

Producción de celulasas por *Aspergillus niger* a partir de bagazo de caña de azúcar en biorreactor aireado

Luis A. Llenque – Díaz¹; Miguel Muñoz Ríos¹; Eddy Espejo Vargas²; Andy Moreno Ruiz³

¹Departamento Académico de Microbiología y Parasitología, Facultad Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo – Perú; lulllediaz@yahoo.com; miguel_mr8@hotmail.com

²Biologo – Microbiólogo, estudiante de Post-grado de la Universidad Nacional de Trujillo; ledyevar@yahoo.es

³ Biólogo – Microbiólogo; nelver_702@hotmail.com

Recibido: 02-06-2015

Aceptado: 09-09-2015

RESUMEN

Se investigó la producción de celulasas por *Aspergillus niger* en un biorreactor de lecho empacado en condiciones de laboratorio, con el objetivo de aprovechar el bagazo, residuo de la caña de azúcar, como soporte y sustrato. En este sentido, se recolectó, lavó y trozó el bagazo de caña de azúcar, luego se añadió la solución de NaOH 1,0 M y se calentó por 30 minutos a ebullición constante, se enjuagó con agua destilada estéril por cinco veces, se escurrió en papel secante y se llevó a estufa a 60°C por 10 horas. Se colocó 200g de bagazo tratado en el biorreactor, se inoculó 50 mL de la suspensión de esporas estandarizado, se humedeció con el caldo de cultivo, se aplicó aireación constante, e incubó a temperatura ambiental de 25 °C. Se determinó la cantidad de celulasas excretadas, cada 02 días de incubación durante 20 días. Se pesó 20 g de bagazo incubado, fue lavado con 50 mL de buffer acetato pH 6,0 se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos; y se obtuvo el sobrenadante donde se midió las Unidades Enzimáticas de celulasas; dosificando la cantidad de glucosa liberada mediante el método de glucosa enzimática. Se logró producir celulasas desde el segundo día de incubación y se obtuvo una producción final de 0,025 UE/mL a los 20 días de incubación, con tendencia a ir incrementando, lo que permitió concluir que si fue posible producir celulasas utilizando el bagazo de caña de azúcar tratado, a pH 6,0 en un biorreactor aireado.

Palabras clave: Producción de celulasas, *Aspergillus niger*, Bagazo-caña de azúcar, Biorreactor

ABSTRACT

It investigated the production of cellulases by *Aspergillus niger* in a bed packaged bioreactor under laboratory conditions, in order to take advantage of the bagasse, the residue of sugar cane, as substrate and support. In this sense, was collected, washed and troop bagasse of sugar cane, then 1.0 M NaOH solution was added and was heated for 30 minutes to a steady boil, was rinsed with distilled water sterile for five times, drained on blotter and took stove at 60 ° C for 10 hours. Then placed 200 g of bagasse treated in the bioreactor, 50 mL of the spore suspension standardized inoculated, and moistened with broth culture, applied constant aeration, and incubated at ambient temperature of 25 ° C. It determined the amount of cellulases excreted, every 2 days of incubation for 20 days. It weighed 20 g of incubated bagasse, was washed with 50 mL of buffer acetate pH 6.0 and centrifuged at 3000 rpm for 15 minutes; and obtained the supernatant was measured where the enzyme cellulase units; dosing the amount of glucose released by the enzyme glucose method. Managed to produce cellulase from the second day of incubation and obtained a final production of 0,025 EU/mL to 20 days of incubation, with a tendency to be increasing, which allowed conclude that if it was possible to produce cellulase using bagasse of sugar cane treated at pH 6,0 in an aerated bioreactor.

Key words: Production of cellulases, *Aspergillus niger*, Sugar cane bagasse, Bioreactor

I. INTRODUCCIÓN

La alta carga de residuos lignocelulósicos en los efluentes industriales de papeleras, procesadoras de vegetales, entre otras, representa un gran potencial contaminante por la significativa materia orgánica que incrementa los valores de la demanda bioquímica de oxígeno, superando excesivamente los límites permisibles para dichos efluentes. La biotecnología presenta algunas alternativas para el tratamiento de estos contaminantes como el tratamiento enzimático o la bioconversión en compuestos que generen un valor agregado reduciendo su potencial contaminante. Por lo que la búsqueda y producción de enzimas destinadas a la hidrólisis y bioconversión de los desechos lignocelulósicos constituye el inicio de un proceso enzimático para el control de estos contaminantes (Alcarraz et al., 2008:3).

La celulosa, principal componente de la pared celular de la mayor parte de las plantas, está constituida por moles de D-glucosa unidas por enlaces β -1-4 glucosídicos y se encuentra en forma abundante en la biosfera, se caracteriza por ser resistente a la fermentación, pero existen microorganismos celulíticos en la naturaleza que poseen enzimas como: las celobiohidrolasas y las endoglucanasas que permiten su degradación (Mosquera y Rubio, 2000:12). Siendo los residuos agrícolas muy ricos en celulosa, hemicelulosa y lignina; y, teniendo en cuenta su estructura, pueden usarse como sustratos para el cultivo de hongos filamentosos capaces de producir enzimas extracelulares con actividades celulasas, con importantes aplicaciones industriales, como la hidrólisis de biomasa lignocelulósica para la producción de etanol (Rodríguez y Piñeros, 2007: 37).

