

# Precipitación salina de un extracto crudo con actividad celulolítica producido por *Aspergillus niger* UC33

## Salt precipitation of a crude extract with cellulolytic activity produced by *Aspergillus niger* UC33

Dayana Morales Borrell<sup>1</sup> 

Linneth Baryolo González<sup>2</sup> 

Néstor Mora González<sup>3</sup> 

Luis Beltrán Ramos Sánchez<sup>4</sup> 

Amaury Pérez Sánchez<sup>5</sup> 

<sup>1</sup>Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Camagüey, Departamento de Investigación y Desarrollo, Cuba.

✉ [dayana.morales@cigb.edu.cu](mailto:dayana.morales@cigb.edu.cu)

<sup>2</sup>LyCE Análisis de Procesos, Área de asesoría y consultoría, Zapopan, Jalisco, México ✉ [lb@lyce.com.mx](mailto:lb@lyce.com.mx)

<sup>3</sup>Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, Región del Bío Bío, Chile ✉ [nmora@udec.cl](mailto:nmora@udec.cl)

<sup>4</sup>Facultad de Ciencias Aplicadas, Universidad de Camagüey “Ignacio Agramonte Loynaz”, Cuba ✉ [luis.ramos@reduc.edu.cu](mailto:luis.ramos@reduc.edu.cu)

<sup>5</sup>Facultad de Ciencias Aplicadas, Universidad de Camagüey “Ignacio Agramonte Loynaz”, Cuba ✉ [amaury.perez84@gmail.com](mailto:amaury.perez84@gmail.com)

Recibido: 10/06/2022 Aceptado: 20/06/2022

**Resumen** La purificación de enzimas celulasas constituye un paso crítico para su producción debido a que a menudo resulta ser muy costoso. El objetivo de este estudio fue evaluar la precipitación salina de celulasas producidas por *Aspergillus niger* UC33 en fermentación en estado sólido, para incrementar el rendimiento y pureza de la enzima con el menor costo posible. Se empleó el programa Design-Expert 11.1.2 para el diseño experimental y la optimización de las condiciones experimentales. El sulfato de amonio se utilizó para la precipitación entre 60 y 90 % de saturación, se emplearon entre 1 y 3 h de precipitación y las temperaturas utilizadas fueron 4 y 25 °C. Las condiciones óptimas encontradas para maximizar el rendimiento y la pureza fueron 68,97 % de saturación con sulfato de amonio, tiempo de precipitación de 1,28 h y temperatura de 25 °C. En estas condiciones los valores de rendimiento, pureza y costo, fueron: 74,81 %, 1,26 y USD \$ 0,2609, respectivamente. El peso molecular de la enzima fue 38,47 kDa y la actividad celulolítica fue de 31,854 UI.

**Palabras clave:** celulasas, cromatografía de intercambio iónico, diseño factorial, optimización, purificación de enzimas

**Abstract** The purification of cellulase enzymes is a critical step for their production because it is often very expensive. The objective of this study was to evaluate the saline precipitation of cellulases produced by *Aspergillus niger* UC33 in solid-state fermentation, to increase the yield and purity of the enzyme at the lowest possible cost. The Design-Expert 11.1.2 program was used for the experimental design and the optimization of the experimental conditions. Ammonium sulfate between 60 and 90 % saturation was used for precipitation, among 1 and 3 h of precipitation time were employed and the temperatures applied were 4 and 25 °C. The optimal conditions found to maximize yield and purity were 68.97% saturation with ammonium sulfate, precipitation time of 1.28 h and temperature of 25 °C. Under these conditions, the yield, purity and cost values were: 74.81%, 1.26 and USD \$ 0.2609, respectively. The molecular weight of the enzyme was 38.47 kDa and the cellulolytic activity was 31.854 IU.

**Keywords:** cellulases, ion exchange chromatography, factorial design, optimization, enzyme purification.

## Introducción

Las enzimas son moléculas biológicas que son producidas por todos los seres vivos, generalmente se denominan “biocatalizadores”. Actualmente, las industrias basadas en enzimas adquieren mayor importancia que las industrias basadas en reactivos químicos, debido a la seguridad del proceso, el bajo costo de refinación, elevados rendimientos, control de proceso eficiente y fundamentalmente, por ser amigables con el medio ambiente (Ejaz *et al.*, 2021).

