



Revista EIA  
ISSN 1794-1237  
e-ISSN 2463-0950  
Año XIX/ Volumen 20/ Edición N.40  
Julio - diciembre de 2023  
Reia4008 pp. 1-13

Publicación científica semestral  
Universidad EIA, Envigado, Colombia

**PARA CITAR ESTE ARTÍCULO /  
TO REFERENCE THIS ARTICLE /**

Mora-López, M.; Obando-García, J.;  
Castrillón-Duque, E.;  
Osorio-Echeverri, V. M.  
Producción de celulasas con cultivos  
puros y mixtos de *Trichoderma*  
*reesei* y *Aspergillus fumigatus*  
usando cascarilla de arroz como  
sustrato Revista EIA, 20(40), Reia4008.  
pp. 1-13.  
<https://doi.org/10.24050/reia.v20i40.1671>

 **Autor de correspondencia:**

Osorio-Echeverri, V. M. (Victor Manuel)  
Ingeniero Químico. Magister en  
Biotecnología.  
Docente Facultad de Ciencias de la  
Salud.  
Institución Universitaria Colegio Mayor  
de Antioquia.  
Correo electrónico:  
[victor.osorio@colmayor.edu.co](mailto:victor.osorio@colmayor.edu.co).

**Recibido:** 28-12-2022  
**Aceptado:** 15-05-2023  
**Disponible online:** 01-06-2023

# Producción de celulasas con cultivos puros y mixtos de *Trichoderma reesei* y *Aspergillus fumigatus* usando cascarilla de arroz como sustrato

MARCELA MORA-LÓPEZ<sup>1</sup>

JESSICA JOHANNA OBANDO-GARCÍA<sup>1</sup>

ELIZABETH XIMENA CASTRILLÓN-DUQUE<sup>1</sup>

 VÍCTOR MANUEL OSORIO-ECHEVERRI<sup>1</sup>

1. Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia - Colombia

## Resumen

Las enzimas celulolíticas son usadas en diferentes industrias; muchas de ellas son obtenidas a partir de hongos y bacterias que usan como sustrato residuos agroindustriales con alto contenido de celulosa. Algunos hongos de los géneros *Trichoderma* y *Aspergillus* sintetizan celulasas con diferentes mecanismos de acción y se han propuesto cultivos mixtos de estos hongos como estrategia para mejorar la hidrólisis de los materiales celulósicos asociada con la producción de estas enzimas. El objetivo de este estudio fue verificar la producción de celulasas a partir de cultivos mixtos y puros de aislados nativos de *T. reesei* y *A. fumigatus* con actividad celulolítica usando cascarilla de arroz como sustrato. Ambos hongos producen enzimas que catalizan la liberación de azúcares reductores a partir de carboximetilcelulosa. La fermentación en estado sólido se realizó siguiendo un diseño factorial y se analizó el efecto del tipo de inóculo y del tiempo de incubación sobre la actividad celulolítica de los extractos obtenidos. La producción de celulasas después de 15 días de incubación fue superior a la obtenida con 8 días de cultivo y se confirmó a través de un análisis de varianza que la producción de celulasas para los cultivos mixto y puro de *T. reesei* en el día 15 (34,5 y 31,9 U/g respectivamente) no presentaron diferencias significativas. Se demostró en este trabajo que la cascarilla de arroz tiene potencial para su uso en la obtención de enzimas fúngicas, aunque la actividad enzimática obtenida usando este subproducto es inferior a la producida con otros materiales celulósicos.

**Palabras clave:** Cascarillas, Degradación de celulosa, Hidrolasas, Fermentación en estado sólido, Microorganismos celulolíticos, Enzimas fúngicas.

# Cellulases production with pure and mixed cultures of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus fumigatus* using rice husks as substrate

## Abstract

Cellulolytic enzymes are used in different industries; many of them are obtained from fungi and bacteria that use agro-industrial waste with a high cellulose content as a substrate. Some fungi of the genera *Trichoderma* and *Aspergillus* synthesize cellulases with different mechanisms of action and mixed cultures of these fungi have been proposed as a strategy to improve the hydrolysis of cellulosic materials associated with the production of these enzymes. The objective of this study was to verify the production of cellulases from mixed and pure cultures of native isolates of *T. reesei* and *A. fumigatus* with cellulolytic activity using rice husks as a substrate. Both fungi produce enzymes that catalyze the release of reducing sugars from carboxymethylcellulose. Solid state fermentation was carried out following a factorial design and the effect of the type of inoculum and incubation time on the cellulolytic activity of the extracts obtained was analyzed. Cellulases production after 15 days of incubation was higher than that obtained with 8 days of culture and it was confirmed through an analysis of variance that the cellulases production for the mixed and pure cultures of *T. reesei* on day 15 (34.5 and 31.9 U/g, respectively) did not present significant differences. It was shown in this work that rice husks have the potential to be used to obtain fungal enzymes, although the activity of enzymes obtained using this by-product is lower than that produced with other cellulosic materials.