A lo largo de la historia, se han venido empleando las enzimas para usos industriales, lo que ha desarrollado la biotecnología como herramienta para que a través de microorganismo se obtengan metabolitos de interés tanto industrial como ambiental; una de estas enzimas comúnmente utilizadas es la celulasa, obtenida mediante diferentes microorganismos los cuales han sido utilizados en diferentes tipos de sustratos (Ramírez y Urrego, 1994:1). La demanda creciente de los preparados enzimáticos por su efectividad en los procesos de extracción de productos alimenticios, un aspecto crucial el cual no ha sido explorado a profundidad pero que; sin embargo, es imprescindible para que tenga un impacto mayor el uso de enzimas en la biotecnología, es la economía de la extracción acuosa asistida con enzima comparado con la extracción con solventes. En este contexto, algunos autores (Ovando-Chacón y Waliszewski (2005: 113) resaltan los resultados benéficos de la potencialidad de los preparados enzimáticos sobre la extracción de compuestos para la industria dando la pauta para que en futuras investigaciones y a corto plazo, el uso de preparados enzimáticos resulte ser una alternativa promisoría en la extracción de productos farmacéuticos y de metabolitos a partir de materias primas vegetales.

Las enzimas celulasas son producidas por una variedad de bacterias y hongos aeróbicos o anaeróbicos, mesófilos o termófilos. Sin embargo, sólo algunos de ellos producen enzima celulasa extracelular capaz de hidrolizar la celulosa (Ljungdahl y Eriksson 1985:251; Marsden y Gray, 1986:236; Bhat y Bhat 1997:584; Dongowski et al., 2002:108). Tienen aplicaciones importantes en la industria textil, en la industria de producción de detergentes, en la producción de alimentos y en la formulación de medicamentos (Dustet, et al., 2000:14), y las celulasas comerciales provienen de especies de *Trichoderma* y *Aspergillus* (Bhat, 2000: 363); sin embargo, la cantidad de enzima producida por estos microorganismos es todavía motivo de múltiples investigaciones, puesto que existen múltiples factores involucrados, entre ellos el medio de cultivo, que juega un rol determinante al momento de la expresión de la enzima, el tipo de sustrato, temperatura, pH, etc.

Las celulasas constituyen un sistema enzimático de cuatro enzimas: la endo β -glucanasa, que hidroliza randomizadamente celulosa a glucooligosacáridos; la exo β -glucanasa, que libera glucosa de la celulosa; la celobiohidrolasa, que libera celobiosa de la celulosa cristalina; y la β -glucosidasa (Szijártó, et al., 2004: 117). Asimismo, las xilanasas constituyen también un complejo enzimático responsable de la hidrólisis de xilano, siendo las principales enzimas involucradas la endo-1,4- β -xilanasas, que rompe los enlaces glucosídicos de la cadena principal de xilano produciendo oligómeros de β -D xilopiranosil, y la β -xilosidasa que hidrolizan xilobiosa y xilanoligosacáridos (Polizeli, et al., 2005: 579).

Las endoglucanasas, es una de las celulasas que actúa de forma aleatoria sobre los enlaces β (1,4)-glucosídico, presentes en las regiones amorfas de la celulosa o sobre la superficie de las microfibrillas, lo cual provoca la disminución del grado de polimerización de la celulosa y la creación de nuevos

extremos no reductores, que sirven de sustrato para la posterior acción de exoglucanasas e incremento de azúcares reductores como; glucosa, celobiosa y celotriosa (Ovando-Chacón y Waliszewski, 2005: 125). Los sustratos comúnmente utilizados para el estudio de las endoglucanasas son carboximetilcelulosa y celulosa amorfa tratada con H_3PO_4 o álcali, su acción se caracteriza por la disminución de la viscosidad como consecuencia de los clivajes intermoleculares; mientras que, la celulosa cristalina como las fibras de algodón es atacada de manera lenta por esta enzima (Hernández et al., 1999:4).

Según Alcarraz, et al. (2008: 1-2), utilizando el bagazo de caña seco, material fibroso, heterogéneo en cuanto a su composición granulométrica y estructural, que presenta relativamente baja densidad y un alto contenido de humedad, en las condiciones en que se obtiene del proceso de molienda de la caña, con esporas de *A. niger* inmovilizadas en agar y fermentadores de columna tipo sistema batch, agitados por inyección de aire filtrado a 100 cc/min e incubado a 25 °C, por cinco días en oscuridad, demostraron que el medio de cultivo compuesto por bagazo de caña 4%, sulfato de amonio 0,1%, sulfato de magnesio al 0,5% y bifosfato de potasio al 0,2% indujo una mayor actividad celulolítica a los tres días de fermentación.

Izarra, et al.(2010:141), investigando sobre la influencia de la concentración de inóculo en la producción de celulasa y xilanasa por *A. niger* ATCC 10864 en el medio de cultivo cuya composición por litro fue: KH_2PO_4 , 2g; $(NH_4)_2SO_4$, 1,4g; urea, 0,3 g; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0,3 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,3 g; peptona, 1,0 g; Tween 80, 2,0 ml; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 5,0 mg; $MnSO_4 \cdot 2H_2O$, 1,6 mg; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 1,4 mg; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 2,0 mg; Lactosa, 10,0 g. y un pH final del medio de 5,5; donde cada matraz de 250 mL contenía 40 mL de medio con 1,2 mL de suspensión de esporas (3,0%, v/v), e incubado a 28 °C en un baño agitado a 175 rpm; reportaron que la productividad volumétrica de celulasa fue mayor para una concentración de $1,0 \times 10^8$ esporas/mL.

