandi & Jani, 2009; Fang et al., 2008; Ivanova, Bååth, Seiboth, & Kubicek, 2013), también encontraron que la lactosa funciona como inductor de la celulasa y endoglucanasa, aunque el mecanismo de inducción de lactosa no se entiende completamente; se sabe que la falta de actividad de la galactosa mutarotasa es crucial para la inducción de la celulasa fúngica (Anil Kumar Patel et al., 2017).

Fructosa y xilosa, también fueron evaluados como inductores, sin embargo, estos compuestos tuvieron el efecto contrario, que dio como resultado la represión de la actividad enzimática producida. Esto puede ser explicado, ya que estos dos compuestos son similares a la glucosa, fácil de metabolizar y energéticamente favorable para el microorganismo, pero conduce a la

represión de otros genes necesarios para el uso de otras fuentes de carbono. El mecanismo de control es la represión de la glucosa (catabolito de carbono) (Adnan et al., 2017; Ries et al., 2016). Con la adición de fructosa, la actividad enzimática celulasa se redujo en más del 70%, mientras que la endoglucanasa se redujo en más del 60%, estos resultados son comparables con los obtenidos por (Maíra Nicolau De Almeida et al., 2011; Jun, Kieselbach, & Jönsson, 2011) que muestran que la actividad enzimática celulolítica se disminuye significativamente en presencia de fructosa. El efecto de la xilosa en la producción enzimática se vio representada en una reducción del 32.9% en celulasa y 39.8% en endoglucanasa. Los resultados reportados en la literatura para este azúcar son más variables que los anteriores, (Ike & Tokuyasu, 2018; Karthikeyan P, 2018) indica que la producción enzimática de celulasa incrementa con la presencia de fructosa, mientras que los resultados son consistentes con (H, Shoukry, H Hassan, & El-Shall, 2011) en los cuales la fructosa reprime la producción enzimática.



Gráfica 4-10 Efecto de inductores en la producción de celulasa (FPU/g).

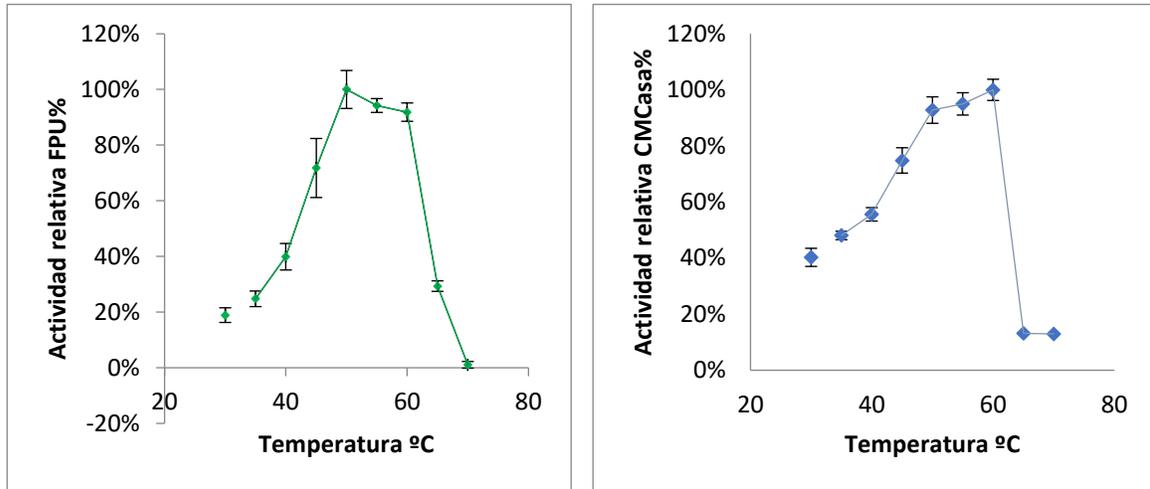


Gráfica 4-11 Efecto de inductores en la producción de endoglucanasa (CMCasa).

