



**“OPTIMIZACIÓN DE CEPAS DE
Aspergillus niger PRODUCTORAS DE
ENZIMAS HIDROLÍTICAS”**

**INFORME TÉCNICO DE RESIDENCIA PROFESIONAL QUE
PRESENTA:**

SUSAN LUCERO LÓPEZ LÓPEZ

NÚMERO DE CONTROL:

15270342

CARRERA:

INGENIERÍA BIOQUÍMICA

ASESOR INTERNO:

DRA. ROSA ISELA CRUZ RODRÍGUEZ

ASESOR EXTERNO:

DR. MIGUEL ÁNGEL GÓMEZ LIM

IRAPUATO, GUANAJUATO. 20 DE DICIEMBRE DEL 2019

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el soporte institucional y monetario para la realización de los estudios de Licenciatura presentados en este trabajo.

A los integrantes del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Irapuato, por permitirme cursar mis estudios en una institución de alta calidad y que proporciona una excelente formación humana.

Al Dr. Miguel Ángel Gómez Lím, por la oportunidad de unirme a su grupo de trabajo, por su deseo de escuchar y comprender las ideas de los alumnos, por su disposición de resolver cualquier duda con paciencia y bondad, por su confianza en el desarrollo del proyecto, en conclusión, por todo el apoyo brindado a lo largo de mi estancia.

A la Dra. Ara Itzel Pérez de los Santos Mondragón por la asesoría, confianza, conocimientos y excelente disposición permitieron el desarrollo de los experimentos cruciales que se detallan en el trabajo. Le estoy infinitamente agradecida por su amistad demostrada sobre todo en los momentos más difíciles de mi vida.

A mis compañeros del Laboratorio de Biotecnología de plantas y microorganismos del departamento de Ingeniería Genética, que siempre estuvieron dispuestos a colaborar, a opinar, resolver dudas, y fomentar un buen ambiente en el trabajo.

A la Dra. Rosa Isela Cruz Rodríguez, por la paciencia, confianza y revisión de este trabajo. Sobre todo, por todos los conocimientos compartidos en cada una de sus materias brindadas a lo largo de mis estudios.

A Dios primeramente por darme la oportunidad de adquirir nuevas experiencias y conocimiento.

RESUMEN

El reino fungi está integrado por grupos de microorganismos que se caracterizan por su gran diversidad metabólica y morfológica, así como variabilidad intrínseca. Son organismos eucarióticos, heterótrofos, unicelulares o pluricelulares y adquieren los nutrientes por adsorción, sin embargo, carecen de sistema fotosintético. Todas estas características han hecho a los hongos valiosas herramientas como modelos de estudio. Por medio de la biología molecular y la secuenciación de genomas existe la posibilidad de una mejor comprensión del metabolismo y evolución de los hongos. La mayoría de los métodos actuales de transformación (protoplastos, electroporación, biobalística, transformación mediada por *Agrobacterium*) presentan desventajas de reproducibilidad y eficiencia, sin embargo, *Trichoderma* y *Aspergillus* suelen ser buenos productores, pero no son apropiados para estudios de la estructura-función dadas las bajas frecuencias de transformación en estos hongos. En este trabajo se desarrolló mutagénesis por rayos UV, lo que permitió mayor actividad enzimática. En *Aspergillus niger* fue evaluada la reacción de la enzima celulasa y xilanas. Los resultados demuestran que las radiaciones por UV son eficientes para una mayor actividad relativa celulolítica y xilanolítica, la mutante 1.7 de la tercera mutagénesis tuvo mayor desviación estándar en comparación con la transformante, mutantes y silvestre WT. En otra serie de experimento, se logró probar el comportamiento de las actividades relativas en las cepas mediante una serie de fermentaciones, se comprobó que utilizando bagazo de agave procesado induce a una mayor actividad celulolítica y xilanolítica.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	7
2. DESCRIPCIÓN DE LA EMPRESA	8
3. PROBLEMAS A RESOLVER	8
4. OBJETIVO GENERAL	9
5. JUSTIFICACIÓN	9
6. MARCO TEÓRICO	9
6.1. Celulosa	9
6.2. Hemicelulosa	10
6.3. Sistemas celulolíticos	11
6.5. Impacto biotecnológico de los hongos	14
6.6. Generalidades de hongos	15
6.7. Hongos filamentosos	16
6.8. <i>Aspergillus niger</i>	20
7. PROCEDIMIENTO Y DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES	21
7.1. Cepas utilizadas	21
7.2. Medio de cultivo	21
7.3. Mutagénesis por UV	22
7.4. Bioensayo para determinar la actividad de celulasas y xilanasas	22
7.4.1. Tinción con Rojo Congo para determinar actividad celulolítica y xilanolítica	23
7.5. Fermentación de mutantes de <i>A. niger</i>	23
8. RESULTADOS	28
8.1. Mutagénesis por UV	28
8.2.1. Segundo bioensayo	30
8.2.2. Tercer bioensayo	33
8.3. Fermentación	38
8.3.1. Primera fermentación con bagazo de agave sin procesar	38
8.3.1 Fermentación con bagazo de agave procesado	40
9. CONCLUSIONES	43
10. COMPETENCIAS DESARROLLADAS	44
11. FUENTES DE INFORMACIÓN	45

1. INTRODUCCIÓN

La alta carga de residuos lignocelulósicos en los efluentes industriales de papeleras, procesadoras de vegetales, entre otras, la materia orgánica representa significativamente los valores de la demanda bioquímica de oxígeno, superando excesivamente los límites permisibles para dichos efluentes (G. Immanuel *et al.*, 2007).

La utilización de celulosa como materia prima de azúcares que puedan ser bioconvertidos a combustibles mediante el empleo de microorganismos, ha retomado gran importancia en los últimos años debido a los altos precios del petróleo y a las inconveniencias de los cultivos mencionados (Sun *et al.*, 2002; Wackett *et al.*, 2008).

Las fuentes celulósicas potencialmente utilizables son los desechos de la industria maderera (en forma de aserrín), los agrícolas (bagazos), y los domésticos (jardinería) (Lin *et al.*, 2006). La celulosa es un biopolímero constituido de D-glucosa unidas por enlaces β -1-4 glucosídicos y se encuentra en forma abundante en la biosfera, puede ser utilizado como fuente de carbono para organismos con capacidad celulolítica que poseen enzimas como: las celobiohidrolasas y las endoglucanasas que permiten su degradación (Mosquera *et al.*, 2000).

Las celulasas han sido de los biocatalizadores más empleados desde su descubrimiento y dada la alta demanda de éstos, una forma de producción es mediante uso de microorganismos (Ramírez *et al.*, 1994).

2. DESCRIPCIÓN DE LA EMPRESA

El proyecto se realizó en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Irapuato, el cual se encuentra ubicado en Km. 9.6 Libramiento Norte Carr. Irapuato-León 36824 Irapuato Gto. México.

Misión:

"Contribuir de manera destacada al desarrollo de la sociedad y la preservación del ambiente, mediante la investigación trascendente y la formación de investigadores y expertos en biología y biotecnología de plantas en su entorno"

Visión:

"Ser un grupo competitivo a nivel internacional en biología, genómica y biotecnología vegetal; contribuyendo a la solución de problemas nacionales"

3. PROBLEMAS A RESOLVER

- Seleccionar *Aspergillus niger* como un sobre productor de enzimas hidrolíticas.

4. OBJETIVO GENERAL

Optimizar cepas de *A. niger* empleando mutagénesis con UV para aumentar la producción de algunas enzimas hidrolíticas.

5. JUSTIFICACIÓN

La búsqueda de microorganismos con capacidad de producir enzimas celulolíticas continúa siendo un área de investigación que se encuentra en constante desarrollo. Los procesos actuales para la producción y purificación de enzimas aún se mantienen con costos muy elevados, lo cual dificulta su aplicación en las diferentes industrias.

El potencial de estas enzimas celulolíticas, y su posterior caracterización puede tener un impacto en el manejo de residuos industriales y el cuidado del medio ambiente, en la obtención de productos con valor agregado o como herramienta para generar nuevas fuentes de energía.

6. MARCO TEÓRICO

6.1. Celulosa

Las maderas están compuestas principalmente de tres polímeros estructurales, la lignina, la celulosa y la hemicelulosa. La lignina es un heteropolímero fenólico sin una composición estereoquímica regular, con una función protectora de los otros dos componentes polisacáridos, la celulosa y la hemicelulosa (colectivamente llamados holocelulosa) (Aust, 1995; Masai *et al.*, 2007). La celulosa es el componente más abundante que existe sobre la tierra, es producida por las plantas formando parte de su pared celular (Plomion *et al.*, 2001). La celulosa es uno de los materiales más utilizados desde tiempos remotos, y en la

actualidad es la fuente de combustibles orgánicos, compuestos químicos, fibras y materiales necesarios para cubrir necesidades humanas tales como el papel, la pulpa, las maderas, etc. (Eriksson, 1989; Lynd *et al.*, 1999). Se estima que alrededor de 180 billones de toneladas de celulosa son producidas por las plantas anualmente, por lo que constituye una de las fuentes de carbono renovables más importantes que hay sobre la tierra (Kadla *et al.*, 2000). La naturaleza estructural de la celulosa cristalina la vuelve insoluble en la mayoría de los solventes, incluyendo el agua, y evita que sea atacada por enzimas microbianas. A este fenómeno se le conoce como recalcitrancia (Himmel *et al.*, 2007).

6.2. Hemicelulosa

La hemicelulosa por su parte, es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza. A diferencia de la celulosa su estructura no es homogénea. Está formada de pentosas (xilosa y arabinosa), hexosas (glucosa, galactosa y manosa) y compuestos fenólicos (como el ácido ferúlico y p-cumárico) (Wilder *et al.*, 1973). Las hemicelulosas son polidispersas (lo que significa que tienen un grado de polimerización variable) y altamente ramificadas, con sustituyentes de diferentes tipos (Saha, 2003; Wong *et al.*, 1988). La composición de las cadenas depende de cada especie vegetal en particular y del método con el que fueron extraídas (Puls *et al.*, 2005). Se han identificado dos tipos de hemicelulosa: en las maderas duras ésta existe mayormente en forma de xilanos, en las que los esqueletos homopoliméricos del xilano son cadenas de residuos de -D-xilopiranososa con uniones 1,4. Mientras que las maderas suaves contienen principalmente glucomanano. Se considera que las moléculas de hemicelulosa se encuentran altamente entrecruzadas mediante puentes diferúlicos formando una red en la que se encuentran embebidas las

microfibrillas de celulosa (Figura 1), al tiempo que proteínas de la pared celular también forman puentes con el ácido ferúlico, dándole gran resistencia e insolubilidad a toda la estructura (Bidlack *et al.*, 1992). Estas propiedades, junto con la lignina, contribuyen a la elevada recalcitrancia de los materiales celulósicos.