Dustet, et al. (2000: 32), experimentaron con *Aspergillus niger* cepa J-1 del cepario CIPRO en bagazo de caña tratado con hidróxido de calcio y en fermentación en estado sólido, como técnica de cultivo para producir las enzimas, demostraron la estabilidad de las actividades enzimáticas de celulasas hasta en un 100 % de la actividad inicial durante 24 horas a 30 °C conservadas en acetato de sodio 50 mM y a pH 4,0 a temperaturas cercana a la ambiental no siendo necesario su refrigeración posterior a la separación del crudo del medio de fermentación.

Muchos hongos filamentosos están naturalmente adaptados al crecimiento sobre superficies (Gutiérrez-Correa y Villena, 2003: 115), para ello requieren un contacto cercano con el sustrato debido a su nutrición heterótrofa, secreción de enzimas extracelulares, absorción de nutrientes a través de la pared celular y el crecimiento apical de sus hifas (Jones, 1994: 973). Se caracterizan por formar biopelículas (sistemas formados por microorganismos adheridos a superficies) y como tales, muestran características fisiológicas particulares derivadas probablemente de una expresión diferencial de genes (Villena y Gutiérrez-Correa, 2003: 81).

Por otro lado, el material lignocelulósico es atractivo por su bajo costo y alta disponibilidad en diversos climas y localidades, sin embargo, el principal impedimento para su utilización es la falta de una tecnología de bajo costo para degradar la fracción no degradable de la biomasa. Aunque existen métodos fisicoquímicos que permiten utilizar la biomasa en la producción de biocombustibles, una alternativa prometedora son los métodos biológicos que utilizan organismos celulolíticos para obtener azúcares fermentables (Lynd et al., 2002: 564). Han sido propuestos sustratos como la yuca como la cáscara de banano son fuentes potenciales para la producción de etanol (Monsalve, et al, 2006: 24). Pero la mejor forma de conseguir un biocombustible sustentable parece ser con una tecnología llamada etanol de celulosa, que es un tipo de combustible que puede ser procesado a partir de la fermentación del glucosa, pudiendo utilizarse el azúcar de caña directamente, o alguna variedad de materia prima como mijo, canola, madera, bagazo etc., que son desechos hasta convertirlos en azúcar (Cuervo, et al., 2009:29).

En este sentido, Gray et al. (2006:144), expresan que el etanol de celulosa ofrece una ventaja, al disponerse de un abastecimiento de base mucho más amplia y no necesita tomarse del abastecimiento alimenticio y seguramente permitirá que tenga un precio más estable en el mercado. Estudios llevados a cabo en Estados Unidos estiman que es hasta tres veces más eficiente que el proceso de etanol de maíz; asimismo, hay que destacar que este proceso genera mejores condiciones para el medioambiente, ya que eliminan un 85% de la generación de gases invernadero si se lo

compara con el petróleo (Cuervo et al., 2009: 25). Por lo que se constituirá la próxima generación de biocombustibles, pero por ahora tiene algunas limitaciones, principalmente la imposibilidad de producción en masa, y escasez de fondos económicos, al mismo tiempo que las enzimas requeridas para convertir la materia prima en azúcar no está siendo producida comercialmente todavía, y quizás en algunos años se tardará para llegar a ese estadio de producción de gran escala, y constituirá una solución viable a largo plazo para reemplazar al petróleo; por lo que se propone como objetivo de investigación: Producir celulasas en un biorreactor aireado, utilizando un cultivo de *A. niger* en un medio de cultivo a base de bagazo de caña de azúcar bajo condiciones de laboratorio.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. OBJETO DE ESTUDIO

Material de estudio

Cultivo de *Aspergillus niger*, proporcionado por el Laboratorio de Fisiología y Genética Bacteriana, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Trujillo, Región La Libertad - Perú.

Bagazo de caña de azúcar, *Saccharum officinarum* L. variedad blanca, recolectados del mercado Mayorista, Trujillo. Región La Libertad- Perú, en julio del 2014.

2.2. MÉTODOS Y TÉCNICAS

2.2.1. Recolección y preparación del bagazo

Se recolectó aproximadamente 2 Kg de residuos de bagazo de caña de azúcar en bolsas de polietileno estériles, y llevado al laboratorio de Fisiología y Genética Microbiana de la Universidad Nacional de Trujillo; lavado dos veces, con agua corriente, seguidamente se hicieron trozos de 5 x 10 mm; y agregó 200 mL de solución de NaOH 1,0 M; fue calentado por 30 minutos a ebullición constante, y enjuagado con agua destilada estéril por cinco veces, luego colocado a escurrir en papel secante y se llevó a estufa a 60°C por 10 horas; finalmente, y guardado en frasco de vidrio, color ámbar, estéril.

2.2.2. Reactivación del cultivo y preparación del inóculo

A partir del cultivo puro se sembró en agar celulosa y se incubó a 30°C por 72 horas. Seguidamente fue preparada una suspensión de esporas con solución salina fisiológica estéril equivalentes a una concentración final de $9,0 \times 10^8$ esporas/mL, por recuento en cámara de Neubauer, constituyendo el inóculo.

2.2.3. Construcción de biorreactores de lecho empacado

Se construyó un biorreactor con frasco de vidrio de 2 L de capacidad; acondicionado con un motor de aire. El frasco y accesorios fueron lavados con lejía al 2,5 % por 30 minutos y luego irradiados con luz UV de una lámpara, a una distancia de 30 cm por 60 minutos.