Las celulasas son enzimas industriales ampliamente usadas, las cuales se encuentran disponibles comercialmente desde hace más de 30 años (Ejaz *et al.*, 2021; Han y He, 2010; Lee *et al.*, 2016; Pathak *et al.*, 2014; Raju y Bawa, 2006; Sathya y Khan, 2014; Singhanian *et al.*, 2010). La celulasa es un complejo enzimático compuesto por tres enzimas: i) endoglucanasa, (EG) o 1,4- $\beta$ -D-glucano-4-glucanohidrolasa; ii) exoglucanasas, incluyen 1,4- $\beta$ -D-glucano-glucanohidrolasa (también conocida como celodextrinasa) y la 1,4- $\beta$ -D-glucano-celobiohidrolasa (celobiohidrolasa, CBH); iii)  $\beta$ -glucosidasa (BGL), o  $\beta$ -glucosidaglucohidrolasa (Hasunuma *et al.*, 2013). Estas, hidrolizan los ligamentos  $\beta$ -1,4-glucosídicos de la celulosa para generar glucosa, celobiosa y celo-oligosacáridos como productos primarios (Lodha *et al.*, 2020).

El proceso completo de bioconversión de la celulosa en glucosa ocurre en dos etapas, por lo que la clasificación de las celulasas está basada en la etapa de despolimerización del sustrato que estas atacan (Siqueira *et al.*, 2020). Así, las exoglucanasas y endoglucanasas son responsables de la primera etapa, la cual conduce a la reducción del grado de polimerización de la celulosa en la etapa de licuefacción, libera celobiosa; la segunda etapa es realizada por la  $\beta$ -glucosidasa que escinde la celobiosa en glucosa. La glucosa generada mediante esta hidrólisis puede ser fermentada posteriormente para producir biocombustibles (Ejaz *et al.*, 2021).

Varios microorganismos pueden producir las celulasas, entre los cuales se incluyen bacterias y hongos, mediante el consumo de una gran variedad de sustratos. La habilidad para secretar grandes cantidades de proteína extracelular es característica de ciertos hongos, y algunas cepas son más adecuadas para la producción de mayores niveles de celulasas extracelulares (Doi y Kosugi, 2004). De esta manera, a escala industrial la mayoría de las celulasas son producidas a partir de hongos (Siquiera *et al.*, 2020).

Mientras que varios hongos pueden metabolizar la celulosa como fuente de energía, solo algunas cepas son capaces de secretar un complejo de enzimas celulasa, lo cual tiene una aplicación práctica en la hidrólisis enzimática de esta molécula biológica. Además de *Trichoderma*, otros hongos tales como *Humicola*, *Penicillium* y *Aspergillus*, tienen la habilidad de rendir elevados niveles de celulasas extracelulares (Sukumaran *et al.*, 2005). En dependencia del microorganismo, la enzima producida tiene una estructura diferente y mecanismo de enlace con el sustrato (Juturu y Wu, 2014; Rabinovich *et al.*, 2002)

Los sustratos procedentes de residuos lignocelulósicos de las industrias pueden resultar factibles y amigables con el medio ambiente para el cultivo de microorganismos productores de celulasas, especialmente hongos filamentosos, tales como *Aspergillus niger* UC33. Entre los diferentes residuos industriales de la industria azucarera, la miel final es de naturaleza principalmente celulósica y los microorganismos presentes allí tienen la capacidad de degradar la celulosa en glucosa para su crecimiento y desarrollo normal (Islam y Roy, 2018).

La demanda de carbohidrasas tales como amilasas, hemicelulasas y celulasas crecerá en los próximos años, ya que forman parte de los procesos de producción de biocombustibles. Este incremento de la demanda del mercado de enzimas se debe principalmente al crecimiento

del bioetanol, el cual está ascendiendo más rápido que otras industrias de aplicación de enzimas (Behera y Ray, 2016; Singhanía *et al.*, 2010). Esta aplicación en la cadena de producción de biocombustible incrementa la demanda e investigación en las celulasas, particularmente considerando que el mercado de los biocombustibles se espera que crezca en los próximos años, reemplazando el 30 % de los combustibles de petróleo para el 2025 (Behera y Ray, 2016).