**Keywords** Cellulolytic microorganisms, Cellulose digestion, Fungal enzymes, Husks, Hydrolases, Solid state fermentation.

## 1. Introducción

Las enzimas son proteínas que catalizan reacciones bioquímicas en condiciones moderadas de presión y temperatura, por lo que son ampliamente producidas para su uso en diferentes industrias; entre las más destacadas están las celulasas, proteasas, amilasas y glucanasas (Li et al., 2012; Patel, Singhania y Pandey, 2017). Las celulasas, por su parte, corresponden a un grupo de enzimas que actúan de forma sinérgica en la hidrólisis de la celulosa, para convertirla en celobiosa, glucosa y oligosacáridos; en este proceso, las endoglucanasas hidrolizan inicialmente de manera aleatoria las moléculas de celulosa liberando polisacáridos más cortos, con extremos reductores y no reductores que quedan expuestos para que las exoglucanasas liberen celobiosa que, finalmente, es convertida en monómeros de glucosa por la actividad de las  $\beta$ -glucosidasas (Nigam, 2013).

Estas enzimas juegan un papel importante en la producción de detergentes, textiles, alimentos y biocombustibles, y además presentan un gran potencial para la obtención de azúcares fermentables (Ejaz, Sohail y Ghanemi, 2021). Se obtienen principalmente por fermentaciones sumergidas o en estado sólido usando bacterias del género *Bacillus* y hongos de los géneros *Trichoderma*, *Penicillium* y *Aspergillus* (Singh et al., 2016; Passos, Pereira y Castro, 2018), aunque se ha reportado actividad celulolítica en cultivos de otros géneros microbianos como *Schizophyllum*, *Clostridium*, *Cellulomonas* y *Streptomyces* (Danso et al., 2022; Saha, Bhattacharya y Mukhopadhyay, 2022).

Aunque la mayoría de los estudios sobre el modo de acción y la producción de celulasas han sido realizados usando diferentes cepas de *T. reesei*, la actividad  $\beta$ -glucosidasa de este hongo es particularmente baja y representa alrededor del 1% del total de sus enzimas celulolíticas, lo que limita la velocidad y extensión de hidrólisis de los sustratos celulósicos sobre los que este organismo se cultiva (Li et al., 2016). Por el contrario, se ha demostrado que algunos hongos del género *Aspergillus* producen  $\beta$ -glucosidasas con una alta actividad (Brijwani, Oberoi y Vadlani, 2010).

Si bien, muchas enzimas hidrolíticas pueden obtenerse a través de cultivos microbianos puros, los cultivos mixtos representan una posibilidad para mejorar el rendimiento en la producción de estas hidrolasas debido a las interacciones sinérgicas entre diferentes microorganismos. Algunos estudios han demostrado que ciertas especies de los géneros *Trichoderma* y *Aspergillus* crecen de forma conjunta en diferentes medios de cultivo y que esto aumenta la velocidad y el grado de hidrólisis de los sustratos celulósicos sobre los que se cultivan (Gutierrez-Correa et al., 1999).

Las fermentaciones en estado sólido (FES), son una estrategia utilizada para la producción de celulasas que permite obtener importantes concentraciones de enzimas con altas productividades volumétricas; estos sistemas en general requieren una menor inversión de capital y representan menos costos operativos que las fermentaciones sumergidas ya que los sustratos utilizados muchas veces son residuos agroindustriales (Brijwani, Oberoi y Vadlani, 2010; Castillo M., Cristancho y Arellano, 2006).

En este trabajo se implementó una fermentación en estado sólido usando como sustrato cascarilla de arroz, un subproducto con un contenido importante de celulosa y lignocelulosa, que es desechado en grandes cantidades por diferentes industrias agrícolas lo que produce grandes acumulaciones y un latente deterioro ambiental. Así, el objetivo era evaluar la producción de

enzimas celulolíticas mediante el uso de cultivos puros y mixtos de aislados nativos de *T. reesei* y *A. fumigatus* a través de este tipo de fermentaciones con diferentes tiempos de incubación.