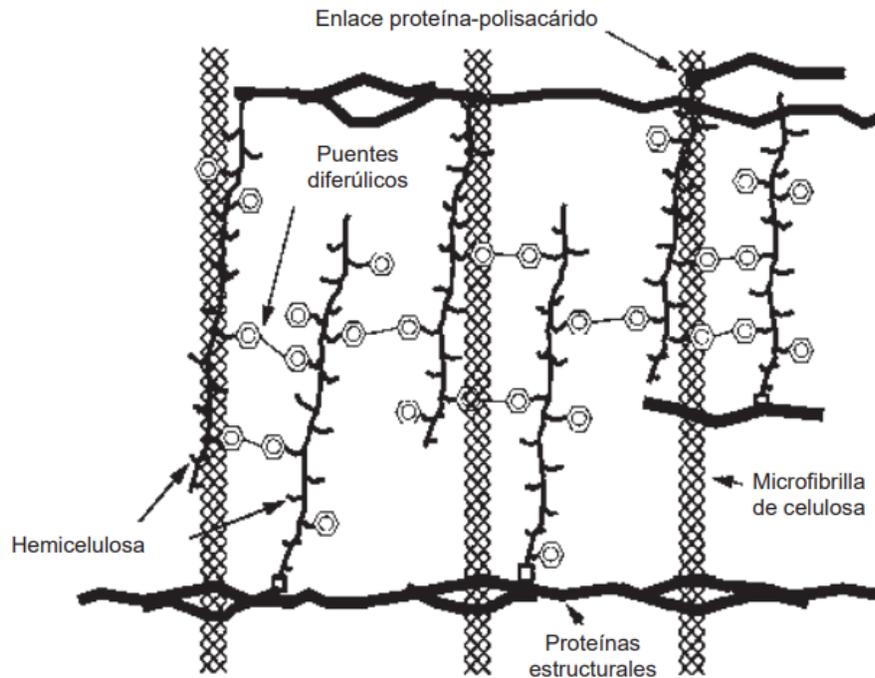


Fig. 1 Modelo de la interacción de los componentes de la pared celular. Las barras paralelas representan fibras de celulosa entrelazadas por las cadenas de hemicelulosa (unida entre sí por puentes diferúlicos) y proteínas estructurales (líneas negras). Modificado de (Saha, (2003)).

6.3. Sistemas celulolíticos

Los microorganismos encargados de la degradación de sustratos celulósicos producen múltiples enzimas que actúan en sinergismo directamente sobre la celulosa (Murashima *et al.*, 2003; Nidetzky *et al.*, 1994). Un tipo de enzimas de bacterias anaeróbicas actúan a través de un complejo multimérico asociado a la célula, en el que una proteína no

catalítica sirve de andamio a las varias subunidades enzimáticas mediante interacciones proteína-proteína de tipo cohesina-dockerina (Bayer *et al.*, 2004). Por otra parte, las celulasas de muchas otras bacterias aeróbicas y las fúngicas, son solubles y actúan de forma independiente (Ng, 2004).

Las celulasas pertenecen a la familia de las glicosil hidrolasas que actúan sobre carbohidratos, utilizan dos mecanismos de hidrólisis del enlace glucosídico que generan dos posibles configuraciones estereoquímicas finales. Un tipo de enzimas llevan a cabo una reacción en la que el carbono se transforma en nuevo centro quiral tras una ciclación hemiacetal o hemiacetal. (Withers, 2001). Las glicosil hidrolasas se clasifican en base a su secuencia de aminoácidos (www.cazy.org/fam/acc_GH.html). Este tipo de clasificación, por familias, permite identificar características estructurales de las enzimas, inferir su mecanismo de acción y determinar relaciones evolutivas entre ellas (Henrissat *et al.*, 1995). De acuerdo al sitio en el que cortan la fibrilla de celulosa se dividen en tres grandes grupos.

- Endocelulasas.

También denominadas endoglucanasas. Éstas son 1,4--D-glucan glucanohidrolasas (EC 3.2.1.4) que se agrupan en las familias 5, 6, 8, 9 y 12 principalmente, de las glicosil hidrolasas (Baldrian *et al.*, 2008; Goedegebuur *et al.*, 2002; Henrissat *et al.*, 1993).

- Exocelulasas.

Son también conocidas como exoglucanasas, y actúan progresivamente en los extremos terminales del polímero liberando ya sea moléculas de glucosa, las glucohidrolasas (1,4--D-glucan glucohidrolasa, EC 3.2.1.74); o celobiosa, las celobiohidrolasas (1,4- -D-glucan celobiohidrolasas, EC 3.2.1.91) (Baldrian *et al.*, 2008).

- β -glucosidasas.

Son enzimas -D-glucósido glucohidrolasas (EC 3.2.1.21), pertenecientes a las familias 1 y 3 de las glicosil hidrolasas y se encargan de degradar la celobiosa a monómeros de glucosa (Baldrian *et al.*, 2008; Lynd *et al.*, 2002; Schmid *et al.*, 1987).

6.4. Xilanasas

Este es el nombre genérico para una familia de enzimas que catalizan la ruptura de los enlaces xilosídicos internos de la molécula de heteroxilano (xilano), un tipo de polisacárido, el cual es el mayor componente de la hemicelulosa, componente importante de la biomasa de la pared celular en vegetales (Fang *et al.*, 2008; Anthony *et al.*, 2003). Las enzimas que participan de la biodegradación del heteroxilano son las endoxilanasas (EC 3.2.1.8), las cuales rompen el esqueleto de xilano en pequeños oligosacáridos y las β - xilosidasas (EC 3.2.1.37), las cuales degradan estos oligosacáridos a moléculas de xilosa (De Vries *et al.*, 2001). La estructura química del xilano es de D - xilosa unidos entre sí por enlaces β - 1,4, otras moléculas unidas a este esqueleto, dependiendo son arabinosa, galactosa, ácido ferúlico y ácido glucurónico (De Vries *et al.*, 2001).

El uso de las xilanasas ha sido propuesto para optimizar los procesos de clarificación de vinos y jugos, para extraer café y aceite de plantas (Krishna, 2005; Zhaoxin *et al.*, 2008). También se utiliza para la producción de hidrolizados de desechos agroindustriales y para la biodecoloración de la pulpa de papel (Zhaoxin *et al.*, 2008).

6.5. Impacto biotecnológico de los hongos

Desde hace varias décadas, los hongos filamentosos han sido objeto de estudios genéticos y biotecnológicos para la comprensión de la regulación genética, actividad metabólica, y para la producción de enzimas y otros compuestos.

Debido a que los hongos poseen una extraordinaria capacidad de secreción, existe un creciente interés en la optimización de métodos convencionales y en el desarrollo de nuevos métodos para introducir genes de interés cuyos productos puedan ser secretados al medio externo y fácilmente recuperados.

Los métodos actuales de transformación genética desarrollados son poco eficientes, poco reproducibles y complejos; pero a pesar de estas limitaciones ha sido posible la producción de diversas proteínas recombinantes por la manipulación genética de hongos.

Son muchas las especies utilizadas a nivel comercial para la producción de enzimas endógenas o heterólogas, aunque las más utilizadas en el ámbito de la producción de enzimas recombinantes son *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* y *Trichoderma reesei*.

Para dar una idea de la importancia de la industria enzimática Grand View Research-Market (2014), informa que el mercado y la disponibilidad de enzimas industriales, las

compañías Novozymes (Dinamarca) y DuPont (USA), a través de sus familias Danisco/Genencor, dominan el mercado de las enzimas con casi el 75% de las ventas globales. Con volúmenes de ventas menores, pero con una participación importante en el sector se encuentran las compañías alemanas BASF y Henkel, la holandesa DSM, así como las japonesas Amano y Ajinomoto. En la actualidad (2013), se calcula que el mercado global de las enzimas es de alrededor de 4.5 billones de dólares y se espera que crezca para el 2020 a un ritmo del 8.3% y alcance cifras de más de 7.5 billones de dólares.

6.6. Generalidades de hongos

Taxonómicamente los hongos están agrupados en el reino Fungi, la clasificación dentro del reino es complicada y se basa principalmente en el tipo de estructuras reproductoras que se forman tanto en los ciclos sexuales como asexuales. En forma más precisa: la presencia de ciclo sexual, el tipo de estructuras reproductoras, el número de grupos de complementación y la presencia o ausencia de septos, son los principales caracteres para clasificar a los hongos en tres grandes grupos, a saber: *Myxomycota* (hongos mucilaginosos), *Eumycota* (hongos verdaderos) y *Lichens* (hongos simbiotes). El grupo *Eumycota* se divide a su vez en cuatro grupos que son *Ascomycetos*, *Basidiomicetos*, *Ficomycetos* y *Deuferomicetos* (Herrera *et al.*, 1990). Los Deuteromicetos y los Ascomycetos son hongos filamentosos, de los cuales el género más abundante es *Aspergillus*. En su mayoría no forman cuerpos fructificantes o basidiocarpos, sino que crecen exclusivamente en forma de micelios. Han sido considerados por largo tiempo organismos ideales para el estudio de las características fisiológicas y genéticas de los eucariontes debido a su fácil manipulación en laboratorio, su capacidad para crecer en medios

químicamente definidos de bajo costo y a su rapidez de crecimiento que permite obtener varias generaciones en poco tiempo. Además de que, tradicionalmente, se han utilizado a algunos de estos microorganismos para fermentar alimentos y como productores de antibióticos y enzimas hidrolíticas (Wessels, 1999).

6.7. Hongos filamentosos

Los hongos se caracterizan por ser inmóviles, presentar talos, que pueden ser estructuras ramificadas llamadas micelios, en lugar de tejidos. Los hongos no realizan la fotosíntesis pues son heterótrofos que viven a partir de la materia orgánica producida por otros organismos. Pueden reproducirse por esporas o por medio de la ramificación de estructuras tubulares y arborescentes llamadas hifas. Una hifa es una estructura cilíndrica que consta de una pared celular que recubre a una membrana en cuyo interior pueden existir uno o varios núcleos. Además, pueden tener septos que son paredes internas que cortan la continuidad del citoplasma dentro de la hifa y en algunos casos estos septos pueden presentar poros que permiten el paso del citoplasma, incluyendo a sus organelos, estableciendo así, la continuidad citoplásmica dentro de la hifa. Las hifas crecen por extensión apical o de las puntas y se multiplican por ramificación. En los extremos de estas células es donde se lleva a cabo la asimilación de nutrientes del medio y la excreción de las hidrolasas que son enzimas extracelulares necesarias para la degradación de una gran variedad de substratos complejos (Herrera *et al.*, 1990).

Los hongos filamentosos son comúnmente conocidos como el crecimiento que aparece frecuentemente sobre las frutas y los alimentos donde se les da el nombre de moho. El término moho es un nombre común que carece de significación taxonómica y se aplica a

una variedad de hongos que crecen como organismos semi-microscópicos, cuyo micelio tiende a formar una red suelta en lugar de un tejido denso. Es en esto en que los mohos u hongos filamentosos se distinguen de los grandes hongos carnosos, como las setas comestibles o los champiñones. Los mohos pueden pertenecer a cualquier clase de hongo, pero la mayoría de las especies son Ficomietos u hongos imperfectos (Deuteromicetos). Los mohos más comunes pertenecen a las especies de *Aspergillus* o *Penicillium*. Los hongos filamentosos se reproducen por esporas o conidias y se distinguen por las características de los tallos que soportan las esporas y los conidióforos. En los *Aspergillus* el conidióforo se eleva a partir de una célula del micelio vegetativo, llamada célula pie, que tiene una pared más gruesa que la del micelio vegetativo, y cuando las esporas se esparcen comúnmente se mantiene vacío, es decir no contiene protoplasma. El tallo del conidióforo no está septado y termina en una parte hinchada llamada la vesícula. A partir de esta expansión las conidias se forman en cadenas de esporas cuyo segmento inicial se denomina sterigmata. En ocasiones la sterigmata está ramificada y las esporas que se alzan a partir de las ramificaciones se denominan sterigmata secundarias. Las esporas maduras se dispersan en el ambiente y en condiciones adecuadas dan origen a otra colonia de hongos (Herrera *et al.*, 1990).

Taxonómicamente los hongos están agrupados en el reino Fungi, la clasificación dentro del reino es complicada y se basa principalmente en el tipo de estructuras reproductoras que se forman tanto en los ciclos sexuales como asexuales. En forma más precisa: la presencia de ciclo sexual, el tipo de estructuras reproductoras, el número de grupos de complementación y la presencia o ausencia de septos, son los principales caracteres para

clasificar a los hongos en tres grandes grupos, a saber: *Myxomycota* (hongos mucilaginosos), *Eumycota* (hongos verdaderos) y *Lichens* (hongos simbiotes). El grupo *Eumycota* se divide a su vez en cuatro grupos que son *Ascomycetos*, *Basidiomicetos*, *Ficomycetos* y *Deuferomicetos* (Herrera *et al.*, 1990). Los Deuteromicetos y los Ascomycetos son hongos filamentosos, de los cuales el género más abundante es *Aspergillus*. En su mayoría no forman cuerpos fructificantes o basidiocarpos, sino que crecen exclusivamente en forma de micelios. Han sido considerados por largo tiempo organismos ideales para el estudio de las características fisiológicas y genéticas de los eucariontes debido a su fácil manipulación en laboratorio, su capacidad para crecer en medios químicamente definidos de bajo costo y a su rapidez de crecimiento que permite obtener vanas generaciones en poco tiempo. Además de que, tradicionalmente, se han utilizado a algunos de estos microorganismos para fermentar alimentos y como productores de antibióticos y enzimas hidrolíticas (Wessels, 1999).