2.2.4. Ensayo

Se inoculó 50 mL de esporas al biorreactor (Fig.1) conteniendo 200 g de bagazo preparado y fue rociado con caldo base de nutrientes (Peptona 2,5 g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1 g/L; CaCl_2 0,5 g/L; Mg SO_4 0,5 g/L; NaCH_3COO 50mM; pH 6,0), e inyectó aire estéril a razón de 0.5 VVM, e incubó a temperatura ambiental (23-25 °C).

Se monitoreo la producción de celulasas, cada día, desde el día uno hasta el día veinte, extrayendo 20 g de bagazo incubado, que fueron lavado con 50 mL de buffer acetato 0,2 M pH 6,0 y centrifugado a 3 000 rpm durante 15 minutos; luego se transvasó el sobrenadante (extracto de celulasas) en tubos de ensayo y fue guardado en refrigeración hasta su evaluación.



Fig. 1. Biorreactor de vidrio, tipo columna, de lecho empacado y aireado, en funcionamiento.

2.2.5. Medición de actividad catalítica de la celulasa

En tubos de ensayo conteniendo 3,5 mL de una suspensión de carboximetilcelulosa q.p. al 1%, se agregó 0,5 mL de buffer acetato de sodio 1,0 M (pH 6,0) y 1,0 mL de extracto de celulasas, e incubó a 50 °C por 1 h; y calentado posteriormente a 80°C por cinco minutos. La cantidad de glucosa liberada fue medida por el método de glucosa enzimática del Laboratorio Wiener (2012). Así mismo, se determinó el factor de conversión para cuantificar la glucosa, usando como patrón la solución de glucosa estándar de 100 mg % por el método enzimático del Kit comercial del Laboratorio Wiener (2012). Finalmente se calculó las unidades enzimáticas de celulasas, para lo cual se definió a una unidad enzimática de celulasa, como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 micromol (μmol) de glucosa/min (Márquez, et al., 2007: 32) a 50°C y pH 6,0 (Villena y Gutiérrez - Chacón, 2003:80). Cada medición se realizó por triplicado.

El procedimiento se repitió tres veces consecutivas en las mismas condiciones de ensayo.

2.2.6. Lectura y análisis de resultados

Las mediciones promedio de la actividad enzimática por mL de celulasas en función al tiempo de incubación obtenidos fueron sometidos al análisis estadístico, mediante la prueba Análisis de varianza (ANOVA) (Exebio, 2001:30), con un nivel de significancia de 0,05% y un 95% de intervalo de confianza.

III. RESULTADOS

La producción de celulasas, se expresó en unidades enzimáticas/mL promedios, por *Aspergillus niger* en un biorreactor en condiciones de laboratorio, observándose que la producción de celulasas siguió una tendencia creciente en relación al tiempo de incubación, determinándose una producción de 0,025 UE de celulasas/mL hasta los 20 días de evaluación (Fig.2).