3.4. Caracterización fisicoquímica del extracto enzimático.

3.4.1. Efectos de la temperatura en la actividad enzimática FPA y Endoglucanasa.

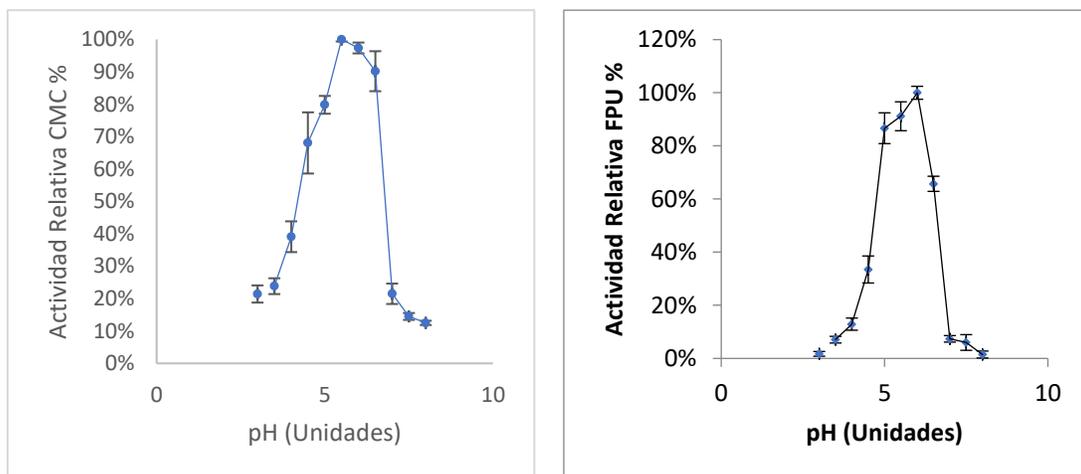
La Gráfica 4-12 muestra que la actividad relativa de la endoglucanasa (CMCasa) se mantuvo mayor al 80% entre 45°C y 60°C; la máxima se alcanzó a 60°C. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por (De Castro, De Albuquerque De Carvalho, Leite, & Pereira, 2010; Qin et al., 2010). El perfil de actividad de temperatura de endoglucanasa, de *Fusarium sp*, se mantuvo mayor al 80% entre 50°C y 60°C, siendo la máxima actividad a 60°C, después de este rango la actividad enzimática decrece significativamente a una actividad relativa del 13% a 65°C y nula actividad a 70°C. Los resultados anteriores, mostraron características similares a las reportadas para otras especies de hongos celulolíticos (De Castro et al., 2010).



Gráfica 4-12 Efecto de la temperatura en la actividad enzimática (A) Celulasa y (B) endoglucanasa.

5.3.2. Efectos del pH en la actividad enzimática FPA y Endoglucanasa.

La Gráfica 4-13 muestra la actividad de endoglucanasa relativa a diferentes valores de pH. Cuando el extracto enzimático se incubó en un rango de pH entre 5.0 y 6.5, la actividad relativa se mantuvo mayor al 80%. Sin embargo, a pH menores que 5,0 y mayores que 6,5 unidades la actividad disminuyó a pH 8 solo alcanzó el 8% de la actividad relativa. En cuanto a la celulasa, la mayor actividad se alcanzó a pH 6 y se mantuvo mayor al 80% entre 5 y 6 unidades. Este perfil de pH indica que esta endoglucanasa purificada podría ser adecuada en el proceso de sacarificación para la producción de bioetanol u otros subproductos de interés industrial, y son similares a los obtenidos por (Boggione, Allasia, Aguilar, & Farruggia, 2020; Gauna, Larran, Perotti, Feldman, & Permingeat, 2018; Narra et al., 2014) para este tipo de procesos, se requiere un valor de pH cercano a 5.00 unidades.



Gráfica 4-13 Efecto del pH en la actividad enzimática (A) Celulasa y (B) endoglucanasa.