Aunque la producción comercial de celulosa se lleva a cabo por medio de la fermentación sumergida fúngica, la fermentación en estado sólido (FES) también puede aplicarse para la producción de este complejo enzimático. Debido a que la FES se realiza en ausencia de agua libre, se observa que es más adecuada para los hongos filamentosos (Hölker *et al.*, 2004), pues presenta un consumo de energía más bajo, mayor productividad, menor demanda de esterilización y menor costo de procesamiento *downstream* (Manan y Webb, 2017). Los hongos generalmente coexisten simbióticamente en sustratos sólidos en la naturaleza, por lo que su co-cultivo en FES es beneficioso en la producción de celulosa (Lodha *et al.*, 2020).

Los bioprocesos aplicados para la producción de celulasas han sido exhaustivamente estudiados y optimizados, pero también resulta necesario enfocarse en los procesos *downstream*, ya que estos incrementan la estabilidad de la enzima para aplicaciones posteriores (Siqueira *et al.*, 2020). Varios autores han investigado tanto la producción (Abdullah *et al.*, 2021; Afzal *et al.*, 2019; Ahmed *et al.*, 2015; Cerda *et al.*, 2017; Faheina *et al.*, 2015; Iqbal *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2019; Lodha *et al.*, 2020; Malik y Javed, 2021; Mrudula y Murugammal, 2011; Nehad *et al.*, 2019; Oliveira *et al.*, 2020; Sajith *et al.*, 2014; Sulyman *et al.*, 2020; Zahra *et al.*, 2020; Zapata *et al.*, 2018), como purificación de celulasas (Afzal *et al.*, 2019; Ahmed *et al.*, 2015; Amritkar *et al.*, 2004; Bakare *et al.*, 2005; Farinas *et al.*, 2011; Hamdan y Jasim, 2018; Iqbal *et al.*, 2011; Islam y Roy, 2018; Kumar

*et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2019; Malik y Javed, 2021; Nehad *et al.*, 2019; Oliveira *et al.*, 2020; Sajith *et al.*, 2014; Sulyman *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2010).

La selección de las etapas de purificación en el procesamiento *downstream* después de la fermentación depende fuertemente en el mercado potencial, el costo de procesamiento, la calidad final requerida y la tecnología disponible. La necesidad de la purificación efectiva de proteínas desde el punto de vista económico a escala industrial ha traído consigo la aparición y evolución de un número de técnicas que suministran protocolos rápidos, eficientes y económicos en menores etapas de procesamiento (Amritkar *et al.*, 2004).

Actualmente, la principal limitación que presenta el uso de las celulasas en la industria es el elevado costo de producción de esta enzima (Sulyman *et al.*, 2020). En este sentido, la purificación de moléculas biológicas de este tipo es uno de los obstáculos más grandes para su producción y comercialización (Das *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2013). El procesamiento *downstream* para la producción de enzimas/proteínas puras puede constituir generalmente un porcentaje importante en el costo de producción total, especialmente si los requerimientos de pureza final son rigurosos, el cual puede llegar hasta un 80 % del costo total del proceso (Oliveira *et al.*, 2020). Por consiguiente, la producción de celulasas con bajos costos es un método interesante para agregar valor al biocombustible y al mercado de enzima (Siqueira *et al.*, 2020).

De esta manera, el objetivo de este estudio fue evaluar la precipitación salina de celulasas producidas por *Aspergillus niger* UC33 en FES, para incrementar el rendimiento y pureza de la enzima al menor costo posible.

## Materiales y Métodos

### Microorganismo y propagación del inóculo

Se utilizó la cepa UC33 de *Aspergillus niger* conservada a  $4 \pm 1$  °C en medio papa-dextrosa-

agar (PDA), procedente de la colección del grupo científico de Desarrollo de Bioprocesos de la Universidad de Camagüey, Cuba.