## 2. Materiales y métodos.

### *Microorganismos.*

Se utilizó un aislado nativo consistente con *T. reesei* donado por la Unidad de Biotecnología Agrícola y Ambiental de la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB). Además, se obtuvo un aislado nativo consistente con *A. fumigatus* a partir de la rizósfera de un cerco vivo en un predio privado del corregimiento de Santa Elena, Medellín, a 10 cm de profundidad, y se realizaron diluciones seriadas en agua peptonada con Tween 80 (0,1% v/v), que fueron sembradas en agar papa dextrosa (PDA). Los cultivos fueron incubados a 25 °C y las colonias correspondientes a hongos filamentosos fueron subcultivadas en PDA. Las identidades de ambos hongos fueron confirmadas de acuerdo con las características macroscópicas y microscópicas observadas después de 6 días de incubación (Barnett y Hunter, 1972; Salazar y Rua, 2012). Ambos aislamientos fueron mantenidos en PDA a temperatura ambiente hasta la realización de los ensayos y se conservaron tanto en BHI con glicerol al 15 % v/v a -20 °C como en agua destilada estéril a temperatura ambiente.

### *Actividad celulolítica en medio líquido.*

Se cultivaron ambos hongos en un medio que contenía carboximetilcelulosa (CMC) 10 g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,4 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 g/L,  $\text{CaCl}_2$  0,3 g/L,  $\text{MgSO}_4$  0,3 g/L, extracto de levadura 0,25 g/L, peptona 0,75 g/L, y 1 mL/L de una solución de minerales traza compuesta por  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  10 mg/L,  $\text{MnCl}_2$  10 mg/L, y  $\text{ZnSO}_4$  10 mg/L. Los inóculos se prepararon en agua peptonada con Tween 80 al 0,1 % v/v, a partir de cultivos en PDA con 7 días de incubación hasta alcanzar una concentración de  $1 \times 10^7$  conidios/mL. Los medios se inocularon con una proporción del 5 % v/v de suspensión de conidias y se incubaron durante 48 horas a 150 rpm y 30 °C. Los cultivos se centrifugaron a 10.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C y 0,5 mL del sobrenadante se incubaron con 0,5 mL de una solución de CMC (2% p/v) preparada en buffer citrato (50 mM, pH 5,0) durante 1 hora a 37 °C. Los azúcares

reductores liberados se cuantificaron utilizando el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) usando como estándar una solución de glucosa (4 g/L) (Miller, 1959). La absorbancia se midió a 540 nm en espectrofotómetro visible (Nanocolor® VIS, Macherey-Nagel, Düren, Alemania).

### *Fermentación en estado sólido.*

Se utilizó como sustrato cascarilla de arroz obtenida en un mercado local, previamente secada a 60 °C durante 24 horas y fragmentada mecánicamente hasta alcanzar un tamaño promedio de 2 mm. Se depositaron 3 g de cascarilla en frascos de vidrio de boca ancha con un volumen de 100 mL, se esterilización a 121 °C por 20 minutos y posteriormente se secaron a 60 °C durante 4 horas. Los sustratos estériles se inocularon hasta alcanzar una humedad del 80 % con una suspensión de conidios preparada con una concentración de  $1 \times 10^7$  conidios/mL en una solución compuesta por extracto de levadura 0,5 g/L, peptona 0,5 g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,1 g/L,  $\text{CaCl}_2$  0,1 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,02 g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,02 g/L. La concentración total del inóculo para los cultivos mixtos fue de  $1 \times 10^7$  conidios/mL, mezclando los conidios de cada hongo en proporción 1:1. Los cultivos se incubaron a temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C) en un espacio con el 80 % de humedad relativa durante 8 y 15 días.

### *Ensayos enzimáticos.*

Se obtuvieron los extractos enzimáticos adicionando 20 mL de buffer citrato (50 mM, pH 5,0) a los cultivos correspondientes a cada tratamiento, agitándolos durante 1h a 150 rpm. Los extractos se centrifugaron a 10.000 rpm por 10 min a 4 °C, y la actividad enzimática se determinó después de incubar el sobrenadante con una solución de CMC como se describe previamente.

$$EA \text{ (U/g)} = \frac{RX * Ve}{E * 1 / (0.18 * t)} \quad (1)$$

Una unidad enzimática se definió como la cantidad de enzima requerida para liberar 1  $\mu\text{mol}$  de azúcares reductores en 1 hora a 37 °C. Los resultados se calcularon utilizando la Ecuación 1, donde E es la masa de sustrato fermentado (g), EA es la actividad enzimática (U/g), RS es la concentración de azúcares reductores liberados (mg/mL), t es el tiempo de reacción (h), y Ve es el volumen de extracto (mL) (Sartori et al., 2015).