Los hongos filamentosos como *A. niger* son organismos saprófitos, por lo que secretan una gran variedad de enzimas que les permiten la asimilación de polímeros complejos de tejidos animales y vegetales, que utilizan como fuentes de carbono y nitrógeno. Sin embargo, para un hongo es eficiente sintetizar continuamente todas las enzimas hidrolíticas para sobrevivir.

Hay muchos compuestos comerciales producidos por hongos (Tabla 1), sin embargo, el compuesto producido por estos organismos con mayor demanda a nivel mundial es el ácido cítrico. Se producen anualmente 1.75 millones de toneladas de ácido cítrico con un valor de 1,600 millones de dólares. El hongo utilizado para este proceso es

Aspergillus niger debido a su capacidad de secretar grandes cantidades de este metabolito (Soccol *et al.* 2006).

Compuesto comercial	Organismo	Área de aplicación principal
Ácido cítrico	<i>Aspergillus niger</i>	Alimentos y bebidas
Ácido itacónico	<i>Aspergillus terreus</i>	Industria de polímeros
Alfa-amilasa	<i>Aspergillus niger, Aspergillus Oryzae</i>	Procesamiento de almidón e industria de los alimentos
Quimosina	<i>Aspergillus niger</i>	Industria alimentaria
Celulasa	<i>Trichoderma viride, Trichoderma reesei.</i>	Industrias textil y papelera
Glucamilasa	<i>Aspergillus phoenices, Rhizopus delemar</i>	Procesamiento de almidón
Glucosa oxidase	<i>Aspergillus niger, Aspergillus Oryzae</i>	Industria textil
Lacasa	<i>Trametes versicolor</i>	Industrias textil y papelera
Cefalosporina	<i>Acremonium chrysogenum</i>	Industria farmacéutica
Ciclosporina	<i>Tolycladium nivenum</i>	Industria farmacéutica
Griseofulvina	<i>Penicillium griseofulvum</i>	Industria farmacéutica
Lovastatina	<i>Monascus rubber, Aspergillus terreus</i>	Industria farmacéutica
Vacunas (Hepatitis B y papiloma humano)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Industria biotecnológica y de salud humana
Taxol	<i>Taxomyces andreae</i>	Industria farmacéutica

Tabla 1 Algunos compuestos comercialmente importantes producidos por hongos (Meyer, 2008)

Una desventaja en la producción de los compuestos referidos en la tabla 1 es la variabilidad que presentan los hongos en su capacidad metabólica, de tal manera que la transformación genética representa una alternativa para el mejoramiento de los rendimientos en la producción de metabolitos de interés.

6.8. *Aspergillus niger*

A. niger es el hongo filamentoso más utilizado en la industria debido a sus notables capacidades metabólicas. Sus usos a nivel comercial van desde la producción de grandes cantidades de ácido cítrico, ácido glucónico y enzimas como las amilasas, hasta la producción de proteínas heterólogas como la quimosina y el interferón humano (Andersen *et al.*, 2008). Además, el género *Aspergillus* tiene una larga participación en la elaboración de alimentos y en la actualidad se le considera un microorganismo “generalmente reconocido como seguro” (GRAS por sus siglas en inglés). Esto último constituye una gran ventaja para la aceptación de los compuestos producidos para alimentación tanto de animales como de seres humanos.

A. niger es un microorganismo muy utilizado en biotecnología dada su habilidad de secretar grandes cantidades de una gran variedad de ácidos orgánicos y de enzimas necesarias para la hidrólisis de biopolímeros, entre ellas, celulasas. El genoma de *A. niger* está organizado en 8 cromosomas, con un tamaño total de 33,9 Mb, un contenido de guanina-citosina del 50,4% y 14.165 genes que codifican para proteínas, de los cuales 35 codifican para celulasas (tabla 2). Cada gen tiene una longitud promedio de 1.572 pb y 2,57 intrones (tamaño promedio de un intrón: 97 pb; tamaño promedio de un exón: 370 pb).

Familia	Función Trichoderma	<i>Trichoderma reeset</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>Neurospora crassa</i>
GH6	Celulasa	1	2	2	3
GH7	Celulasa	2	2	3	5
GH12	Celulasa	2	4	1	1
GH45	Celulasa	1	0	1	1
GH61	Celulasa	3	7	9	14
GH1	β -glucosidasa	2	3	3	1
GH3	β -glucosidasa	13	17	20	9
Total		24	35	39	34

Tabla 2 Número de genes que codifican para enzimas celulolíticas en *Aspergillus niger* y en otros modelos
Fuente: Kubicek

7. PROCEDIMIENTO Y DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES

7.1. Cepas utilizadas

- Las cepas de *Aspergillus niger* fueron proporcionadas por la Dra. Ara Itzel Pérez de los Santos Mondragón del CINVESTAV, Unidad Irapuato.
 - *A. niger* WT (Silvestre)
 - *A. niger* 21G (Transformante)
 - *A. niger* 66M (Mutante por UV derivada de la 21G)
 - *A. niger* 3M (Mutante por UV derivada de la 21G)

7.2. Medio de cultivo

En este proyecto se probó la esporulación de las cepas 1 M II 3 y 1 M II 66 que son provenientes de la transformante 21G. Las cepas crecieron en medio LPE (Medio de esporulación-mantenimiento, modificado; Le *et al.*, 1946) durante 5 días a 28°C.

7.3. Mutagénesis por UV

Se colectaron esporas frescas de cada mutante a irradiar resuspendidas en agua desionizada y se contaron en cámara de Neubauer.

Se utilizó una concentración de 1×10^3 esporas/mL y se colocaron 500 μ L en cajas Petri (60x15 mm) para ser irradiadas con la lámpara de UV (240 nm) a una distancia de 25 cm hasta 5 minutos con intervalos de 0, 1, 2 y 3. Después de la irradiación de las esporas, se dejaron 30 minutos de periodo de recuperación y posteriormente se plaquearon utilizando perlas de vidrio en placas de PDA con Carbenicilina (1 mg/mL). Todo esto en oscuridad.

Se incubaron a 28°C durante dos días en oscuridad. Posterior a ese tiempo de incubación, se descartan los tiempos donde el índice de supervivencia es mayor al 10% y el resto de las mutantes se dejan crecer hasta formación de esporas. Solo las mutantes que esporulan son las que se plaquean en PDA.

7.4. Bioensayo para determinar la actividad de celulasas y xilanasas

Se realizaron bioensayos para ver la actividad de cada una de las mutantes con el fin de seleccionar la que mayor actividad tuviera en comparación con la transformante 21G y la silvestre WT.

Se preparó medio CMC (carboximetilcelulosa) y xilano como se muestra en la tabla 6. Se inocularon en cajas cuadradas de 23 x 23 cm con 200 mL de cada medio y se dejó por 5 días a 28°C. Se seleccionaron las que mayor tuvieron actividad celulolítica y xilanolítica en comparación con la silvestre (WT), transformante (21G) y mutantes (3 y 66).

CMC /Xilano	10 g/L
Extracto de levadura	5 g/L
NaNO ₃	1 g/L
KH ₂ PO ₄	1 g/L
Peptona de caseína	1 g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.3 g/L
Agar para hongos	20 g/L
Ajustar pH: 5.5. para CMC y 5 para Xilano	

Tabla 3 Medio CMC y xilano

7.4.1. Tinción con Rojo Congo para determinar actividad celulolítica y xilanolítica

Se preparó una solución de rojo congo al 0.1 % y se vertió en cada una de las placas hasta cubrir por completo y se dejó por 1 hora. Después se retira la solución de rojo congo y posteriormente se lavó con NaCl 1 M por 15 minutos en agitación constante. Se midió el halo de cada una de las mutantes y se graficó. Se seleccionaron las mutantes que tuvieron mayor actividad relativa (celulolítica y xilanolítica) comparándolas con la WT, 21G, 3M y 66M para una posterior radiación.

7.5. Fermentación de mutantes de A. niger

Se realizó un par de fermentaciones con algunas de las mutantes que tuvieron mayor actividad en comparación de las ya mencionadas.

Los preinóculos de las cepas 21 G, WT y 1.7 se cultivaron con las siguientes condiciones:

- Medio YPD (250 mL)
- Esporas (21 G, 66M, 3M, WT, 1.7)
- 30°C
- 200 rpm
- 2 días
- Matraz Erlenmeyer de 500 mL

Para el inóculo se utilizó el medio Czapeck (tabla 4) y medio Czapeck + bagazo de agave de *A. tequilana var. Weber* proporcionado por la Dra. Mercedes López Pérez, se inoculó 1 g de micelio de cada cepa en matraces de 250 mL con un volumen de operación de 50 mL y con las mismas condiciones del preinóculo. Las muestras se tomarón cada 24 hrs en condiciones estériles, tomando 1 mL y posteriormente se midió la actividad de cada una de las mutantes, transformante y silvestre.

Cabe mencionar que se realizaron dos fermentaciones con bagazo. Uno el bagazo crudo que fue esterilizado en la autoclave y licuado y el segundo fue el bagazo ya procesado.

Medio Czapeck	
NaNO₃	2 g/L
KCl	0.50 g/L
MgSO₄	0.50 g/L
FeSO₄	0.01 g/L
K₂SO₄	1 g/L
Sacarosa	30 g/L
Agar Agar	12 g/L
pH: 6,8 ± 0,2	

Tabla 4 Composición del medio czapeck

Los azúcares reductores se midieron mediante la técnica de DNS para tener indicios de la presencia de glucosa residual en el medio de cultivo. La fermentación se llevó a cabo por 72 y 168 horas midiendo la cantidad de azúcares reductores siguiendo la lógica del esquema que se presenta en la figura 2.

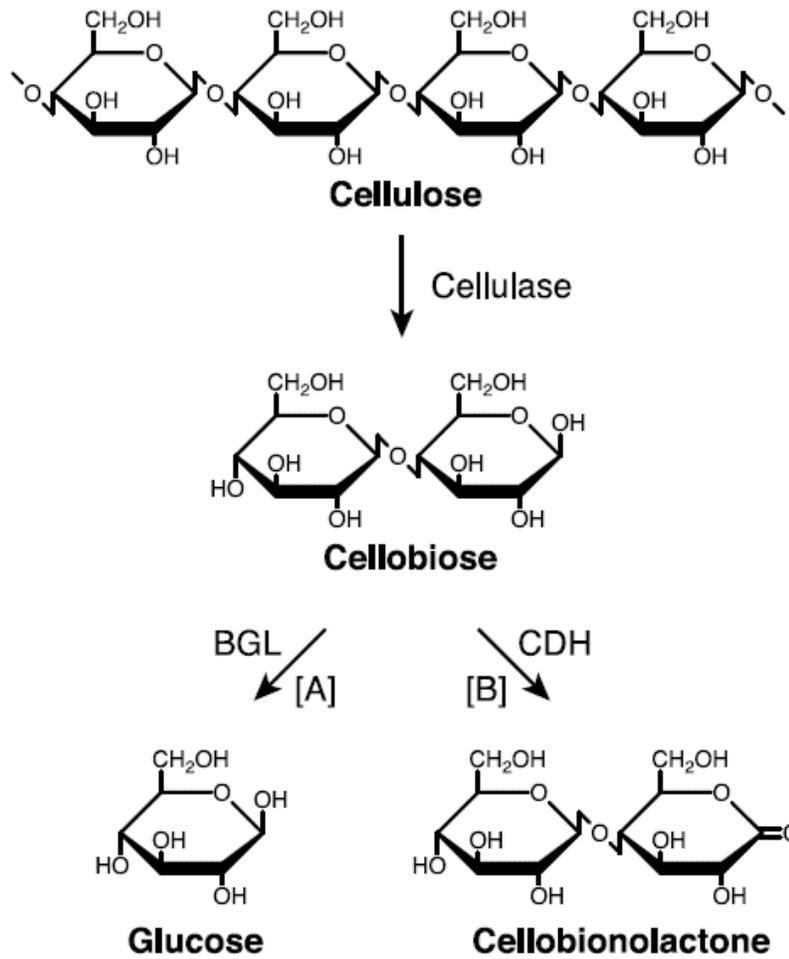


Fig. 2 Degradación de celulosa por medio de celulosa y B-glucosidasa (Yoshida et al.2004)

En nuestro medio de cultivo no tenemos fuente de glucosa que reaccione con los azúcares reductores, entonces, de acuerdo a la figura 3, si la celulasa y la β -glucosidasa que estamos expresando se encuentran funcionando en el sistema, tenemos que ser capaces de medir glucosa como producto de degradación de la celulosa.