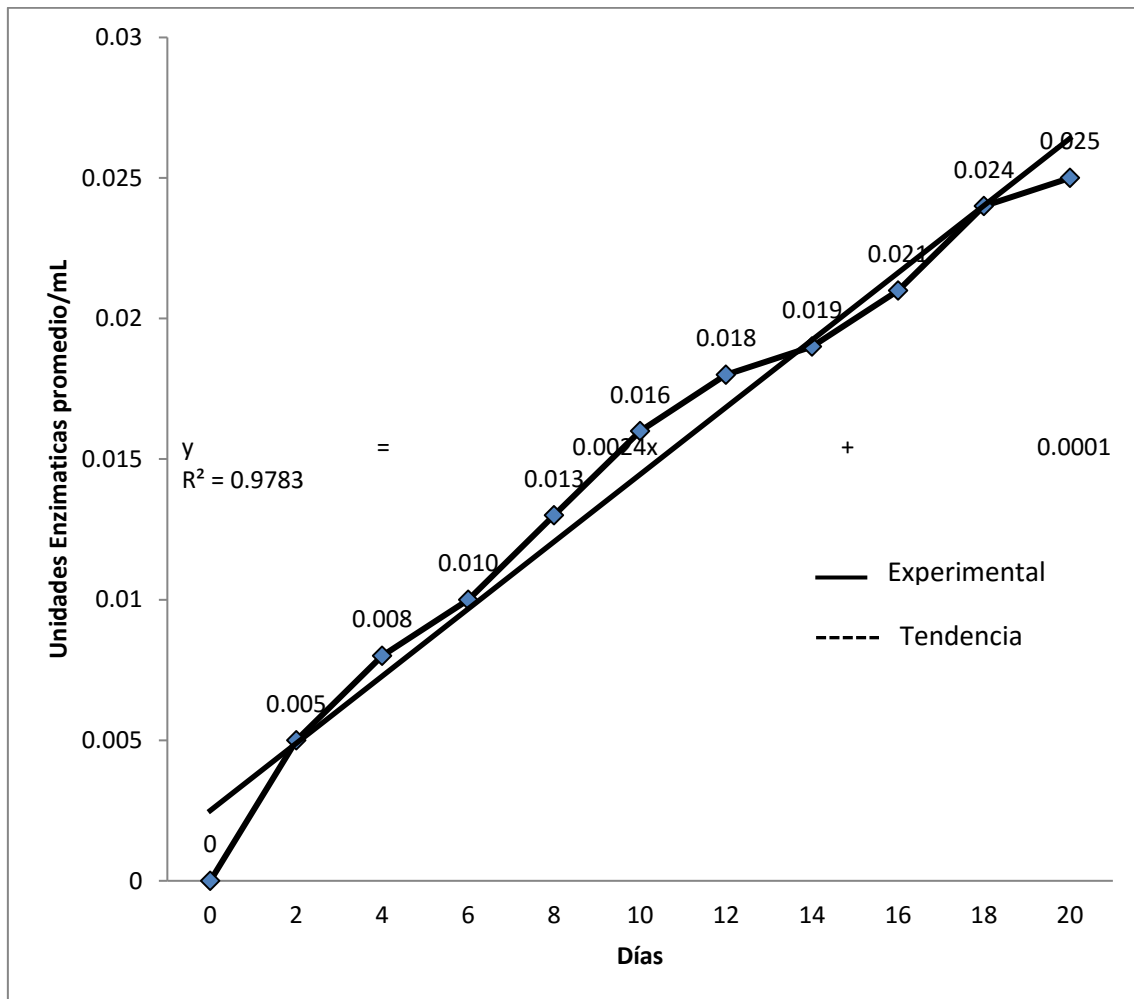


Fig. 2. Producción de celulasas por *A. niger*, expresadas en Unidades Enzimáticas promedio/mL de extracto hasta los 20 días de incubación ($p < 0,05$).

IV. DISCUSIÓN

Según las condiciones de ensayo en que se llevó a cabo la investigación, hubo una interacción positiva entre el hongo y el bagazo de caña de azúcar desde el punto de vista nutricional, observándose que *A. niger* creció sobre todo el soporte contenido en el biorreactor después de la incubación evidenciándose por la formación de micelio (Fig. 1), y la presencia de celulasas se detectó desde los dos primeros días de incubación (0.005UE/mL) y que esta cantidad de enzimas se incrementó en 0,016 UE/mL a los 10 días, lo que sugiere que el bagazo de caña de azúcar utilizado

en el biorreactor permitió metabolizar la celulosa para obtener moléculas de glucosa que estuvieron ligadas unas a otras mediante enlace covalente. En este sentido, el hongo tuvo que excretar el complejo enzimático celulasas para hidrolizar los enlaces beta 1-4 y liberar dextrinas, maltosa y/o glucosa. Esto se confirma por lo trabajado por Curi, et al. (2010: 1685) quienes demostraron que utilizando un medio de cultivo a base de bagazo de caña al 4%, sulfato de amonio 0,1%, sulfato de magnesio al 0,5% y bifosfato de potasio al 0,2% lograron obtener extractos crudos enzimáticos con mayor actividad celulolítica a los tres días de fermentación con *A. niger*.

Los resultados obtenidos utilizando el bagazo de caña de azúcar, subproducto del procesado de la caña, como soporte orgánico para que *A. niger* pueda crecer y proliferar de manera uniforme en todo el lecho empacado contenido en el biorreactor; además, en relación a la producción de celulasas en las condiciones de ensayo permitió lograr el objetivo principal y por lo tanto constituye un recurso importante para producir celulasas a escala de laboratorio y se podría implementar a escala piloto o a gran escala. Esto corrobora los hallazgos de Ferrel et al. (2011:10), quienes lograron aislar hongos productores del complejo celulasas y el bagazo resultó efectiva en la producción del complejo celulolíticos en laboratorio.

Villena y Gutiérrez-Correa (2003:79), establecieron la estructura y fisiología de las biopelículas de hongos filamentosos de interés industrial, demostrándose que la formación de la biopelícula ocurre en tres fases: adsorción, que es favorecida por la hidrofobicidad de las esporas de *A. niger*; la fase de crecimiento inicial y desarrollo que se inicia con la germinación de la espора entre las 4 y 10 h y continua hasta las 10 h cuando ya se percibe la colonización casi total de la superficie; y finalmente la fase de maduración, en la cual la densidad de biomasa se incrementa notablemente desde las 48 h hasta las 120 h; y, comparando la actividad celulolítica de las biopelículas fue elevada, siendo hasta 40 % mayor que en los cultivos sin soporte de crecimiento (durante el transcurso de la fermentación), lográndose un incremento del 55 % en la productividad. La producción de celulasas, día a día, se incrementó de manera lineal (Fig. 2), lo que hace suponer que todos los eventos descritos anteriormente ocurrieron en el sistema permitiendo la formación de biopelículas por parte del hongo en el bagazo de caña de azúcar, contribuyendo así a su crecimiento y metabolismo en las condiciones de ensayo que se evaluaron.

También tenemos que Ramírez y Urrego (1994:4) investigaron que una concentración de 25% de fibra de palma africana a 23°C mejoró la producción de celulasas por *Trichoderma* sp., y que concentraciones menores permitían una mayor humedad en el medio de cultivo que inhabilitaba el crecimiento del hongo, así como también la degradación de la celulosa debido a que se disminuye la concentración del sustrato para consumo; por el contrario concentraciones mayores de sustrato en el medio de cultivo quedaba bastante seco para el crecimiento del hongo. En contraste, los resultados obtenidos con *A. niger* indican que el bagazo de caña de azúcar constituyó una alternativa como fuente de carbono para el crecimiento microbiano y que el caldo de cultivo utilizado favoreció las condiciones óptimas para lograr obtener un extracto crudo de celulasas listo para ser utilizado en procesos posteriores.