La propagación del inóculo se realizó mediante el método propuesto por (Leon-Revelo *et al.*, 2017). El microorganismo se cultivó en placas Petri con 10 mL de medio de cultivo sólido. El medio se compuso de 10 g/L extracto de levadura (BioCen, Cuba), 10 g/L peptona (BioCen, Cuba), 20 g/L dextrosa (Applichem, Alemania) y 15 g/L agar técnico (BioCen, Cuba). Se inoculó siguiendo la técnica de estriado. Después de 72 horas de incubación a 30 °C, se cosecharon los conidios, los que fueron arrastrados con agua destilada estéril. La concentración de conidios se determinó por conteo en la cámara de Neubauer. Esta suspensión de conidios se inoculó en una concentración de  $1 \times 10^7$  conidios/mL en un medio líquido. El medio líquido para la producción de micelio se compuso de 10 g/L extracto de levadura (BioCen, Cuba), 10 g/L peptona (BioCen, Cuba) y 43g/L miel final de caña (Central azucarero, Cuba). Se incubó a 30 °C y 150 rpm de agitación durante 30 horas en un agitador orbital de mesa (BioBase Sk-300D, China).

### Material lignocelulósico inductor y su pretratamiento

El método para el pretratamiento se realizó según lo describe Leon-Revelo *et al.* (2017). Se utilizó un medio compuesto de afrecho cervecero proporcionado por la cervecería Tínima y la cáscara de arroz procedente de una fábrica de pienso local, ambas localizadas en la provincia de Camagüey. A la cáscara de arroz se le hizo un pretratamiento con ácido sulfúrico (Applichem, Alemania) al 1 % durante 2 h, a temperatura ambiente. Sin embargo, al afrecho cervecero no se le hizo pretratamiento debido a que este constituye un residuo de la fabricación de cerveza que recibe pretratamientos térmicos y enzimáticos durante el proceso de maceración de la cebada, lo que hace factible el ataque de las enzimas celulolíticas. Las materias primas se secaron a 70 °C durante 24 h y se guardaron en bolsas plásticas hasta su posterior uso.

### Fermentación en estado sólido (FES)

La fermentación se llevó a cabo con el método establecido por Leon-Revelo *et al.* (2017). Se fermentaron 5 g de medio húmedo en erlenmeyers de 250 mL. Se utilizó como material lignocelulósico la mezcla de cáscara de arroz y afrecho cervecero previamente tratados, con una disolución de aditivos (bajo solicitud de patente) con relación sólido-líquido de 1:6. La humedad de la masa total húmeda (MTH) fue de 57,67 %. El pH inicial del medio sólido fue de 4,5. Se incubó a 30 °C durante 30 horas en cultivo estático. El muestreo se realizó cada 6 horas en condiciones asépticas.

### Extracción del crudo enzimático

El procedimiento para la extracción del crudo enzimático se realizó de acuerdo con lo descrito por Leon-Revelo *et al.* (2017), sin ninguna modificación. Para ello fue necesario suspender el material fermentado en agua destilada en una relación de 1:9 y agitarlo a 200 rpm por 1 h a temperatura ambiente en el agitador orbital de mesa (BioBase Sk-300D, China). Seguidamente, el material suspendido y la biomasa fúngica se separaron por centrifugación (10 000 rpm durante 15 min). El sobrenadante filtrado se utilizó como fuente para desarrollar el presente estudio.

### Diseño experimental

El software Design-Expert 11.1.2 se utilizó para la realización del diseño experimental mediante la metodología de superficie de respuesta (MSR). Se seleccionó un diseño óptimo-I, que tuvo un total de 36 ejecuciones incluida una réplica, y dividido en dos bloques. Las variables independientes fueron la concentración de sulfato de amonio desde 60 a 90 % (-1;1), el tiempo de precipitación de 1 a 3 h, (-1;1) y la temperatura de forma categórica, 4 y 25 °C. Las variables de respuesta fueron: el rendimiento (%), la pureza y el costo de la etapa (USD \$).