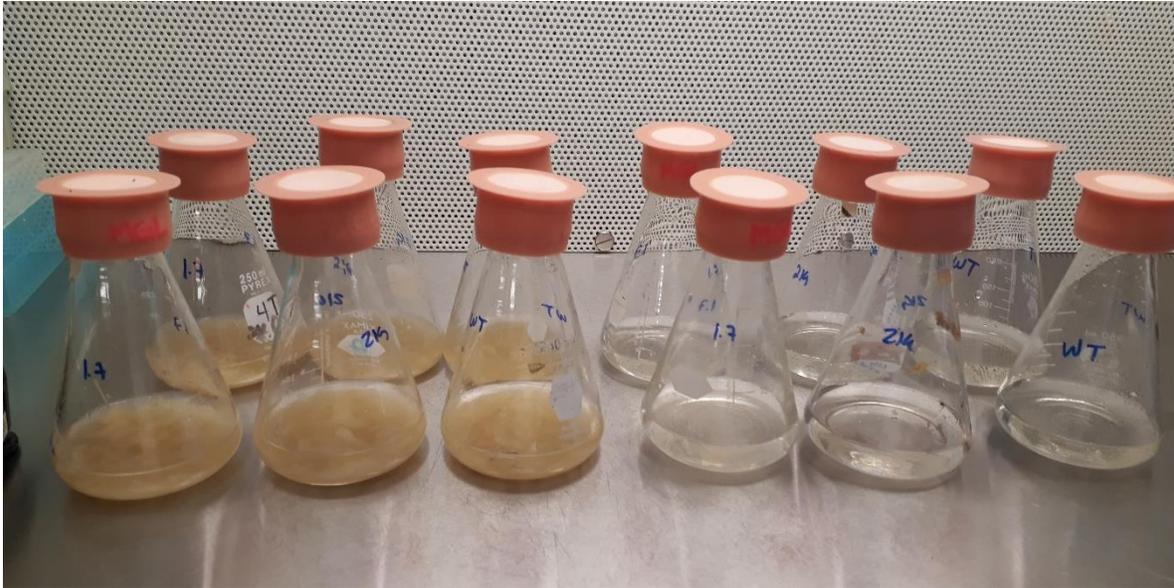


Fig. 3 Fermentación con medio czapeck y czapeck + bagazo de agave de A. tequilana var. Weber sin procesar



Fig. 4 Fermentación con medio czapeck y czapeck + bagazo de agave de A. tequilana var. Weber procesado

8. RESULTADOS

8.1. Mutagénesis por UV

La irradiación en las mutantes fue eficiente para la actividad relativa de celulasa y xilasa. sin embargo, no todas las mutantes tienen una alta actividad en comparación con la 21G, 33M, 66M y la silvestre WT.

En el primer bioensayo ya estandarizado los resultados de la tercera mutagénesis fueron que, en comparación con las mutantes, transformantes y WT, la mutante 8, 9, 12 y 17 tuvieron mayor actividad celulolítica, estas provenientes de la segunda mutagénesis de la 3M figura 5. En diferencia con la mutagénesis de la 66M, las únicas mutantes que tuvieron mayor actividad celulolítica en comparación de la mutante proveniente fueron la 4 y 7 figura 6, sin embargo, no fue suficiente la actividad relativa en comparación con la segunda mutagénesis que ya estaban realizadas.

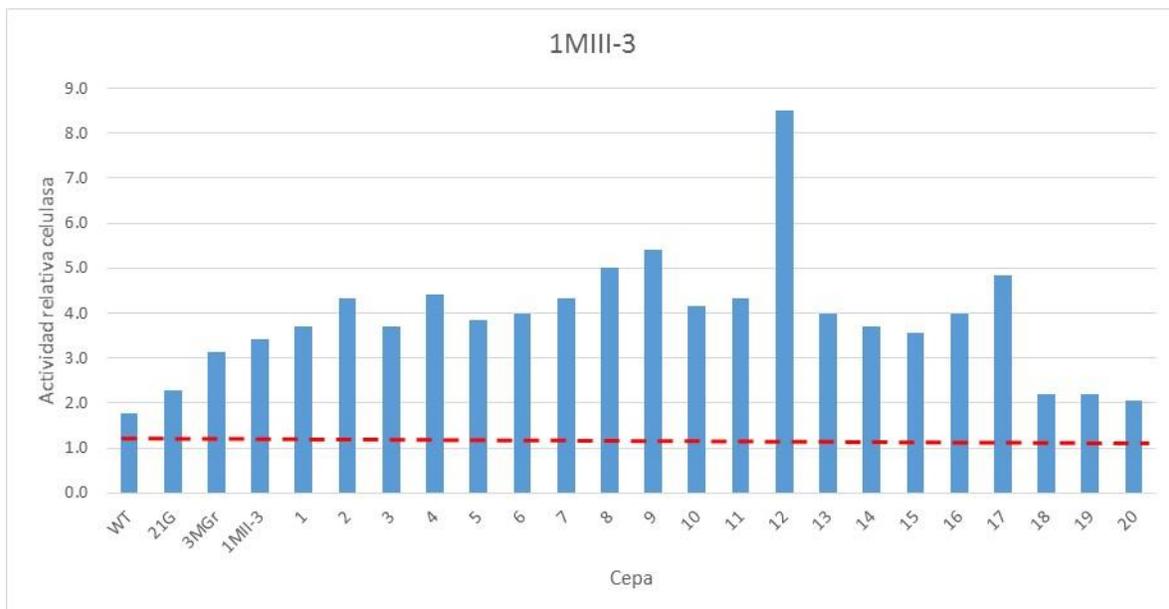


Fig. 5 Determinación de la actividad relativa celulasa utilizando medio Carboximetilcelulosa (CMC) como única fuente de carbono de la mutante 1 M II- 3 a 28°C

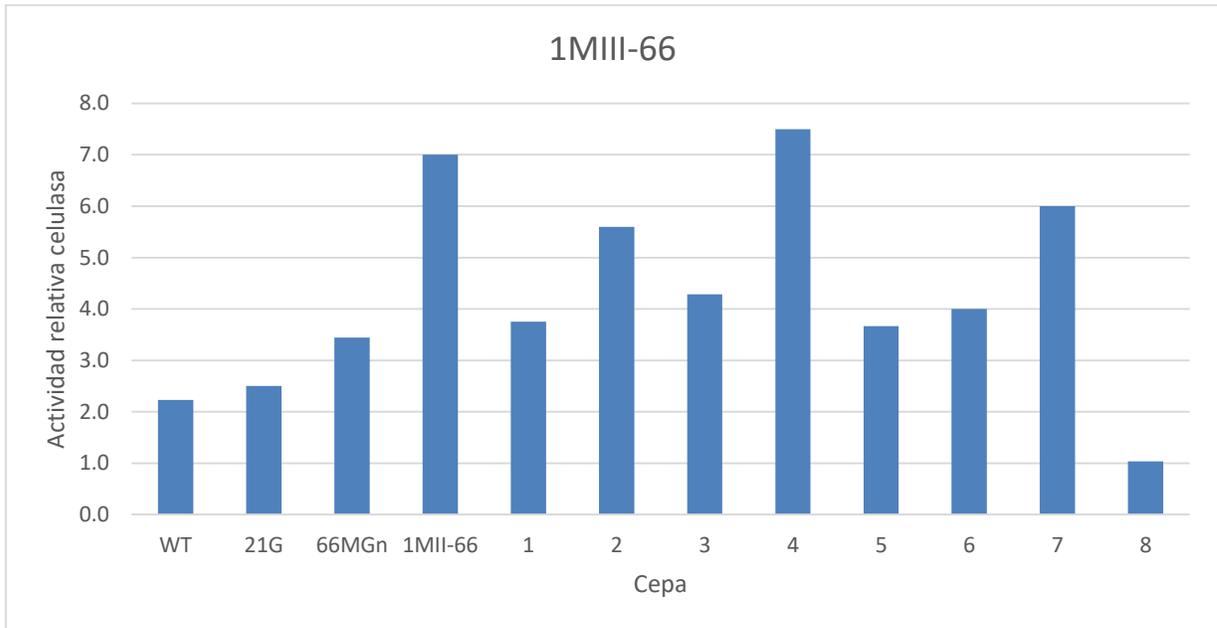


Fig. 6 Determinación de la actividad relativa utilizando medio Carboximetilcelulosa (CMC) como única fuente de carbono de la transformante 1 M II- 66 a 28°C

Por lo anterior podemos decir que al menos para estas mutantes 8, 9 y 17 de la 3M y la 4 y 7 de la 66M, el sistema de genes que se encargan de la degradación de celulosa se encuentran activos.

8.2.1. Segundo bioensayo

El segundo bioensayo se realizó con la finalidad de corroborar las mutantes que tuvieron mayor actividad y de esas mismas seleccionar la mejor. Se recolectaron esporas frescas, cabe mencionar que no todas las cepas esporularon en el medio LPE. Utilizando solo las que esporularon se obtuvieron los siguientes resultados en las placas de CMC y xilano.

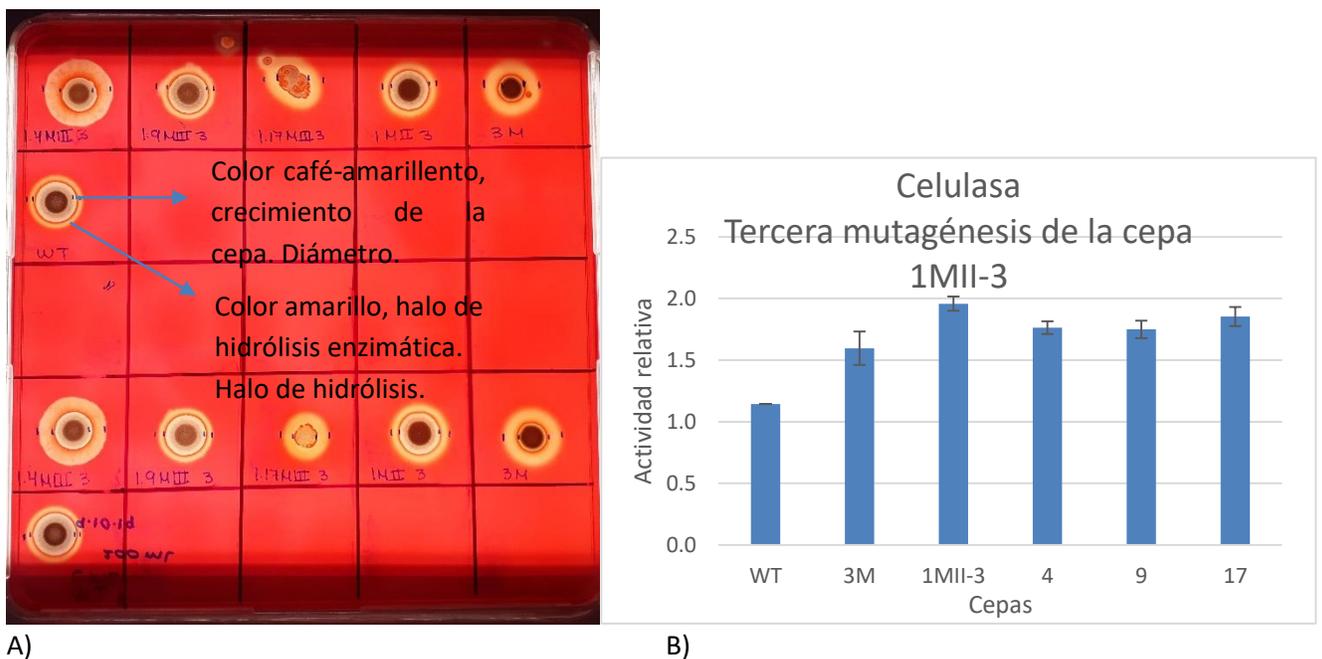


Fig. 7 Panel A. Bioensayo para determinar la actividad relativa de celulasa. Comparación entre 1er mutagénesis, 2a mutagénesis y 3er mutagénesis derivadas de la transformante 21G de la mutante 3M en medio CMC, empleando Rojo Congo al 0.1%. Panel B. Actividad relativa de celulasa en comparación entre 1er mutagénesis, 2a mutagénesis y 3er mutagénesis derivadas de la transformante 21G en medio CMC.