Siendo el bagazo de caña de azúcar una materia prima principal de glucosa, y que mediante tratamiento preliminar con celulasas excretadas por los microbios, de acuerdo a los resultados obtenidos, permitiría obtener jarabes glucosados que por fermentación posterior se obtiene el bioetanol. Entonces resulta una alternativa práctica de emplear residuos lignocelulósicos es la producción de etanol, constituyendo hoy día una posibilidad altamente prometedora por su amplia disponibilidad en el mundo, y la existencia en los diversos países iberoamericanos, de abundantes recursos lignocelulósicos, justifica la dedicación por parte de estas naciones, de un esfuerzo importante al desarrollo y adaptación de tecnologías tendientes a la utilización integral y racional de los mismos (Romano, et al., 2005:187).

Las celulasas comerciales provienen de especies de *Trichoderma* y *Aspergillus* (Zhang et al., 2006: 471); sin embargo, la cantidad de enzima producida por estos microorganismos es todavía motivo de múltiples investigaciones, puesto que existen múltiples factores involucrados, entre ellos el medio de cultivo, que juega un rol determinante al momento de la expresión de la enzima. La producción biotecnológica puede resultar costosa si no se adopta una estrategia para disminuir los costos de producción, la utilización de residuos industriales (bagazo) aumentaría el rendimiento y disminuiría los costos de producción (Curi, et al., 2010: 4). Esta investigación a nivel local responde en alguna

medida a producir celulasas, y haber optimizado un proceso sin ninguna complejidad, ni que demande una alta tecnología; por el contrario, constituyó un trabajo alternativo, que se corrobora con el estudio de Alvarez y Rossi (1993: 73), donde su evaluación de dos cepas de *Aspergillus in vitro* frente a la celulosa nativa y carboximetilcelulosa, observaron que no mostraron diferencias en su actividad celulolítica mediante la producción de exo y endoglucanasas extracelulares.

Por otro lado, la evaluación de las actividades de celulasa total (FPasa) y endoglucanasa (CMCasa), realizadas a los ocho días de cultivo en fermentación en fase sólida utilizando los residuos lignocelulósicos pretratados como sustrato, suplementando con dos fuentes de nitrógeno inorgánicas ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ y NaNO_3), indicó que las mayores actividades celulolíticas se encuentran en cultivos realizados con pretratamiento biológico (precultivo de *Pleurotus ostreatus*) y NaNO_3 como fuente de nitrógeno, con valores de 0,374 U/mL de FPasa y 0,776U/mL de CMCasa; donde una unidad (U) de actividad es la cantidad en μmoles de azúcares reductores (glucosa) producidos por minuto (Rodríguez y Piñeros, 2007:40). Al comparar las unidades enzimáticas (UE) de CMCasa halladas, y teniendo limitaciones de las condiciones de ensayo en la investigación suponemos que son elevados respecto a los hallazgos encontrados en esta investigación donde se alcanzó un valor máximo de 0,025 UE/mL a los veinte días de incubación, pero que la tendencia lineal podría suponer un hallazgo mayor de UE durante los siguientes días de incubación en el biorreactor en las condiciones ensayadas.

En Ecuador, Paredes, et al.(2010: 84), analizaron la actividad de enzimas celulasas (UI/g de residuo seco) obtenidas de la fermentación sólida sobre los residuos de banano pseudotallo, hojas y raquis con los hongos *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius* y *Lentinula edodes* en 24 días de incubación, encontrando que la máxima actividad enzimática de celulasas fue producida por *Lentinula edodes* en pseudotallo con valores de 8,14 UI/g de residuo seco; así también se estableció que la temperatura y pH óptimos de la enzima es de 50°C y 5,3 respectivamente. En contraste a los resultados obtenidos en esta investigación que se trabajó a pH 6,0 y temperatura ambiental (23-25°C). Al mismo tiempo que, para la aplicación de las enzimas celulasas en la obtención de bioalcohol, primeramente se modificó la estructura química de la lignina de los residuos de banano, mediante un pretratamiento a cada uno, con 0,74 g de hidróxido de calcio/g de residuo, para la posterior hidrólisis de la celulosa a azúcares con 12 UI de extracto enzimático/g de residuo seco pretratado (Paredes, et al., 2010: 85), mientras que en esta investigación se trabajó con bagazo de caña de azúcar no tratado y se obtuvieron los resultados esperados; es decir que permitió producir celulasas a nivel de laboratorio, muy parecido a lo demostrado por Conesa, et al. (2013: 12), que al emplear 0.4% de celulosa producida por *A. niger*, fueron capaces de hidrolizar parte de la matriz lignocelulósica del residuo industrial de la piña, y la concentración de azúcares fermentables aumentó y aparecieron nuevos azúcares resultado de la sacarificación tales como la arabinosa, la xilosa y la celobiosa.

Otra investigación, trabajando con el 3,64% de tallo de clavel molido en base seca, como fuente de carbono, junto con 0,5 g/L de sulfato de amonio, a un pH igual a 5, presentó las mejores condiciones de cultivo para la producción de celulasas con actividades enzimáticas de 269 U/L en carboximetilcelulosa, utilizando una cepa nativa de *Trichoderma* sp. en escala de matraz (Suesca, 2012: 63). En este sentido, la investigación realizada pone en evidencia el gran potencial de la producción de celulasas por *A. niger* en las condiciones de ensayo, constituyéndose un proceso alternativo para lograr producir este tipo de enzima a gran escala; al mismo tiempo que existe un potencial uso de los residuos de bagazo de caña de azúcar como sustratos para producción de enzimas celulasas y como fuente de biomasa lignocelulósica para la producción de bioetanol. Al mismo tiempo, el grado de hidrólisis y la efectividad del proceso está influido por las condiciones de reacción (pH, temperatura, concentración de enzima, concentración de sustrato, tiempo de reacción). Por lo tanto, la optimización de las condiciones del proceso es necesaria (Ovando-Chacón y Waliszewski, 2005:118).