5. Conclusiones

- 5.1.1. La máxima actividad enzimática obtenida para celulasas (3.552 U/g) y endoglucanasas (4.812U/g), fue obtenida con el medio CMC, seguido de CMC-Na, CMC+Ara, CMC+Xi y Celulosa, respectivamente.
- 5.1.2. Las condiciones para la producción óptima de ambas enzimas son 10 días de fermentación a 71.7% de humedad, pH 5 y temperatura de 28.8 °C.
- 5.1.3. La actividad enzimática relativa para celulasa se mantuvo superior al 80% a pH 6.0. La endoglucanasa por su parte, tuvo una actividad enzimática mayor al 80% a pH 5.5.
- 5.1.4. La sacarosa indujo la producción celulolítica en 34% para celulasa (4.706U/g), mientras que para endoglucanasa el aumento fue de más del 40% (6.774U/g) para celulasa y endoglucanasa respectivamente.
- 5.1.5. La lactosa indujo la producción en un 23.8% la celulasa y 29% la endoglucanasa.
- 5.1.6. La Xilosa reprimió la actividad enzimática celulasa y endoglucanasa en 32.9% y 39.8% respectivamente.
- 5.1.7. La Fructosa tiene un efecto negativo en la producción enzimática, reduciendo en un 70% la actividad celulasa y un 60% en la endoglucanasa.
- 5.1.8. La actividad enzimática relativa celulasa fue mayor al 80% a temperaturas entre 45°C y 55°C, con máxima actividad a 50°C. La endoglucanasa por su parte, tuvo una actividad mayor al 80% entre 50°C y 60°C y la máxima actividad en 60°C.

6. Recomendaciones

- Evaluar otros inductores como los soforolípidos, celobiosa y otros oligosacáridos.
- Medir la producción de enzimas que hacen parte del complejo enzimático (Exoglucanasa, betaglucosidasa).
- Optimizar el medio de producción de celulasa en factores como la fuente de nitrógeno, tensoactivos, iones, que podrían incrementar la producción enzimática.
- Caracterizar molecularmente el extracto enzimático obtenido.
- Evaluar la ingeniería genética como una posibilidad para mejorar la producción enzimática de *Fusarium sp.*

7. Referencias

- 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(3), 399–407. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.11.030>
- Behera, S. S., & Ray, R. C. (2016). Solid state fermentation for production of microbial cellulases: Recent advances and improvement strategies. *International Journal of Biological Macromolecules*, 86, 656–669. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.10.090>
- Chambergó, F. S., & Valencia, E. Y. (2016). Fungal biodiversity to biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7305-2>
- Chellapandi, P., & Jani, A. A. (2009). Enhanced endoglucanase production by soil isolates of *Fusarium* sp. and *Aspergillus* sp. through submerged fermentation process. *Turkish Journal of Biochemistry*, 34(4), 209–214.
- Da, P., Delabona, S., Donizete, R., Buzon Pirota, P., Codima, C. A., Tremacoldi, R., ... Sanchez Farinas, C. (2013). Effect of initial moisture content on two Amazon rainforest *Aspergillus* strains cultivated on agro-industrial residues: Biomass-degrading enzymes production and characterization. *Industrial Crops and Products*, 42, 236–242. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.05.035>
- De Almeida, M. N., Guimarães, V. M., Bischoff, K. M., Falkoski, D. L., Pereira, O. L., Gonçalves, D. S. P. O., & de Rezende, S. T. (2011). Cellulases and hemicellulases from endophytic *acremonium* species and its application on sugarcane bagasse hydrolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 165(2), 594–610. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9278-z>
- De Almeida, M. N., Guimarães, V. M., Falkoski, D. L., Paes, G. B. T., Ribeiro, J. I., Visser, E. M., de Rezende, S. T. (2014). Optimization of endoglucanase and xylanase activities from *Fusarium verticillioides* for simultaneous saccharification and fermentation of sugarcane bagasse. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(3), 1332–1346. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0572-9>
- de Cassia Pereira, J., Paganini Marques, N., Rodrigues, A., Brito de Oliveira, T., Boscolo, M., da Silva, R., ... Bocchini Martins, D. A. (2015). Thermophilic fungi as new sources

for production of cellulases and xylanases with potential use in sugarcane bagasse saccharification. *Journal of Applied Microbiology*, 118(4), 928–939. <https://doi.org/10.1111/jam.12757>