Por la figura 7b, de acuerdo a la desviación representada las mutantes 4, 9 y 17 no tuvieron diferencia estadística con la 1MII-3.

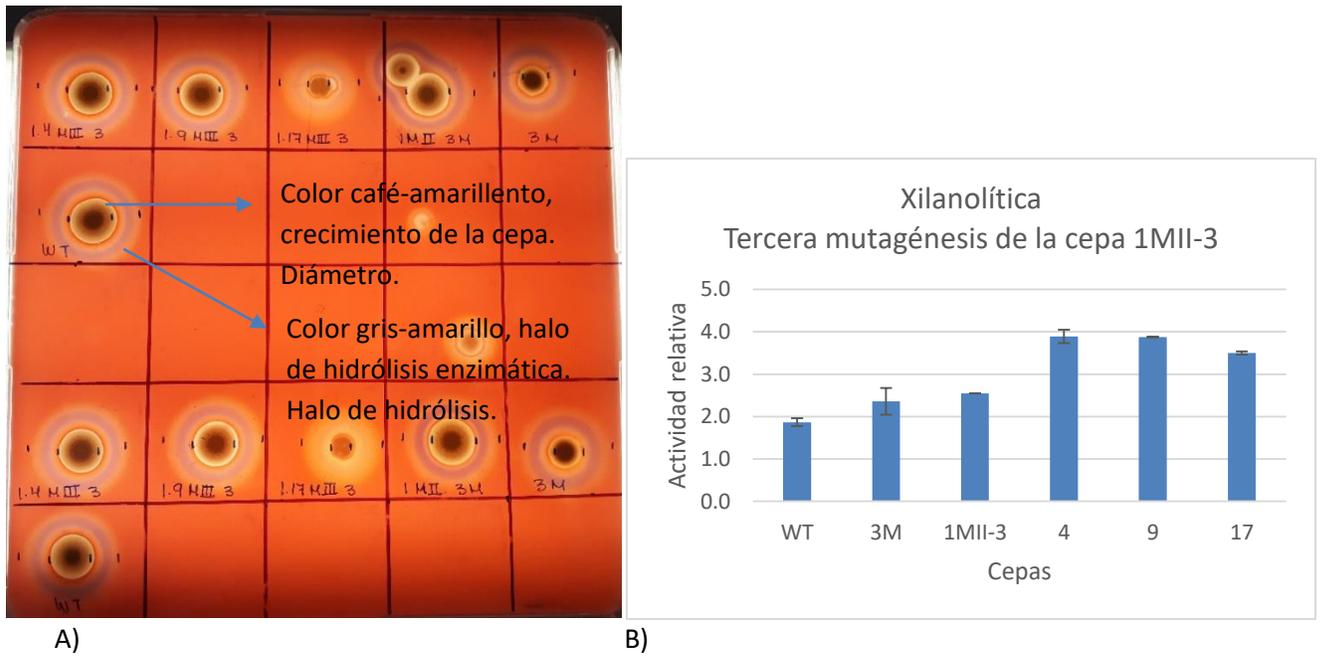
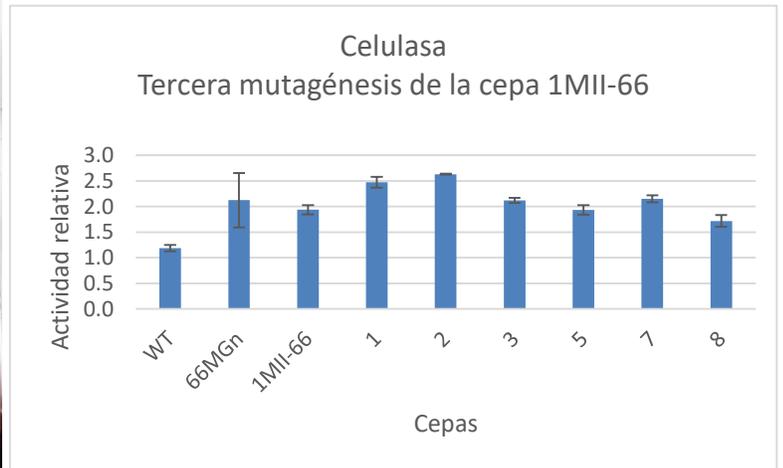


Fig. 8 Panel A. Bioensayo para determinar la actividad relativa de xilanasas. Comparación entre 1er mutagénesis, 2a mutagénesis y 3er mutagénesis derivadas de la transformante 21G de la mutante 3M en medio CMC, empleando Rojo Congo al 0.1%. Panel B. Actividad relativa de celulasas en comparación entre 1er mutagénesis, 2a mutagénesis y 3er mutagénesis derivadas de la transformante 21G en medio CMC.

En la figura 8b, la actividad relativa xilanolítica en la cepa 4 se obtuvo mayor desviación en comparación a la mutante 1MII-3 proveniente de la segunda mutagénesis.



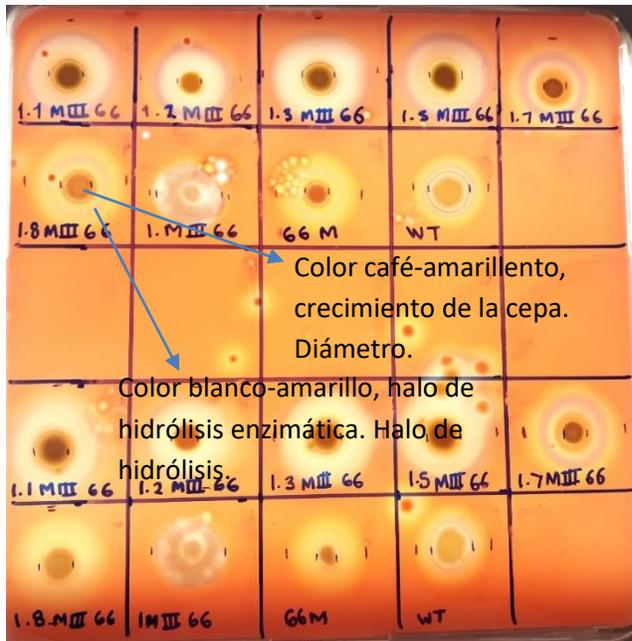
A)



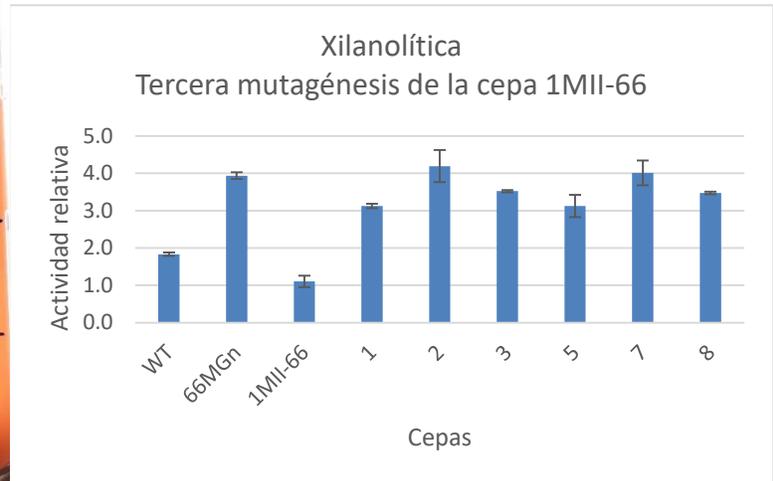
B)

Fig. 9 Panel A. Bioensayo para determinar la actividad relativa de celulasa. Comparación entre 1er mutagénesis, 2a mutagénesis y 3er mutagénesis derivadas de la transformante 21G de la mutante 66M en medio CMC, empleando Rojo Congo al 0.1%. Panel B. Actividad relativa de celulasa en comparación entre 1er mutagénesis, 2a mutagénesis y 3er mutagénesis derivadas de la transformante 21G en medio CMC.

En la figura 9b, la actividad celulolítica prevalece en las cepas de la tercera mutagénesis sin incrementos significativos en comparación con la mutante 66M.



A)



B)

Fig. 10 Panel A. Bioensayo para determinar la actividad relativa de xilanas. Comparación entre 1er mutagénesis, 2a mutagénesis y 3er mutagénesis derivadas de la transformante 21G de la mutante 66M en medio CMC, empleando Rojo Congo al 0.1%. Panel B. Actividad relativa de celulasa en comparación entre 1er mutagénesis, 2a mutagénesis y 3er mutagénesis derivadas de la transformante 21G en medio CMC.

En la figura 10b, la actividad relativa xilanólítica en las mutantes de la 66 no hubo mayor diferencia estadística en comparación con la 66M.

8.2.2. Tercer bioensayo

Para una última mutagénesis se realizó un tercer bioensayo en el cual se utilizaron sólo las mutantes que lograron esporular.