La pureza (fold purification, en inglés) se determinó mediante la relación entre la

actividad específica al concluir la precipitación y la actividad específica del crudo enzimático. Además, Design-Expert 11.1.2 se utilizó para el análisis de varianza de las respuestas (ANOVA, por sus siglas en inglés), para el análisis de regresión, la evaluación de bondad de ajuste, para la determinación del  $R^2$ , el  $R^2$  ajustado y el  $R^2$  predicho.

Asimismo, se obtuvieron las ecuaciones para predecir el comportamiento de las respuestas en función de los factores experimentales o variables independientes. Igualmente, se utilizó la función de optimización numérica para encontrar las condiciones óptimas que permiten logara un máximo de rendimiento y pureza al menor costo posible.

### *Precipitación salina*

Los experimentos se realizaron de acuerdo con el diseño propuesto y fueron divididos en dos etapas principales. En una primera etapa se llevó a cabo la precipitación salina con sulfato de amonio. Cada corrida experimental se realizó con un volumen total de 10 mL del crudo enzimático, previamente conservado a  $-70$  °C. La cantidad de sulfato de amonio a añadir, para lograr las concentraciones necesarias en cada caso (60, 75 y 90 %), se calculó mediante el uso de la herramienta en línea Ammonium Sulfate Calculator (EnCor Biotechnology Inc., 2022). El sulfato de amonio fue adicionado en pequeñas cantidades, gradualmente, y se agitó hasta lograr que se disolviera totalmente. Una vez formados los conglomerados proteicos se colectó el precipitado producido mediante la centrifugación a 7000 g por 30 min en una centrifuga refrigerada (Eppendorf, 5430R, Germany). Se separó el sobrenadante del precipitado por decantación y este último se resuspendió en 1 mL de tampón citrato 50 mM, pH 4,8.

En la segunda etapa se procedió con las determinaciones de actividad enzimática y cuantificación de proteínas, a partir de las cuales se calculan los parámetros de rendimiento, pureza y costo que permiten evaluar el proceso.

### *Actividad celulasa, concentración de proteínas, pureza y rendimiento*

Para la determinación de la actividad celulasa, se utilizó un ensayo indirecto en el que los productos de la reacción fueron detectados espectrofotométricamente tras su conversión en derivados coloreados. La extensión de la hidrólisis enzimática de celulosa en glucosa (azúcar reductor) se valoró mediante el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Chaplin, 1994). La solución de DNS se preparó utilizando 0,5 g del reactivo (Applichem, Alemania), 15 g de tartrato doble de sodio y potasio (Applichem, Alemania), 0,8 g de hidróxido de sodio (Merck, Alemania) y agua destilada hasta completar 50 mL. Se conservó a  $25 \pm 2$  °C. La solución sustrato se preparó empleando 0,5 g de carboximetilcelulosa (Merck, Alemania) y 50 mL de tampón fosfato 50 mM a pH 7,0. La misma se conservó en tubos Corning de 15 mL (Merck, Alemania) a  $-20$  °C.

Para desarrollar la hidrólisis enzimática se añadieron 100  $\mu$ L de solución sustrato y 100  $\mu$ L de celulasa diluida convenientemente en tubos Eppendorf de 1,5 mL (Merck, Alemania). Se dejó reaccionar durante 10 min a 30 °C e inmediatamente después se adicionaron 100  $\mu$ L de reactivo DNS. Los tubos se taparon y se agitaron en un equipo Vortex (IKA, Alemania), se incubaron en Baño María por 5 min a una temperatura de 95 a 100 °C. Seguidamente la reacción se detuvo colocando los tubos en un baño de hielo. Se añadió 1 mL de agua destilada y se tomaron 200  $\mu$ L de la mezcla final para depositar en una microplaca y leer la absorbancia a 540 nm (Fluorescence microplate reader, Eppendorf, AG).

Para la curva de calibración de azúcares reductores totales (ART) se utiliza una gama de diluciones desde 0 hasta 2,5 mg/mL de glucosa (Applichem, Alemania) y buffer citrato de sodio 1 M (Merck, Alemania) como solución stop. Las muestras de los precipitados se hicieron reaccionar con la solución sustrato para determinar la actividad CMCasa y solución papel de filtro (PF) de igual concentración (10 g/L), para medir la actividad PFasa. En el

crudo se cuantificaron los ART y para ello no fue necesario utilizar la solución sustrato. Se efectuaron diluciones de 1/10 y 1/100 del crudo y de los precipitados, respectivamente.