La variabilidad de la producción de celulasas fue evaluada mediante análisis de varianza (ANOVA) para mediciones repetidas, con un nivel de significancia de 0,05% y un 95% de intervalo de confianza, y posteriormente, se realizó una prueba de Tukey para poder estimar las diferencias significativas entre los resultados obtenidos. La mayor diferenciación se evidenció entre los 2 y 20 días de incubación. En este intervalo, los ANOVA para mediciones repetidas y la subsiguiente prueba de Tukey mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Esta observación sugiere

que la producción de celulasas por *A. niger* se incrementó significativamente en la medida que aumentaba las horas de incubación en el biorreactor en las condiciones de ensayo.

V. CONCLUSIONES

1. Se logró producir 0,025 UE de celulasas/mL por *Aspergillus niger* hasta los 20 días de incubación utilizando bagazo de caña de azúcar como sustrato con tendencia lineal de incrementar su concentración en el tiempo.
2. El bagazo de caña de azúcar constituyó un soporte y sustrato importante para producir celulasas en un biorreactor aireado a temperatura ambiental (25 °C) y pH 6,0.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCARRAZ M, FLORES A, GODOY J. 2008. **Producción de celulasas por inmovilización celular para el tratamiento de efluentes industriales lignocelulósicos**. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Perú. Oficina General del Sistema de Bibliotecas y Biblioteca Central. Lima – Perú. Pág.: 1-14. Disponible en:
http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtual/publicaciones/geologia/v13_n26/contenido1.htm Consultado: 2014-06-13
- ALVAREZ D, ROSSI G. 1993. **Producción de celulasas por cepas de *Aspergillus niger* y *Trichoderma harzianum* aisladas de suelos tratados con fluroxypyr: estudio preliminar I**. Bol. micol; 8(1/2):71-5. Disponible en: <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=140501&indexSearch=ID> Consultado: 2014-06-13
- BHAT M. 2000. **Cellulases and related enzymes in biotechnology**. Biotechnology Advances. Vol. 18: 355-387.
- BHAT M, BHAT S. 1997. **Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications**. Biotechnology Advances. Vol. 15: 583-601.
- CONESA C, SEGUÍ L, FITO P. 2013. **Sacarificación de residuos industriales de piña con mezclas de enzimas comerciales**. Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo. Universidad Politécnica de Valencia, España. Pág.: 10-25. Disponible en:
https://www.google.com.pe/?gws_rd=ssl#q=produccion+de+celulasas+por+aspergillus+niger&start=10 Consultado: 2014-06-13
- CUERVO L, FOLCH J, QUIROZ R. 2009. **Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol**. Instituto de Biotecnología, México. BioTecnología. Vol. 13(3):24-36.
- CURI M, FLORES A, GODOY J. 2010. **Producción de celulasas por inmovilización celular para el tratamiento de efluentes industriales lignocelulósicos**. Revista del Instituto de Investigación. Instituto de Investigación de la Facultad de Geología, Minas, Metalurgia y Ciencias Geográficas. ISSN versión electrónica. Vol. 13(26): 1682 – 1687.
 Disponible en: https://www.google.com.pe/search?q=produccion+de+celulasas&ie=utf-8&oe=utf-8&rls=org.mozilla:en-US:official&client=firefox-a&channel=np&source=hp&gfe_rd=ctrl&ei=y3wnU7P0M4K48we2gIHBYBw&gws_rd=cr
 Consultado 2014-03-17
- DONGOWSKI G, SEMBRIES S, BAUCKHAGE K, WILL F, DIETRICH H. 2002. **Degradation of apple cell wall material by commercial enzyme preparations**. Nahrung/Food. Vol. 46: 105-111.
- DUSTET J, CARMENATE M, HARAMBOURE T. 2000. **Obtención de celulasas de *Aspergillus niger*, técnica de cultivo y método de separación**. Cuba. Pág.: 1-50.