### *Diseño experimental y análisis estadístico.*

Se siguió un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial de dos variables: tipo de inóculo (cultivo puro de cada microorganismo y cultivo mixto) y tiempo de fermentación (8 y 15 días), cada uno con su respectivo control. Los tratamientos se realizaron por triplicado. Se confirmó la normalidad y la independencia de varianzas para los datos de actividad enzimática (U/g), y se implementó un análisis de varianza factorial con  $p < 0,05$  como criterio estadístico para revelar diferencias significativas entre los factores, teniendo en cuenta una confianza de la prueba del 95 %. Se realizó, además, una prueba de múltiples rangos de Tukey para identificar los tratamientos con mayor actividad celulolítica. Todos los datos se analizaron mediante el software estadístico IBM SPSS 25®.

### **3. Resultados y discusión.**

#### *Aislamiento y caracterización de microorganismos.*

A partir de las muestras de suelo se recuperó un aislado con características consistentes con la especie *A. fumigatus*. Las colonias formadas por este hongo en PDA inicialmente presentaron una apariencia algodonosa que después de tres días de incubación se vuelve pulverulenta de color grisáceo. Además, los montajes al microscopio permitieron observar hifas septadas hialinas, estructuras reproductivas con conidióforos cortos y vesículas terminales de forma cónica con fiálides uniseriadas en los dos tercios superiores de la vesícula, y conidias globosas de pared rugosa que forman cadenas largas, lo que finalmente confirma la identidad de este aislado (Salazar y Rua, 2012).

Por su parte, el cultivo de *T. reesei* presentó un crecimiento micelial que cubre la superficie del medio PDA en 5 días a temperatura ambiente. Sus características observadas, como las colonias tempranas de color blanco con textura granular que posteriormente se tornan verde oscuro, la presencia de dos o tres anillos concéntricos en el micelio y la ausencia de color al reverso, fueron consistentes con las reportadas en la literatura. Presentó además hifas septadas, conidióforos ramificados laterales pareados, fiálides agrupadas con un cuello alargado de color hialino y conidios globosos color verde claro y de bordes lisos (Barnett y Hunter, 1972).



Ambos aislados fueron incluidos en la colección de microorganismos M-UCB de la Corporación para Investigaciones Biológicas - CIB, Medellín, Colombia, bajo el marco del permiso para colección de especímenes con fines de investigación científica no comercial No. 1467 de la Autoridad Nacional de Licencias Ambientales con número de registro 16D4FD0E9C3.

### *Confirmación de la actividad celulolítica.*

Se verificó la producción de enzimas celulolíticas para ambos hongos de manera independiente usando medios de cultivo líquidos con CMC como sustrato. Se obtuvieron en promedio 2,63 y 2,34 g/L de azúcares reductores con los extractos obtenidos para *T. reesei* y *A. fumigatus*, respectivamente. Estos resultados son similares a los obtenidos por Centeno y Pavone (2015) quienes, en medio líquido con lodos papeleros como sustrato, alcanzaron entre 1,36 y 3,0 g/L de azúcares reductores liberados. Asimismo, Ahamed y Vermette (2008), optimizaron las condiciones de cultivo para la producción de celulasas en biorreactor con *T. reesei* en medios líquidos con CMC como principal sustrato y alcanzaron valores inferiores a 5 g/L de azúcares reductores después de 48 horas de incubación a 30 °C.

Por otro lado, la producción de celulasas por parte del género *Aspergillus* ha sido estudiada principalmente para la especie *A. niger* y poco reportada para *A. fumigatus*, no obstante, en este estudio se confirmó la capacidad que tiene un aislado nativo de esta última especie para producir enzimas celulolíticas a partir de CMC, en concentraciones superiores a las reportadas por Gunam et al. (2019) quienes al cultivar *A. niger* con paja de maíz como sustrato lograron una actividad enzimática equivalente a la liberación de 1,1 g/L de azúcares reductores después de 7 días de cultivo.

### *Producción de enzimas por fermentaciones en estado sólido.*

Ambos aislados cultivados de manera independiente en cascarilla de arroz presentaron actividad celulolítica representada en la liberación de azúcares reductores por hidrólisis de CMC. De igual manera sucedió para los extractos obtenidos con el cultivo mixto, tanto después de 8 días como de 15 días de incubación (Tabla 1).