Para calcular la actividad celulasa (CMCasa y PFasa), se utilizó la siguiente ecuación:

$$A = \left[ \frac{\left( \frac{(\text{CMC}-\text{ART})}{\text{Mglc}} \right) \cdot \text{FC}}{t} \right] \cdot \text{FD} \quad \text{Ecu. 1}$$

Dónde:

A: es la actividad enzimática en UI/mL,

(CMC-ART): diferencia de concentración entre los ART que resultan de la actividad de la enzima frente al sustrato CMC con los ART presentes en el crudo, Mglc: masa molar de la glucosa (181 g/mol),

FC: factor de conversión de unidades (FC = 1 000),

t: tiempo que demora en transcurrir la reacción (60 min) y,

FD: factor de dilución (FD = 13).

Del mismo modo, la actividad PFasa se determinó por la ecuación 1 con la variación del sustrato CMC por PF.

La actividad enzimática total presente en el volumen utilizado para la

precipitación se calculó mediante la ecuación 2.

$$A_t = A \cdot V_p \quad \text{Ecu. 2}$$

Dónde:

A<sub>t</sub>: actividad enzimática total en UI,

A: actividad enzimática expresada en UI/mL (derivada de la ecuación 1) y,

V<sub>p</sub>: Volumen de precipitación (V<sub>p</sub> = 10 mL).

La concentración de proteínas se determinó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976) y la actividad específica dividiendo la actividad total entre la concentración de proteínas totales. La pureza se determinó dividiendo la actividad enzimática

específica del precipitado entre la actividad enzimática específica del volumen de crudo utilizado en la precipitación. El rendimiento se calculó dividiendo la actividad enzimática total del precipitado entre la actividad enzimática total del volumen de crudo utilizado en la precipitación, multiplicado por 100.

### Determinación del costo de la etapa de precipitación

El costo de la etapa de precipitación con sulfato de amonio se basó en la ecuación 3.

$$C_{PS} = C_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4} + C_E \quad \text{Ecu. 3}$$

Dónde:

C<sub>ps</sub>: costo de la precipitación,

C<sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></sub>: costo del sulfato de amonio y,

C<sub>E</sub>: costo de la energía consumida, considerando el costo de la agitación mecánica (C<sub>AM</sub>), de la refrigeración (C<sub>R</sub>) y de la centrifugación (C<sub>Cf</sub>),

$$C_E = C_{AM} + C_R + C_{Cf}$$

En cuanto a los costos, para el caso del sulfato de amonio se empleó del catálogo de Applichem (ITW Reagents Division, 2022) y se calculó el de la energía consumida teniendo en cuenta los equipos utilizados y el tiempo de uso de los mismos. Se tomó como base de cálculo que 1 kWh cuesta 0,33 CUP, de 1-100 kWh. La unidad monetaria del costo fue convertida de CUP a USD según la tasa vigente en la actualidad (25 CUP = 1 USD). Este costo se determinó para cada corrida del experimento y se evaluó de igual forma que las demás variables respuesta del diseño.

### Caracterización electroforética de la enzima de interés

Mediante la revisión de la literatura se observó que las celulasas obtenidas por *Aspergillus niger* sp. y otros hongos, presentan generalmente un punto isoelectrico inferior a 6,0 (Marín, 2007). Basado en este dato se seleccionó un intercambiador aniónico para fraccionar la muestra mediante cromatografía de intercambio iónico.

La muestra se desalinizó en una columna PD-10 (Promega) con Shephadex G-25 y luego se eluyó con tampón Tris-HCl 20 mM, pH 7,0. Posteriormente, se aplicó a una columna HiTrap FF (Promega) de un volumen total de 1 mL empacada con el intercambiador aniónico DEAE-Sefarosa. La elución se realizó mediante un gradiente escalonado de concentración de NaCl en tampón Tris-HCl. Las fracciones se colectaron con 0,15, 0,20 y 0,30 M de NaCl. A las fracciones eluidas se les cuantificó la concentración de proteínas y se les determinó la actividad endoglucanasa como se describió anteriormente.