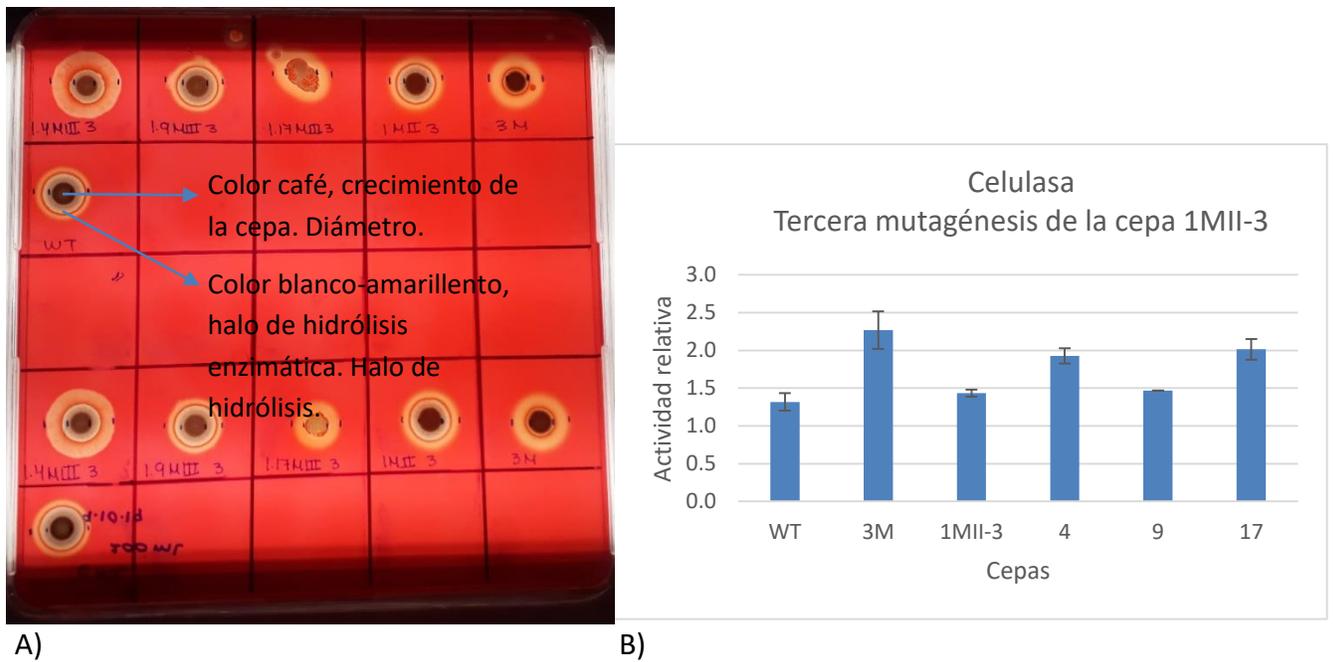


Fig. 11 Panel A. Bioensayo para determinar la actividad relativa de celulasa. Comparación entre 1er mutagénesis, 2a mutagénesis y 3er mutagénesis derivadas de la transformante 21G de la mutante 3M en medio CMC, empleando Rojo Congo al 0.1%. Panel B. Actividad relativa de celulasa en comparación entre 1er mutagénesis, 2a mutagénesis y 3er mutagénesis derivadas de la transformante 21G en medio CMC.

En la figura 11b, la actividad relativa xilanólítica en las mutantes de la tercera mutagénesis fue baja en comparación con la 3M, no hubo diferencia significativa.

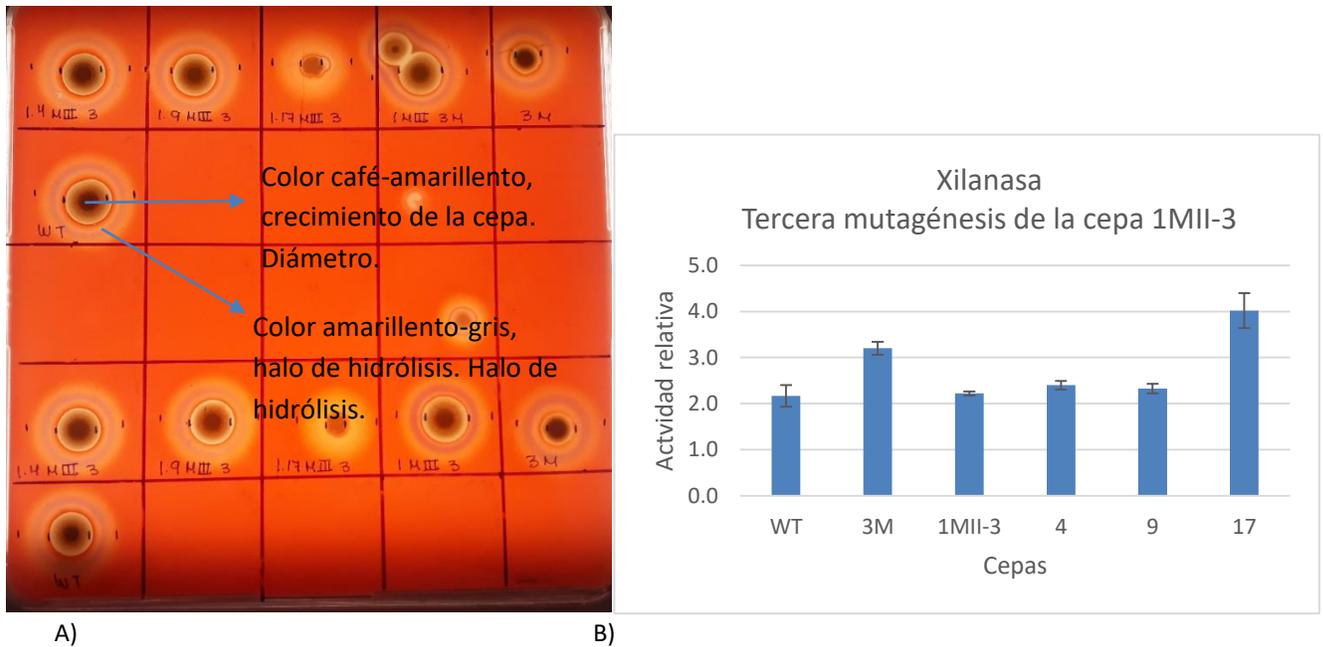
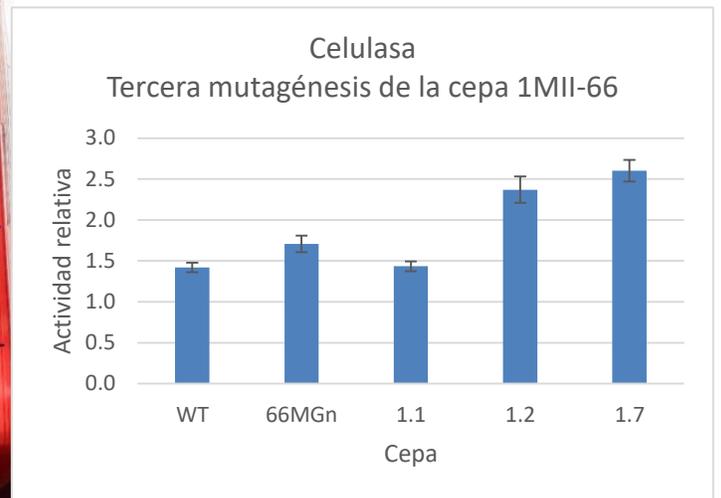


Fig. 12 Panel A. Bioensayo para determinar la actividad relativa de xilanasas. Comparación entre 1er mutagénesis, 2a mutagénesis y 3er mutagénesis derivadas de la transformante 21G de la mutante 3M en medio CMC, empleando Rojo Congo al 0.1%. Panel B. Actividad relativa de celulasa en comparación entre 1er mutagénesis, 2a mutagénesis y 3er mutagénesis derivadas de la transformante 21G en medio CMC.

En la figura 12b, la actividad xilanólítica en la mutante 17 tuvo mayor diferencia estadística en comparación con la 3M y la silvestre WT.



A)



B)

Fig. 13 Panel A. Bioensayo para determinar la actividad relativa de celulasa. Comparación entre 1er mutagénesis, 2a mutagénesis y 3er mutagénesis derivadas de la transformante 21G de la mutante 66M en medio CMC, empleando Rojo Congo al 0.1%. Panel B. Actividad relativa de celulasa en comparación entre 1er mutagénesis, 2a mutagénesis y 3er mutagénesis derivadas de la transformante 21G en medio CMC.

En la figura 13b, la actividad relativa celulolítica en la mutante 1.7 fue mayor a la 66M y la silvestre WT, teniendo diferencia estadística en comparación con las cepas mencionadas.

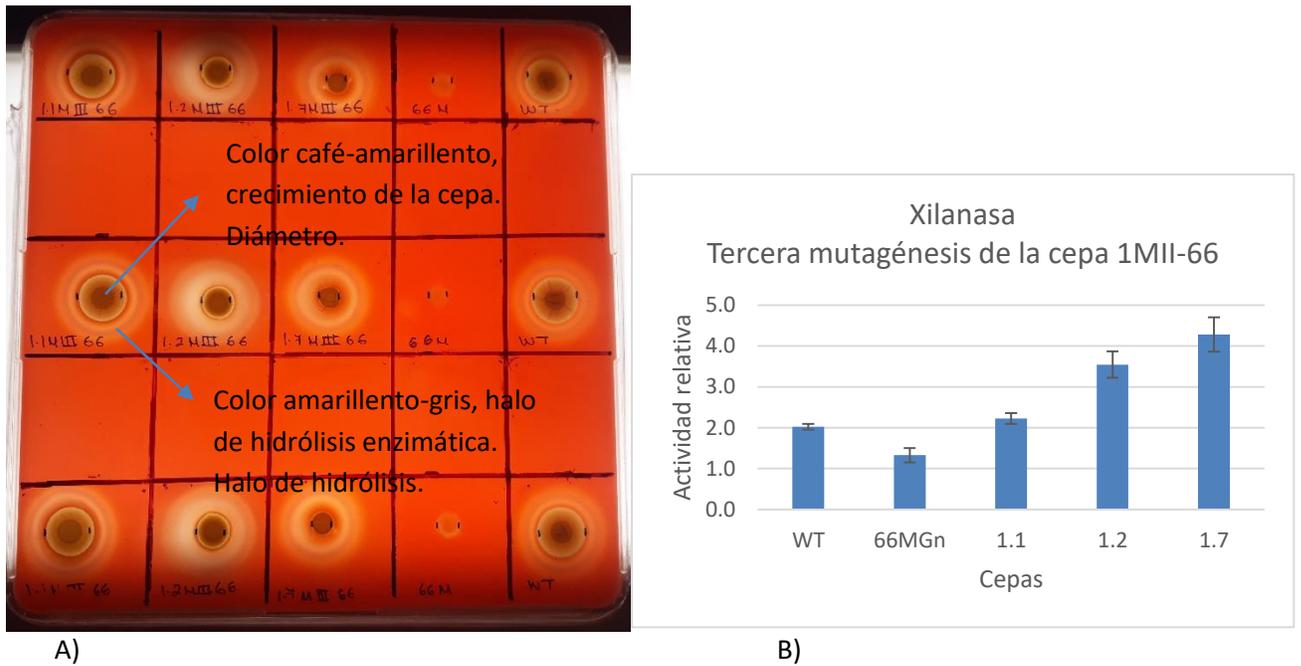


Fig. 14 Panel A. Bioensayo para determinar la actividad relativa de xilanasas. Comparación entre 1er mutagénesis, 2a mutagénesis y 3er mutagénesis derivadas de la transformante 21G de la mutante 66M en medio CMC, empleando Rojo Congo al 0.1%. Panel B. Actividad relativa de celulasas en comparación entre 1er mutagénesis, 2a mutagénesis y 3er mutagénesis derivadas de la transformante 21G en medio CMC.

En la figura 14b, la actividad xilanólítica en la mutante 1.7 tuvo mayor diferencia significativa en comparación con la mutante 66M y la silvestre WT.

La mutante que mayor actividad relativa celulolítica y xilanólítica fue la 1.7 en comparación con la silvestre WT, transformante, mutante 33M y 66M figura 11, 12, 13 y 14.

8.3. Fermentación

8.3.1. Primera fermentación con bagazo de agave sin procesar

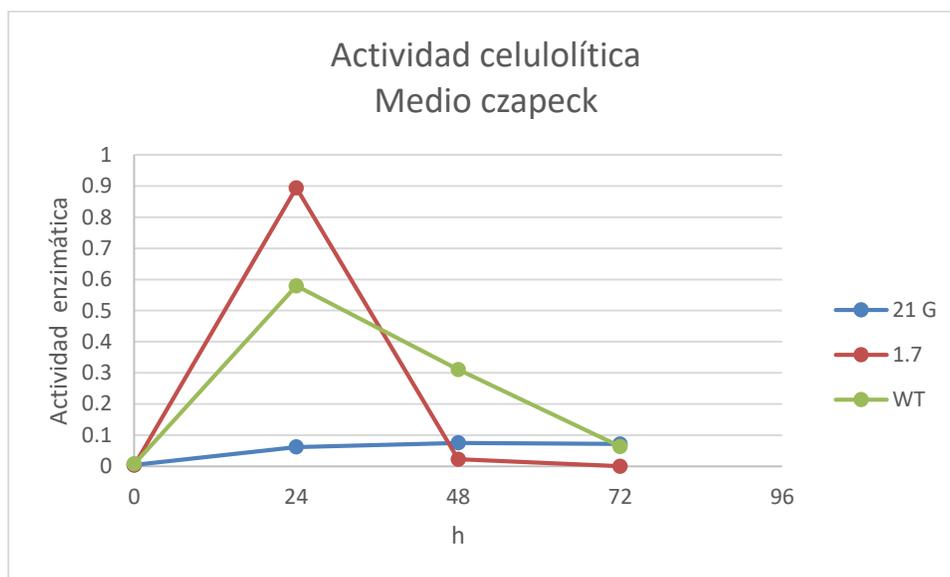


Fig. 15 Actividad celulolítica en medio Czapeck

Como se muestra en las figuras 15, 16, 17 y 18 la mayoría de las cepas analizadas presentaron más azúcares reductores en el medio de cultivo czapeck en comparación con el medio czapeck + bagazo de agave *A. tequilana* var. *Weber* sin procesar. Siendo la mutante 1.7 la que presenta mayor cantidad de azúcares reductores a las 24 horas del proceso de fermentación (fig 15).