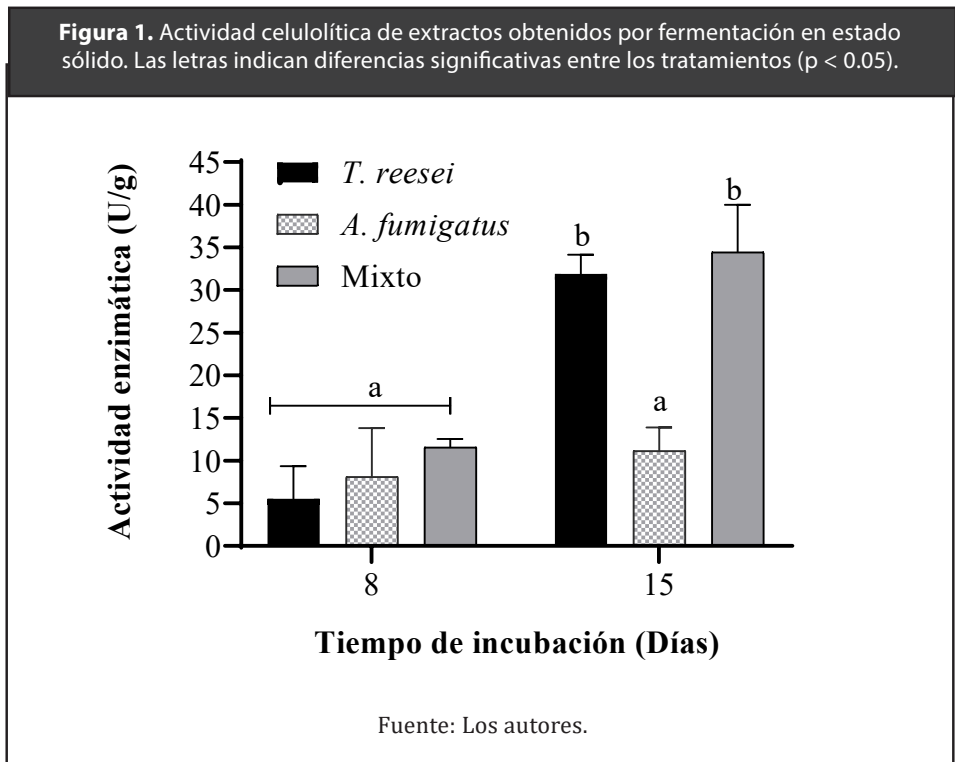
**Tabla 1.** Azúcares reductores liberados y actividad enzimática obtenida por fermentación en medio sólido sobre cascarilla de arroz

Inóculo	Incubación (días)	Azúcares liberados (g/L)	Actividad enzimática (U/g)
<i>T. reesei</i>	8	0,15 ± 0,10	5,53 ± 3,82 <sup>a</sup>
	15	0,86 ± 0,06	31,90 ± 2,23 <sup>b</sup>
<i>A. fumigatus</i>	8	0,22 ± 0,15	8,13 ± 5,70 <sup>a</sup>
	15	0,30 ± 0,07	11,14 ± 2,77 <sup>a</sup>
Mixto	8	0,31 ± 0,03	11,57 ± 0,99 <sup>a</sup>
	15	0,93 ± 0,15	34,46 ± 5,55 <sup>b</sup>

Las letras indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre la actividad enzimática celulolítica. Fuente: Los autores.

El tiempo de incubación, así como el tipo de inóculo usado tuvieron un efecto estadísticamente significativo sobre la actividad celulolítica obtenida y, a pesar de que después de ocho días de incubación no se encontraron diferencias en las actividades enzimáticas para los tratamientos con los diferentes inóculos, a los 15 días fueron mayores las actividades alcanzadas con el cultivo puro de *T. reesei* y el cultivo mixto, aunque estas no fueron significativamente diferentes ( $31,90 \pm 2,23$  y  $34,46 \pm 5,55$  U/g) (Figura 1).