- EXEBIO C. 2001. **Estadística aplicada a la investigación científica en Ciencias de la salud**. 1 ed. Editorial EXLO. Trujillo. Pág.: 21-35.
- FERRER-MARCELO Y, LEÓN-RODRÍGUEZ M, MICHELENA-ÁLVAREZ G, DUSTET-MENDOZA J, DUQUE-ORTIZ A, IBÁÑEZ-FUENTES M, TORTOLÓ-CABAÑAS K. 2011. **Selección de hongos aislados de bagazo de caña con actividad celulasa sobre celulosa cristalina para posibles aplicaciones industriales**. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar, ICIDCA. Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal. Vol. 45: (1): 3-12
- GRAY K, ZHAO L, EMPTAGE M. 2006. **Bioethanol**. Curr. Opin. Chem. Biol. Vol. 10:141-146.
- GUTIÉRREZ-CORREA M, VILLENA G. 2003. **Surface adhesion fermentation: a new fermentation category**. Rev. Perú Biol. Vol. 10: 113-124.
- HERNÁNDEZ A, GARCÍA E, RODRIGUEZ A. 1999. **Celulosomas: sistemas multienzimáticos**. Journal of the Mexican Chemical Society, Vol. 43(3-4): 4
- IZARRA M, SANTAYANA M, VILLENA G, GUTIÉRREZ-CORREA M. 2010. **Influencia de la concentración de inóculo en la producción de celulasa y xilanas por *Aspergillus niger***. Rev. colomb. biotecnol, Vol. 12(2):139-150. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0123-34752010000200011&script=sci_arttext. Consultado: 2013-11-16
- JONES J. 1994. **Fungal adhesion**. Mycological Research. 98: 961-981.
- LABORATORIO WIENER. 2012. **Método enzimático para determinar glucosa en suero o plasma**. Kit comercial de uso diagnóstico “*in vitro*”. Industria Argentina.
- LJUNGDAHL L, ERIKSSON K. 1985. **Ecology of microbial cellulose degradation. Advances in Microbiology and Ecology**. Vol. 8: 237-299.
- LYND L, WEIMER P, VAN ZYL W, PRETORIUS I. 2002. **Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology**. Microbiol. Mol. Biol. Rev. Vol. 3: 506-577.
- MÁRQUEZ A, MENDOZA G, GONZÁLEZ S, BUNTINX S, LOERA O. 2007. **Actividad fibrolítica de enzimas producidas por *Trametes sp. eum1*, *Pleurotus ostreatus* IE8 y *Aspergillus niger* AD96.4 en fermentación sólida**. Interciencia. Vol. 32 (11): 27-36.
- MARSDEN W, GRAY P. 1986. **Enzymatic hydrolysis of cellulose in lignocellulosic materials**. CRC Critical Reviews in Biotechnology. Vol. 3: 235-274.
- MONSALVE J, MEDINA V, RUIZ A. 2006. **Producción de etanol a partir de la cáscara de banano y de almidón de yuca**. Medellín. Universidad Nacional de Colombia, DYNA. Vol. 73 (150): 21-27.
- MOSQUERA C, RUBIO B. 2000. **El reciclaje del papel, celulosa y *Trichoderma reesei***. Departamento de Química, Universidad del Cauca, Popayán. En PAREDES D, ÁLVAREZ M, SILVA M, ORDONEZ S. 2010. Obtención de enzimas celulasas por fermentación sólida de hongos para ser utilizadas en el proceso de obtención de bioalcohol de residuos del cultivo de banano. Revista Tecnológica ESPOL – RTE. Vol. 23(1): 82.
- OVANDO-CHACÓN S, WALISZEWSKI K. 2005. **Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos**. Universidad y Ciencia. Vol. 21(42): 111-127. Disponible en: www.ujat.mx/publicaciones/uciencia. Consultado 2012-11-16.
- PAREDES D, ÁLVAREZ M, SILVA M, ORDONEZ S. 2010. **Obtención de enzimas celulasas por fermentación sólida de hongos para ser utilizadas en el proceso de obtención de bioalcohol de residuos del cultivo de banano**. Revista Tecnológica ESPOL – RTE. Vol. 23(1): 81-88.
- POLIZELI M, RIZZATTI A, MONTI R, TERENCEZ H, JORGE J, AMORIM D. 2005. **Xylanases from fungi: properties and industrial applications**. Applied Microbiology and Biotechnology. Vol. 167: 577-591.

- RAMÍREZ O, URREGO F. 1994. **Producción de celulasas a partir del hongo *Trichoderma sp* y aprovechamiento de la fibra prensada de palma como medio de cultivo.** Ingeniería de Alimentos. Fundación Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. Disponible en: avalon.utadeo.edu.co/dependencias/publicaciones/.../celulasas.pdf Consultado 2013-11-16
- RODRÍGUEZ I, PIÑEROS Y. 2007. **Producción de complejos enzimáticos celulolíticos mediante el cultivo en fase sólida de *Trichoderma sp.* sobre los racimos vacíos de palma de aceite como sustrato.** VITAE, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica. Universidad De Antioquia, Medellín, Colombia. Vol. 14(2): 35-42.
- ROMANO S, GONZÁLEZ E, LABORDE M. 2005. **Combustibles Alternativos.** Red CYTED. Nuevas Tecnologías para la obtención de Biocombustibles. Ediciones Cooperativas. Buenos Aires, Argentina. Pág.168-196.
- SUESCA A. 2012. **Producción de enzimas celulolíticas a partir de cultivos de *Trichoderma sp.* con biomasa lignocelulósica.** Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de: Magister en Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química y Ambiental. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá D.C, Colombia.
- SZIJARTO N, SZENGYEL Z, LIDÉN G, RÉCZEY K. 2004. **Dynamics of cellulase production by glucose grown cultures of *Trichoderma reesei* Rut-C30** as a response to addition of cellulose. Applied Biochemistry and Biotechnology. Vol. 113: 115-124.
- VILLENA G, GUTIÉRREZ-CORREA M. 2003. **Biopelículas de *Aspergillus niger* para la producción de celulasas: algunos aspectos estructurales y fisiológicos.** Rev. Perú. Biol. Vol. 10(1): 78-87. Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor San Marcos. Versión Online ISSN 1727-9933. Disponible en: http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/biologia/v10_n1/bio_asper.htm Consultado 2014-06-12
- ZHANG P, HIMMEL M, MIELENZ J. 2006. **Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies.** Biotechnology advances. Vol. 24: 452-481.