- Deswal, D., Khasa, Y. P., & Kuhad, R. C. (2011). Optimization of cellulase production by a brown rot fungus *Fomitopsis* sp. RCK2010 under solid state fermentation. *Bioresource Technology*, 102(10), 6065–6072. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.032>
- Elisashvili, V., Kachlishvili, E., & Penninckx, M. (2008). Effect of growth substrate, method of fermentation, and nitrogen source on lignocellulose-degrading enzymes production by white-rot basidiomycetes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35(11), 1531–1538. <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0454-2>
- Elisashvili, V., Kachlishvili, E., Tsiklauri, N., Metreveli, E., Khardziani, T., & Agathos, S. N. (2009). Lignocellulose-degrading enzyme production by white-rot Basidiomycetes isolated from the forests of Georgia. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(2), 331–339. <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9897-x>
- Fang, X., Yano, S., Inoue, H., & Sawayama, S. (2008). Lactose enhances cellulase production by the filamentous fungus *Acremonium cellulolyticus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 106(2), 115–120. <https://doi.org/10.1263/jbb.106.115>
- Gutiérrez-Rojas, I., Moreno-Sarmiento, N., & Montoya, D. (2015). Mecanismos y regulación de la hidrólisis enzimática de celulosa en hongos filamentosos: casos clásicos y nuevos modelos. *Revista Iberoamericana de Micología*. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2013.10.009>
- Hamidi-Esfahani, Z., Shojaosadati, S. A., & Rinzema, A. (2004). Modelling of simultaneous effect of moisture and temperature on *A. niger* growth in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 21(3), 265–272. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2004.07.007>
- Jha, K., Khare, S. K., & Gandhi, A. P. (1995). Solid-state fermentation of soyhull for the production of cellulase. *Bioresource Technology*, 54(3), 321–322. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(95\)00154-9](https://doi.org/10.1016/0960-8524(95)00154-9)
- Juturu, V., & Wu, J. C. (2014). Microbial cellulases: Engineering, production and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 33, 188–203. Retrieved from <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.unal.edu.co/science/article/pii/S1364032114000999>

- Kachlishvili, E., Penninckx, M. J., Tsiklauri, N., & Elisashvili, V. (2006). Effect of nitrogen source on lignocellulolytic enzyme production by white-rot basidiomycetes under solid-state cultivation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(4), 391–397. <https://doi.org/10.1007/s11274-005-9046-8>
- Khan, M. M. H., Ali, S., Fakhru'l-Razi, A., & Alam, M. Z. (2007). Use of fungi for the bioconversion of rice straw into cellulase enzyme. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 42(4), 381–386. <https://doi.org/10.1080/03601230701312647>
- Kilikian, B. V., Afonso, L. C., Souza, T. F. C., Ferreira, R. G., & Pinheiro, I. R. (n.d.). Filamentous fungi and media for cellulase production in solid state cultures. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4059312/pdf/bjm-45-279.pdf>
- King, B. C., Donnelly, M. K., Bergstrom, G. C., Walker, L. P., & Gibson, D. M. (2009). An optimized microplate assay system for quantitative evaluation of plant cell wall-degrading enzyme activity of fungal culture extracts. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(4), 1033–1044. <https://doi.org/10.1002/bit.22151>
- Kobakhidze, A., Asatiani, M., Kachlishvili, E., & Elisashvili, V. (2016). Induction and catabolite repression of cellulase and xylanase synthesis in the selected white-rot basidiomycetes. *Annals of Agrarian Science*. <https://doi.org/10.1016/j.aasci.2016.07.001>
- Kumar Bharti, A., Kumar, A., Kumar, A., & Dutt, D. (2018). *Exploitation of Parthenium hysterophorous biomass as low-cost substrate for cellulase and xylanase production under solid-state fermentation using Talaromyces stipitatus MTCC 12687*. <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2018.01.003>
- Kumaran, S., Sastry, C. A., & Vikineswary, S. (1997). Laccase, cellulase and xylanase activities during growth of Pleurotus sajor-caju on sago hampas. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 13(1), 43–49. <https://doi.org/10.1007/BF02770806>
- Kobakhidze, A., Asatiani, M., Kachlishvili, E., & Elisashvili, V. (2016). Induction and catabolite repression of cellulase and xylanase synthesis in the selected white-rot basidiomycetes. *Annals of Agrarian Science*. <https://doi.org/10.1016/j.aasci.2016.07.001>
- Kumar Bharti, A., Kumar, A., Kumar, A., & Dutt, D. (2018). *Exploitation of Parthenium hysterophorous biomass as low-cost substrate for cellulase and xylanase production under solid-state fermentation using Talaromyces stipitatus MTCC 12687*. <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2018.01.003>