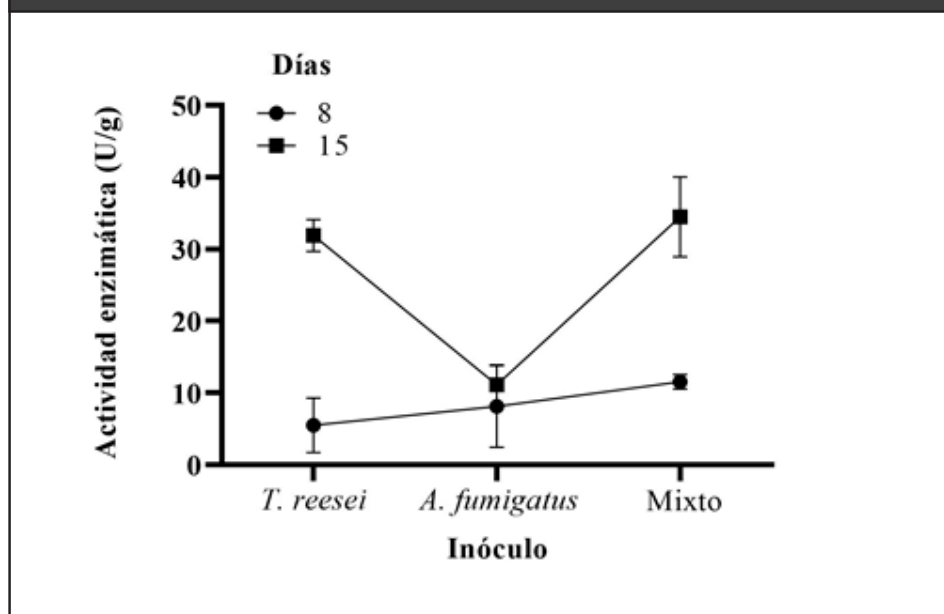




Aunque la actividad enzimática alcanzada después de 15 días de incubación con *T. reesei* en cultivo puro fue superior que la del cultivo con *A. fumigatus*, la concentración de azúcares liberados en el estudio no se vio afectada al reducir a la mitad la concentración de conidias de *T. reesei* en el inóculo y, por el contrario, se percibe un ligero incremento para el cultivo mixto lo que reflejaría una acción conjunta entre las endoglucanasas producidas principalmente por *T. reesei* y las b-glucosidasas por *A. fumigatus*.

Sumado a esto, el análisis de varianza realizado demostró que la interacción entre los dos factores evaluados en este estudio también tiene un efecto significativo sobre la producción de celulasas lo que indica que las diferencias de actividad enzimática alcanzadas para los diferentes inóculos dependen del tiempo de incubación (Figura 2). Así, mientras que con 8 días de cultivo no hay diferencias para la actividad en cultivos puros y mixtos, después de 15 de días de incubación sí es significativamente menor la actividad alcanzada por el cultivo con *A. fumigatus*.

**Figura 2.** Gráfico de interacción para la actividad enzimática según el tipo de inóculo y los días de incubación. Las barras de error indican la desviación estándar de cada tratamiento.



Al igual que en este trabajo, en algunos estudios se ha demostrado la producción de enzimas celulolíticas por fermentaciones en estado sólido usando diferentes hongos en cultivos mixtos. En ellos, usualmente se propone utilizar el hongo *T. reesei*, acompañado de alguna especie del género *Aspergillus* como *A. niger*, *A. phoenicis* o *A. oryzae* usando como sustratos cascarilla de soya, salvado de trigo, bagazo de caña, estiércol bovino, residuos de palma de aceite, entre otros; no obstante, algunos de estos sustratos reciben pretratamientos que permiten alcanzar un mejor aprovechamiento del material lignocelulósico por parte de los microorganismos lo que disminuye los tiempos de fermentación requeridos y aumenta las concentraciones de azúcares liberados; esto explica en parte que las actividades celulolíticas alcanzadas sean superiores en esos trabajos a las de esta investigación (Brijwani, Oberoi y Vadlani, 2010; Gutierrez-Correa et al., 1999; Gutierrez-Correa y Tengerdy, 1997; Manjarrés, Piñeros y Rodríguez-Sandoval, 2011; Wen, Liao y Chen, 2005).

Otros estudios han reportado una producción de celulasas con cascarilla de arroz como sustrato usando microorganismos como *T. reesei*, *Rhizopus oryzae*, *A. niger*, entre otros. Debido a que esta cascarilla puede contener entre el 20 y 25 % de hemicelulosa y lignina, la liberación de azúcares a partir de la celulosa es compleja y por esto, en muchos de estos trabajos, la cascarilla de arroz es previamente hidrolizada lo que permite alcanzar concentraciones

de endoglucanasas hasta 5 veces mayores e incluso con tan solo 35 horas de cultivo (Bansal et al., 2012; Kupski et al., 2014; Ugheoke y Mamat, 2012; Xing et al., 2012). A pesar de esto, los resultados obtenidos en este trabajo fueron similares a los reportados por Sun, Cheng y Lee (2008) quienes a los 12 días logran la máxima actividad celulolítica con cascarilla prehidrolizada, y mayores a los reportados por Bansal et al. (2012) quienes usaron cascarilla de arroz sin tratamientos previos (14,1 u/g).