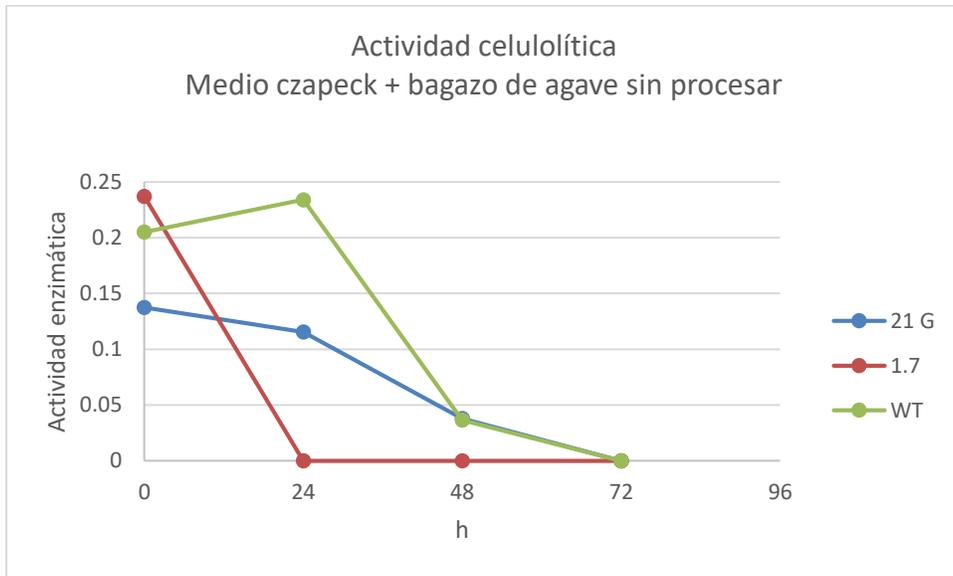


Fig. 16 Actividad celulolítica en medio Czapeck + bagazo de agave sin procesar

La composición del medio tuvo un efecto positivo en la actividad celulolítica de las cepas mutantes evaluadas, lo que cual se evidenció en los valores de actividad enzimática en el tiempo cero (fig 16) determinados en el medio Czapeck adicionado con bagazo de agave sin procesar.

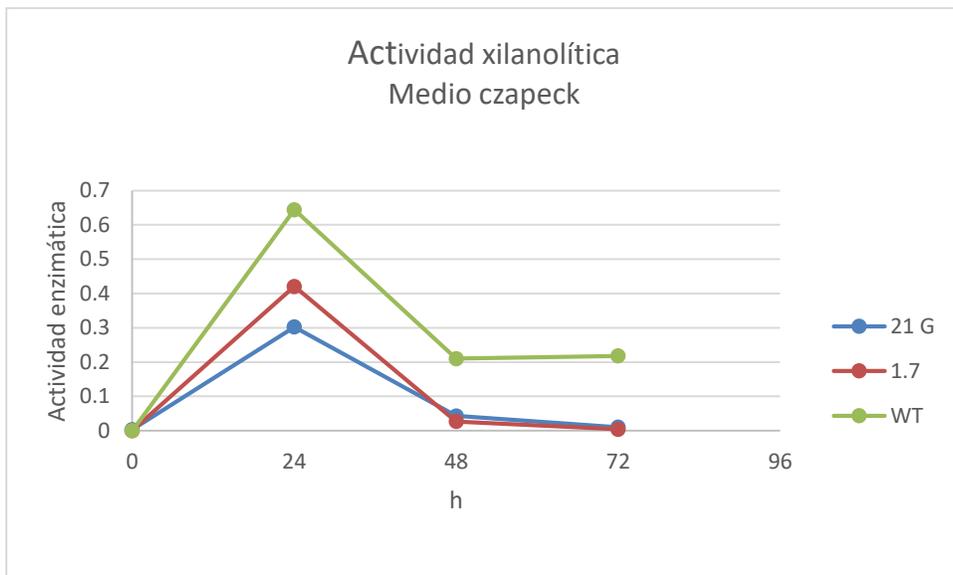


Fig. 17 Actividad xilanolítica en medio Czapeck

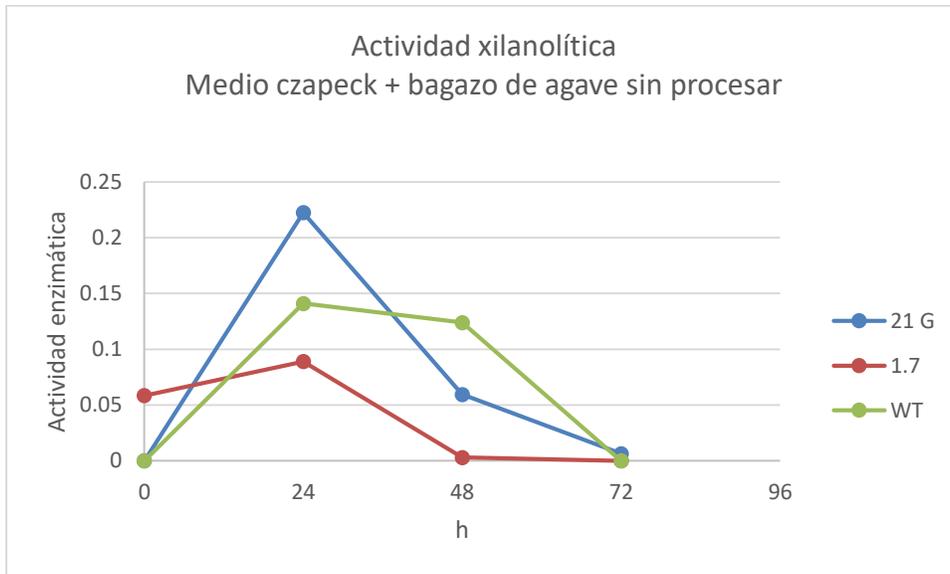


Fig. 18 Actividad xilanólítica en medio czapeck + bagazo de agave sin procesar

La actividad xilanólítica respecto al medio utilizado no hay tanta diferencia ya que de las 24 a 48 horas se comportaron muy parecidas, destacando que la cepa 1.7 si presentó actividad xilanólítica al tiempo cero (fig 18).

8.3.1 Fermentación con bagazo de agave procesado

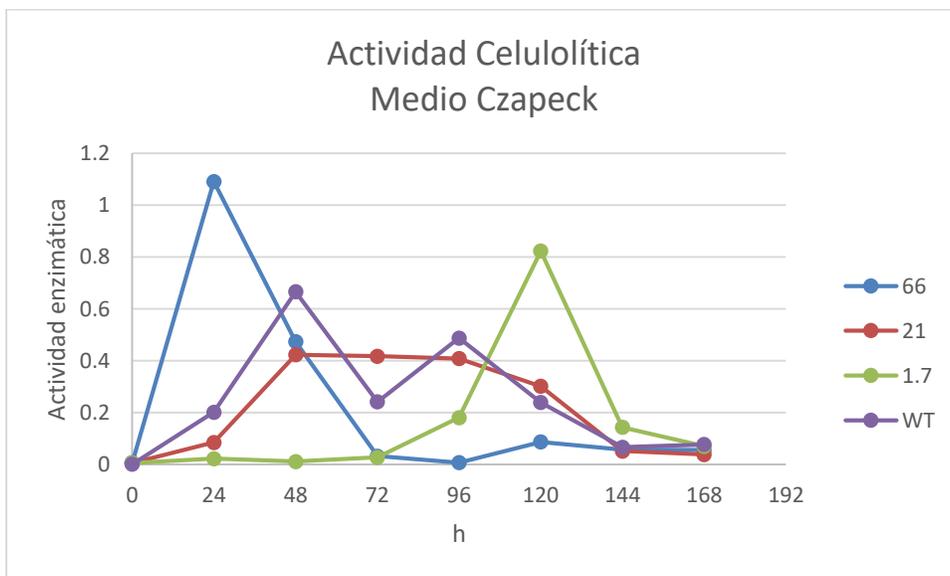


Fig. 19 Actividad celulolítica en medio czapeck

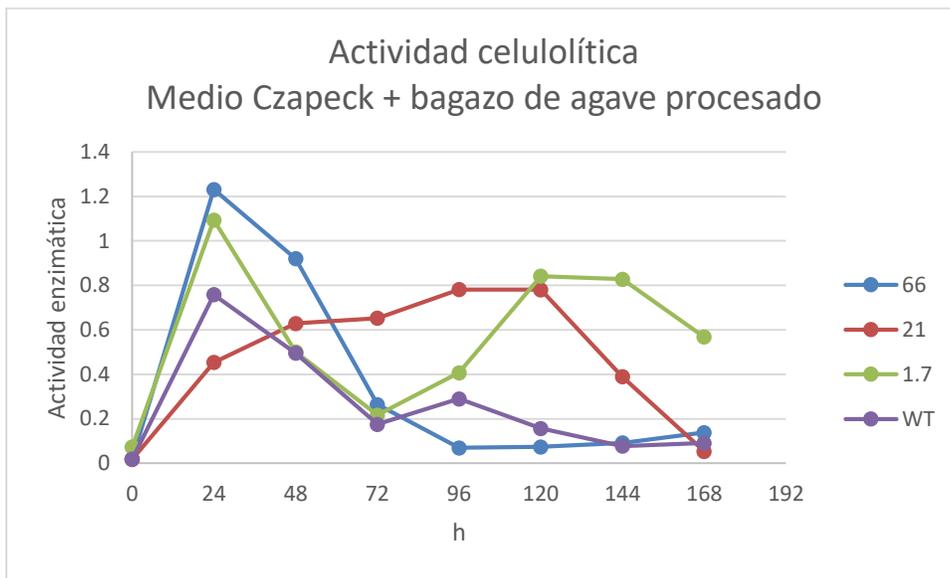


Fig. 20 Actividad celulolítica en medio czapeck + bagazo de agave procesado

La actividad de las mutantes con el bagazo de agave procesado tuvo diferencia en comparación con la primera fermentación, aunque de igual manera tuvo mayor actividad a las 24 horas, no en todas las mutantes dejó de mantenerse la actividad celulolítica.