- Kumaran, S., Sastry, C. A., & Vikineswary, S. (1997). Laccase, cellulase and xylanase activities during growth of *Pleurotus sajor-caju* on sago hampas. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 13(1), 43–49. <https://doi.org/10.1007/BF02770806>
- Li, Y., Liu, C., Bai, F., & Zhao, X. (2016). Overproduction of cellulase by *Trichoderma reesei* RUT C30 through batch-feeding of synthesized low-cost sugar mixture. *Bioresource Technology*, 216, 503–510. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.05.108>
- Lee, C. K., Darah, I., & Ibrahim, C. O. (2011). Production and Optimization of Cellulase Enzyme Using *Aspergillus niger* USM AI 1 and Comparison with *Trichoderma reesei* via Solid State Fermentation System. *Biotechnology Research International*, 2011, 1–6. <https://doi.org/10.4061/2011/658493>
- Liu, X., & Kokare, C. (2017). Chapter 11 – Microbial Enzymes of Use in Industry. In *Biotechnology of Microbial Enzymes* (pp. 267–298). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803725-6.00011-X>
- Marín, M., Anchez, A. S., & Artola, A. (2019). *Production and recovery of cellulases through solid-state fermentation of selected lignocellulosic wastes.* <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.10.264>
- Marques, N. P., De Cassia Pereira, J., Gomes, E., Da Silva, R., Araújo, A. R., Ferreira, H., ... Bocchini, D. A. (2018). *Cellulases and xylanases production by endophytic fungi by solid state fermentation using lignocellulosic substrates and enzymatic saccharification of pretreated sugarcane bagasse T to the production of cellulases and xylanases and their enzymatic extracts have potential for application in pre-treated sugarcane bagasse saccharification processes.* <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.05.022>
- Nazir, A., Soni, R., Saini, H. S., Kaur, A., & Chadha, B. S. (2010). Profiling differential expression of cellulases and metabolite footprints in *aspergillus terreus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8775-9>
- Obruca, S., Marova, I., Matouskova, P., Haronikova, A., & Lichnova, A. (2012). Production of lignocellulose-degrading enzymes employing *Fusarium solani* F-552. *Folia Microbiologica*, 57(3), 221–227. <https://doi.org/10.1007/s12223-012-0098-5>
- Panagiotou, G., Kekos, D., Macris, B. J., & Christakopoulos, P. (2003). Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* grown on corn stover in solid state fermentation. *Industrial Crops and Products*, 18(1), 37–45. [https://doi.org/10.1016/S0926-6690\(03\)00018-9](https://doi.org/10.1016/S0926-6690(03)00018-9)