Cabe anotar que la actividad celulolítica en los trabajos reportados en la literatura se evalúa usando diferentes sustratos, temperaturas, buffer y tiempos de incubación. Además, la definición de actividad enzimática ha sido arbitraria en estos estudios lo que dificulta hacer comparaciones de los resultados obtenidos en este trabajo. Aun así, se resalta la obtención de celulosas usando un sustrato económico sin tratamientos previos, lo que representa una posibilidad para la estandarización de un proceso que permita el aprovechamiento de residuos agroindustriales para la obtención de enzimas fúngicas y de azúcares fermentables.

#### 4. Conclusión.

Los aislados de *T. reesei* y *A. fumigatus* usados en este estudio mostraron actividad celulolítica. Los extractos obtenidos por fermentación en estado sólido usando como sustrato cascarilla de arroz sin pretratamiento luego de 15 días de incubación, contenían enzimas degradadoras de carboximetilcelulosa (CMCasas). La producción de estas enzimas por parte de *T. reesei* en cultivo puro y por su cultivo mixto con *A. fumigatus* fue superior. La cascarilla de arroz mostró ser un sustrato potencial para la producción de enzimas celulolíticas, aunque se recomienda realizar un pretratamiento que le permita a los hongos acceder más fácilmente a la celulosa.

#### 5. Agradecimientos.

A quienes formaron parte del Semillero de Investigación de la Facultad de Ciencias de la Salud (SIFACS) y participaron en algunas actividades en el laboratorio y a las docentes asesoras Beatriz Elena Valdés D. y Elizabeth Correa G., por la preparación y el acompañamiento a las estudiantes para la presentación de la propuesta y de algunos resultados preliminares en diferentes eventos académicos.

A la Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia y a la Agencia de Educación Superior de Medellín – Sapiencia – por la financiación del proyecto “Producción de enzimas con actividad celolítica a partir de cultivos mixtos y puros de *Trichoderma* sp. y *Aspergillus* sp. mediante fermentaciones en estado sólido” aprobado según ACTA 01 del 07/02/2017.

## 6. Referencias

- Ahamed, A.; Vermette, P. (2008). Culture-based strategies to enhance cellulase enzyme production from *Trichoderma reesei* RUT-C30 in bioreactor culture conditions. *Biochemical Engineering Journal*, 40(3), pp. 399-407. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.11.030>.
- Bansal, N.; Tewari, R.; Soni, R.; Soni, S. K. (2012). Production of cellulases from *Aspergillus niger* NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues. *Waste Management*, 32(7), pp. 1341-1346. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2012.03.006>.
- Barnett, H.; Hunter, B. (1998). Illustrated genera of imperfect fungi, 4a ed., Saint Paul, American Phytopathological Society. 218 p.
- Brijwani, K.; Oberoi, H. S.; Vadlani, P. V. (2010). Production of a cellulolytic enzyme system in mixed-culture solid-state fermentation of soybean hulls supplemented with wheat bran. *Process Biochemistry*, 45(1), pp. 120-128. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.08.015>.
- Castillo, E. F.; Cristancho, D. E.; Arellano, A.V. (2006). Study of the operational conditions for anaerobic digestion of urban solid wastes. *Waste Management*, 26(5), pp. 546-556. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2005.06.003>.
- Centeno, R.; Pavone, D. (2015). Producción de celulasas y biomasa del hongo *Trichoderma reesei* utilizando lodo papelero como fuente de carbono. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, 35(1), pp. 40-46.
- Danso, B.; Ali, S. S.; Xie, R.; Sun, J. (2022). Valorisation of wheat straw and bioethanol production by a novel xylanase- and cellulase-producing *Streptomyces* strain isolated from the wood-feeding termite, *Microcerotermes* species. *Fuel*, 310. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.122333>
- Ejaz, U.; Sohail, M.; Ghanemi, A. (2021). Cellulases: from bioactivity to a variety of industrial applications. *Biomimetics*, 6(3), 44. <https://doi.org/10.3390/biomimetics6030044>.
- Gunam, I. B. W.; Antara, N. S.; Anggreni, A. A. M. D.; Setiyo, Y.; Wiguna, I. P. E.; Wijaya, I. M. M.; Putra, I. W. W. P. (2019). Chemical pretreatment of lignocellulosic wastes for cellulase production by *Aspergillus niger* FNU 6018. *AIP Conference Proceedings* 2155. <https://doi.org/10.1063/1.5125544>.
- Gutierrez-Correa, M.; Portal, L.; Moreno, P.; Tengerdy, R. P. (1999). Mixed culture solid substrate fermentation of *Trichoderma reesei* with *Aspergillus niger* on sugar cane bagasse. *Bioresource Technology*, 68(2), pp. 173-178. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(98\)00139-4](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(98)00139-4).
- Gutierrez-Correa, M.; Tengerdy, R. P. (1997). Production of cellulase on sugar cane bagasse by fungal mixed culture solid substrate fermentation. *Biotechnology Letters*, 19(7), pp. 665-667. <https://doi.org/10.1023/A:1018342916095>.
- Kupski, L.; Pagnussatt, F. A.; Buffon, J. G.; Furlong, E. B. (2014). Endoglucanase and total cellulase from newly isolated *Rhizopus oryzae* and *Trichoderma reesei*: Production, characterization, and thermal stability. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(1), pp. 458-468. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0518-2>.