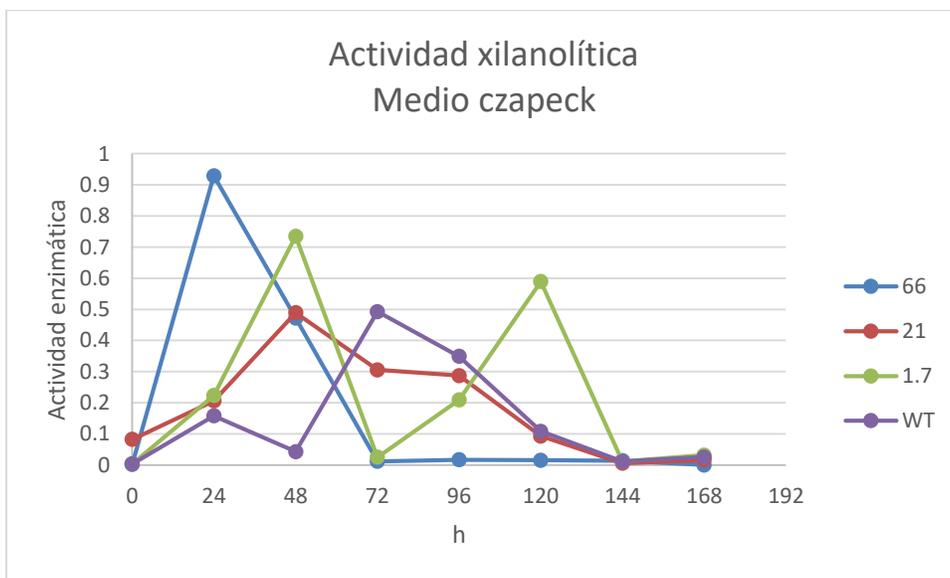


Fig. 21 Actividad xilanolítica en medio czapeck

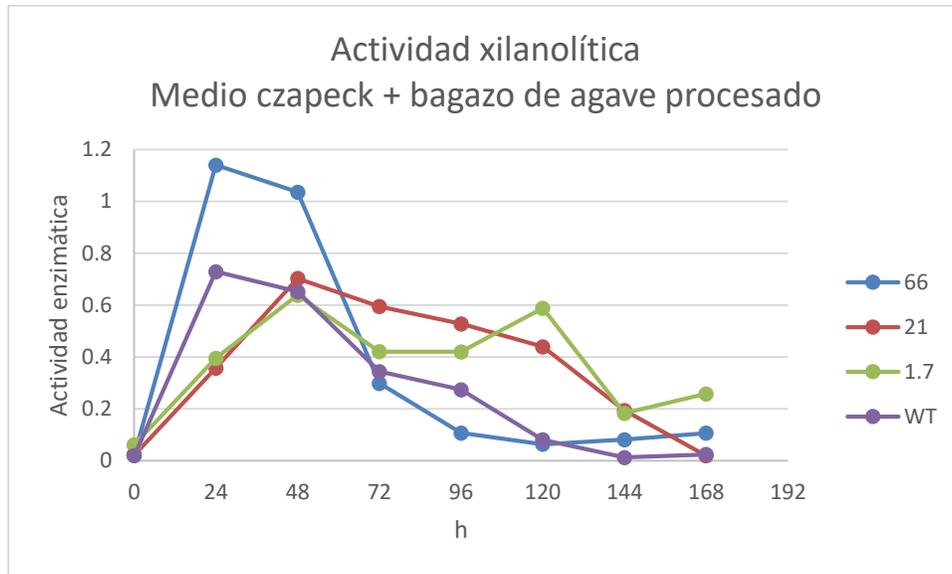


Fig. 22 Actividad xilanólica en medio czapeck + bagazo de agave procesado

El comportamiento de las mutantes respecto a la actividad xilanólica fue mayor dentro de 24 y 96 horas de la fermentación, se puede decir que el bagazo de agave procesado induce mayor actividad en las mutantes.

9. CONCLUSIONES

- Las radiaciones UV pueden aumentar la actividad relativa celulolítica y xilanolítica.
- No todas las mutantes pueden ser sobre productoras de enzimas hidrolíticas.
- El bagazo de agave *A. tequilana* var. *Weber* ya procesado puede servir como sustrato para ver la actividad relativa celulolítica y xilanolítica

10. COMPETENCIAS DESARROLLADAS

- Organización y planificación en el trabajo
- Responsabilidad
- Conocimiento de la disciplina
- Habilidades y destrezas en el área de trabajo
- Trabajo en equipo

11. FUENTES DE INFORMACIÓN

1. 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
2. Andersen, MR., Nielsen, ML. & Nielsen, J. (2008). Metabolic model integration of the bibliome, genome, metabolome and reactome of *Aspergillus niger*. *Molecular Systems Biology*, 4(178).
3. Anthony T., Chandra, Raj, K., Rajendran, A. & Gunasekaran, P. (2003). High molecular weight cellulase - free xylanase from alkali - tolerant *Aspergillus fumigatus* AR 1. *Enzyme and Microbial Technology* 32, 647-654.
4. Aust, S. D. (1995). Mechanisms of degradation by white rot fungi. *Environ Health Perspect.* 103, 59-61.
5. Baldrian, P. & Valaskova, V. (2008). Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. *FEMS Microbiol Rev.* Epub ahead of print, doi:10.1111/j.1574-6976.2008.00106.x.
6. Bayer, E. A., Belaich, J. P., Shoham, Y. & Lamed, R. (2004). The cellulosomes: multienzyme machines for degradation of plant cell wall polysaccharides. *Annu Rev Microbiol.* 58, 521-54.

7. Bidlack, J., Malone, M. & Benson, R. (1992). Molecular structure and component integration of secondary cell walls in plants. *Proc Okla Acad Sci.* 71, 51-56.
8. De Vries, R. P. & Visser, J. (2001). Aspergillus enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiol Mol Biol Rev* 65 (4), 497-522.
9. Eriksson, K.-E. L. (1989). Biotechnology in the pulp and paper industry. *Wood Sci Technol.* 24, 79-101.
10. Fang, H-Y., Chang, S-M., Lan, C-H. & Fang, T. J. (2008). Purification and characterization of a xylanase from *Aspergillus carneus* M 34 and its potential use in photoprotectant preparation. *Process Biochemistry* 43, 49-55.
11. G. Immanuel, C., Bhagavath, P., Iyappa, Raj. P., Esakkiraj, & A. Palavesam. (2007). Production and Partial Purification of Cellulase by *Aspergillus niger* and *A. fumigatus* Fermented in Coir waste and Sawdust. *The Internet Journal of Microbiology*, 31.
12. Goedegebuur, F., Fowler, T., Phillips, J., van der Kley, P., van Solingen, P., Dankmeyer, L. & Power, S. (2002). Cloning and relational analysis of 15 novel fungal endoglucanases from family 12 glycosyl hydrolase. *Current Genetics.* 41, 89-98.
13. Grand View Research-Market Research & Consulting (2014). "Enzymes Market Analysis By Product (Carbohydrase, Proteases, Lipases, Polymerases & Nucleases) And Segment Forecasts To 2020" [en línea]:
<http://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/enzymes-industry>.

14. Henrissat, B., Driguez, H., Viet, C. & Schulein, M. (1985). Synergism of cellulases from *Trichoderma reesei* in the degradation of cellulose. *Nat Biotech.* 3, 722-726.
15. Henrissat, B. & Bairoch, A. (1993). New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J*, 293(3), 781-8.
16. Henrissat, B. & Romeu, A. (1995). Families, superfamilies and subfamilies of glycosyl hydrolases. *Biochem J*, 311(1), 350-1.
17. Herrera, T. & Ulloa, M. (1990). El reino de los hongos Micología básica y aplicada. 1 a Ed., Fondo de Cultura Económica. Mexico.
18. Hill, J., Nelson, E., Tilman, D., Polasky, S. & Tiffany, D. (2006). Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. *Proc Nat Acad Sci USA*. 103, 11206-11210.
19. Himmel, M. E., Ding, S. Y., Johnson, D. K., Adney, W. S., Nimlos, M. R., Brady, J. W. & Foust, T. D. (2007). Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science*, 315, 804-7.
20. Kadla, J. F. & Gilbert, R. D. (2000). Cellulose structure: A review. *Cellul Chem Technol.* 34, 197-216.
21. Krishna, C. (2005). Solid State Fermentation Systems-An Overview. *Critical Reviews in Biotechnology*, 25, 1-30.
22. Le Page, GA. & Campbell, E. (1946). Preparation of streptomycin. *J. Biol. Chem.* 162,163-171.
23. Lin, Y. & Tanaka, S. (2006). Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol.* 69, 627-642.

24. Lynd, L. R., Wyman, C. E. & Gerngross, T. U. (1999). *Biocommodity engineering. Biotechnol Prog*, 15, 777-793.
25. MacKenzie, D.A., Jeenes, D.J., Belsaw, N.J. & Archer, O. (1993). Regulation of secreted proteins production by filamentous fungi: Recent developments and perspectives. *Journal of General Microbiology*. 193, 2295-2307
26. Masai, E., Katayama, Y. & Fukuda, M. (2007). Genetic and biochemical investigations on bacterial catabolic pathways for lignin-derived aromatic compounds. *Biosci Biotechnol Biochem*. 71, 1-15.
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*, 23(1), 82.
28. Murashima, K., Kosugi, A. & Doi, R. H. (2003). Synergistic effects of cellulosomal xylanase and cellulases from *Clostridium cellulovorans* on plant cell wall degradation. *J Bacteriol*, 185, 1518-24.
29. Ng, T. B. (2004). Peptides and proteins from fungi. *Peptides*, 25, 1055-1073.
30. Nidetzky, B., Steiner, W., Hayn, M. & Claeysens, M. (1994). Cellulose hydrolysis by the cellulases from *Trichoderma reesei*: a new model for synergistic interaction. *Biochem J*, 298 (3), 705-10.

31. Plomion, C., Leprovost, G. & Stokes, A. (2001). Wood Formation in Trees. *Plant Physiol.* 127, 1513-1523.
32. Popper, Lutz. (2009). Enzymes in breadmaking: Economic relevance, markets, and future perspectives. *Grain & Feed Milling Technology*, 34-38.
33. Puls, J., Schröder, N., Stein, A., Janzon, R. & Saake, B. (2005). Xylans from Oat Spelts and Birch Kraft Pulp. *Macromol Symp*, 232, 85-92.
34. 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.
35. 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.
36. Ronne, H. (1995) Glucose repression in fungi. *Trends in Genetics.* 11, 13-17.
37. Ruijter, G. J. G. & Visser, J. (1997) Carbon repression in *Aspergilli*. *FEMS Microbiology Letters*, 151, 103-114.
38. Saha, B. C. (2003). Hemicellulose bioconversion. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 30, 279-91.

39. Schmid, G. & Wandrey, C. (1987). Purification and partial characterization of a cellodextrin glucohydrolase (-glucosidase) from *Trichoderma reesei* strain QM 9414. *Biotechnol Bioeng.* 30, 571-585.
40. Simpson, T. W., Sharpley, A. N., Howarth, R. W., Paerl, H. W. & Mankin, K. R. (2008). The new gold rush: fueling ethanol production while protecting water quality. *J Environ Qual.* 37, 318-324.
41. Soccol, C., Vandenberghe, L., Rodríguez, C. & Pandey, A. (2006). New perspectives for citric acid production and application. *Food Technology and Biotechnology,* 44(2), 141-149.
42. Sun, Y. & Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour Technol,* 83, 1-11.
43. Tollefson, J. (2008). Energy: not your father's biofuels. *Nature,* 451, 880-3.
44. Wackett, L. P. (2008a). Biomass to fuels via microbial transformations. *Curr Opin Chem Biol.* Epub ahead of print. doi:10.1016/j.cbpa.2008.01.025
45. Wessels, J. G. H. (1999) Fungi in their own right. *Fungal Genetics and Biology,* 27, 134-145.
46. Wilder, B. M. & Albersheim, P. (1973). The structure of plant cell walls: IV. A structural comparison of the wall hemicellulose of cell suspension cultures of sycamore (*Acer pseudoplatanus*) and of red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*). *Plant Physiol,* 51, 889-893
47. Withers, S. G. (2001). Mechanisms of glycosyl transferases and hydrolases. *Carbohydr Polym,* 44, 325-337.

48. Zhaoxin, L., Fengxia, L., Mei, L., Xiaomei, B., Haizhen, Z. & Yi, W. (2008). Purification and characterization of xylanase from *Aspergillus ficuum* AF-98. *Bioresource Technology*, 99, 5938-5941.