- Patel, A. K., Singhanian, R. R., & Pandey, A. (2017). Chapter 2 – Production, Purification, and Application of Microbial Enzymes. In *Biotechnology of Microbial Enzymes* (pp. 13–41). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803725-6.00002-9>
- Ray, R. C., & Behera, S. S. (2016). Chapter 3. Solid State Fermentation for Production of Microbial Cellulases. *Biotechnology of Microbial Enzymes*, 43–80. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803725-6.00003-0>
- Ray, R. C., & Behera, S. S. (2017). Chapter 3 – Solid State Fermentation for Production of Microbial Cellulases. In *Biotechnology of Microbial Enzymes* (pp. 43–79). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803725-6.00003-0>
- Rastegari, A. A. (2018). Molecular Mechanism of Cellulase Production Systems in *Penicillium*. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* (pp. 153–166). <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-63501-3.00008-9>
- Ries, L. N. A., Beattie, S. R., Espeso, E. A., Cramer, R. A., & Goldman, G. H. (2016). Diverse regulation of the CreA carbon catabolite repressor in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 203(1), 335–352. <https://doi.org/10.1534/genetics.116.187872>
- Sánchez, C. (2009, March 1). Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*, Vol. 27, pp. 185–194. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.11.001>
- Shahriarinnour, M., Noor, M., Wahab, A., Mohamad, R., Mustafa, S., & Ariff, A. B. (2011). Effect of medium composition and cultural condition on cellulase production by *Aspergillus terreus*. *African Journal of Biotechnology*, 10(38), 7459–7467. <https://doi.org/10.5897/AJB11.199>
- Singh Nigam, P., & Pandey, A. (2009). Solid-State Fermentation Technology for Bioconversion of Biomass and Agricultural Residues. In *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation* (pp. 197–221). Dordrecht: Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9942-7_10
- Singhanian, R. R., Kumar Patel, A., Soccol, C. R., & Pandey, A. (2009). Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 44, 13–18. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.10.019>
- Singhanian, R. R., Sukumaran, R. K., 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 Microbial Technology*, 46, 541–549. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.03.010>

- Siqueira, J. G. W., Rodrigues, C., Vandenberghe, L. P. de S., Woiciechowski, A. L., & Soccol, C. R. (2020). Current advances in on-site cellulase production and application on lignocellulosic biomass conversion to biofuels: A review. *Biomass and Bioenergy*. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.105419>
- Thomas, L., Larroche, C., & Pandey, A. (2013). Current developments in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 81, 146–161. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.10.013>
- Trivedi, L. S., & Rao, K. K. (1981). Production of cellulolytic enzymes by *Fusarium* species. *Biotechnology Letters*, 3(6), 281–284. <https://doi.org/10.1007/BF00127395>
- Van Dyk, J. S., & Pletschke, B. I. (2012). A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes--factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnology Advances*, 30(6), 1458–1480. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.03.002>
- Velázquez-Cedeño, M. A., Mata, G., & Savoie, J. M. (2002). Waste-reducing cultivation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus pulmonarius* on coffee pulp: Changes in the production of some lignocellulolytic enzymes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18(3), 201–207. <https://doi.org/10.1023/A:1014999616381>
- Wan Yoon, L., Nam Ang, T., Cheng Ngho, G., & Seak May Chua, A. (2014). Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.05.01>
- Behera, S. S., & Ray, R. C. (2016). Solid state fermentation for production of microbial cellulases: Recent advances and improvement strategies. *International Journal of Biological Macromolecules*, 86, 656–669. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.10.090>
- Yoon, L. W., Ang, T. N., Ngho, G. C., & Chua, A. S. M. (2014). Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production. *Biomass and Bioenergy*, 67, 319–338. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMBIOE.2014.05.013>
- Zeng, G., Yu, M., Chen, Y., Huang, D., Zhang, J., Huang, H., ... Yu, Z. (2010). Effects of inoculation with *Phanerochaete chrysosporium* at various time points on enzyme activities during agricultural waste composting. *Bioresource Technology*, 101(1), 222–227. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.08.013>.