- Li, C.; Lin, F.; Li, Y.; Wei, W.; Wang, H.; Qin, L.; Zhou, Z.; Li, B.; Wu, F.; Chen, Z. (2016). A  $\beta$ -glucosidase hyper-production *Trichoderma reesei* mutant reveals a potential role of cel3D in cellulase production. *Microbial Cell Factories*, 15(1), 151. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0550-3>.
- Li, S.; Yang, X.; Yang, S.; Zhu, M.; Wang, X. (2012). Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2(3). <https://doi.org/10.5936/csbj.201209017>.
- Manjarrés, K.; Piñeros, Y.; Rodríguez-Sandoval, E. (2011). Evaluación del complejo enzimático producido mediante el cocultivo de *Aspergillus* sp. y *Trichoderma* sp. en fase sólida sobre residuos de palma. *Bioagro*, 23(1), pp. 19-26.
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), pp. 426-428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>.
- Nigam, P. S. (2013). Microbial enzymes with special characteristics for biotechnological applications. *Biomolecules*, 3(3), pp. 597-611. <https://doi.org/10.3390/biom3030597>.
- Passos, D. de F.; Pereira, N.; Castro, A. de M. (2018). A comparative review of recent advances in cellulases production by *Aspergillus*, *Penicillium* and *Trichoderma* strains and their use for lignocellulose deconstruction. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 14, pp. 60-66. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2018.06.003>.
- Patel, A. K.; Singhanian, R. R.; Pandey, A. (2017). Production, purification, and application of microbial enzymes. Brahmachari, G. *Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis and Industrial Applications*, Cambridge, MA: Academic Press, pp. 13-41. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803725-6.00002-9>.
- Saha, R.; Bhattacharya, D.; Mukhopadhyay, M. (2022). Enhanced production of biohydrogen from lignocellulosic feedstocks using microorganisms: A comprehensive review. *Energy Conversion and Management: X*, 13. <https://doi.org/10.1016/j.ecmx.2021.100153>.
- Salazar, C. L.; Rua, Á. L. (2012). Características morfológicas microscópicas de especies de *Aspergillus* asociadas a infecciones en humanos. *Hechos Microbiológicos*, 3(2), pp. 93-96.
- Sartori, T.; Tibolla, H.; Prigol, E.; Colla, L. M.; Vieira Costa, A. J.; Bertolin, T. E.; Costa, J. A. V.; Bertolin, T. E. (2015). Enzymatic saccharification of lignocellulosic residues by cellulases obtained from solid state fermentation using *Trichoderma viride*. *BioMed Research International*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/342716>.
- Singh, R.; Kumar, M.; Mittal, A.; Mehta, P. K. (2016). Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech*, 6(2), 174. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0485-8>.
- Sun, W.-C.; Cheng, C.-H.; Lee, W.-C. (2008). Protein expression and enzymatic activity of cellulases produced by *Trichoderma reesei* Rut C-30 on rice straw. *Process Biochemistry*, 43(10), pp. 1083-1087. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.05.015>.
- Ugheoke, B. I.; Mamat, O. (2012). A critical assessment and new research directions of rice husk silica processing methods and properties. *Maejo International Journal of Science and Technology*, 6(3), pp. 430-448. <https://doi.org/10.14456/mijst.2012.31>
- Wen, Z.; Liao, W.; Chen, S. (2005). Production of cellulase/b-glucosidase by the mixed fungi culture *Trichoderma reesei* and *Aspergillus phoenicis* on dairy manure. *Process Biochemistry*, 40(9), pp. 3087-3094. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.03.044>.
- Xing Y.; Bu L. X.; Wang K.; Jiang J. X. (2012). Pretreatment of furfural residues with alkaline peroxide to improve cellulose hydrolysis. Characterization of isolated lignin. *Cellulose Chemistry and Technology*, 46(3-4), pp. 249-260.