La electroforesis desnaturante de proteínas en gel de acrilamida-bisacrilamida se realizó mediante el método de Laemmli (1970). Para la misma se empleó un gel de 12 % de acrilamida y la corrida se efectuó a una intensidad constante de 35 mA. Como patrón de peso molecular se empleó el marcador de amplio rango de la firma Bio-Rad. Una vez concluida la electroforesis, la presencia de las bandas de

proteínas en el gel se reveló mediante la tinción con plata, empleando el método desarrollado por Heukeshoven y Dernick (1985). El peso molecular de las bandas de interés se calculó mediante el patrón electroforético, se grafica el logaritmo de base 10 del peso molecular de las bandas del marcador versus el Rf (relación de la distancia de migración de las bandas de proteínas con respecto al frente de corrida).

## Resultados y discusión

### *Influencia de la concentración de sulfato de amonio, el tiempo de precipitación y la temperatura, en la precipitación de celulasas producidas por *Aspergillus niger* UC33 en FES*

En este estudio, las variables y los niveles seleccionados se fijaron teniendo en cuenta la influencia de estas en la etapa de precipitación salina de celulasas y en el estado del arte de otros estudios similares. De esta forma, el diseño experimental y los resultados de cada respuesta se relacionaron en la Tabla 1.

**Tabla 1**

*Diseño experimental con los correspondientes valores observados para el estudio de la influencia de la concentración de sulfato de amonio, el tiempo de precipitación y la temperatura, en el rendimiento, la pureza y el costo de la etapa de precipitación de celulasas*

Num. de corrida	Conc. de Sulfato de Amonio (%)	Tiempo de precipitación (h)	Temperatura (°C)	Respuesta 1: Rendimiento	Respuesta 2: Pureza	Respuesta 3: Costo
1	90	1	25	77,42	1,12	0,36
2	90	2	4	53,06	0,94	0,34
3	75	1	4	60,61	1,91	0,27
4	90	2	25	88,5	1,3	0,36
5	90	1	4	67,59	1,17	0,34
6	60	1	4	46,54	1,53	0,21
7	75	2	4	72,01	1,38	0,27
8	60	3	25	29,35	0,94	0,22
9	75	2	25	73,33	1,46	0,29
10	75	3	4	55,1	0,74	0,27
11	60	3	4	57,78	0,8	0,21
12	90	3	25	82,62	0,95	0,36
13	60	2	4	45,27	0,81	0,21
14	60	1	25	47,27	1,55	0,22

Num. de corrida	Conc. de Sulfato de Amonio (%)	Tiempo de precipitación. (h)	Temperatura (°C)	Respuesta 1: Rendimiento	Respuesta 2: Pureza	Respuesta 3: Costo
15	90	3	4	61,31	0,84	0,34
16	75	3	25	68,93	1,17	0,29
17	60	2	25	36,08	1,29	0,22
18	75	1	25	69,8	1,18	0,28
<b>Réplica</b>						
19	90	1	25	59,27	0,83	0,36
20	90	2	4	68,56	0,97	0,34
21	75	1	4	70,84	1,11	0,27
22	90	2	25	75,38	0,92	0,36
23	90	1	4	70,51	1,11	0,34
24	60	1	4	35,68	1,39	0,21
25	75	2	4	68,93	1,18	0,27
26	60	3	25	54,63	1,11	0,22
27	75	2	25	77,82	1,25	0,29
28	75	3	4	74,84	1,19	0,27
29	60	3	4	32,69	0,95	0,21
30	90	3	25	63,76	0,73	0,36
31	60	2	4	36,48	1,26	0,21
32	60	1	25	49,37	1,19	0,22
33	90	3	4	63,03	0,86	0,34
34	75	3	25	72,32	1,08	0,29
35	60	2	25	52,49	1,15	0,22
36	75	1	25	73,02	1,21	0,28

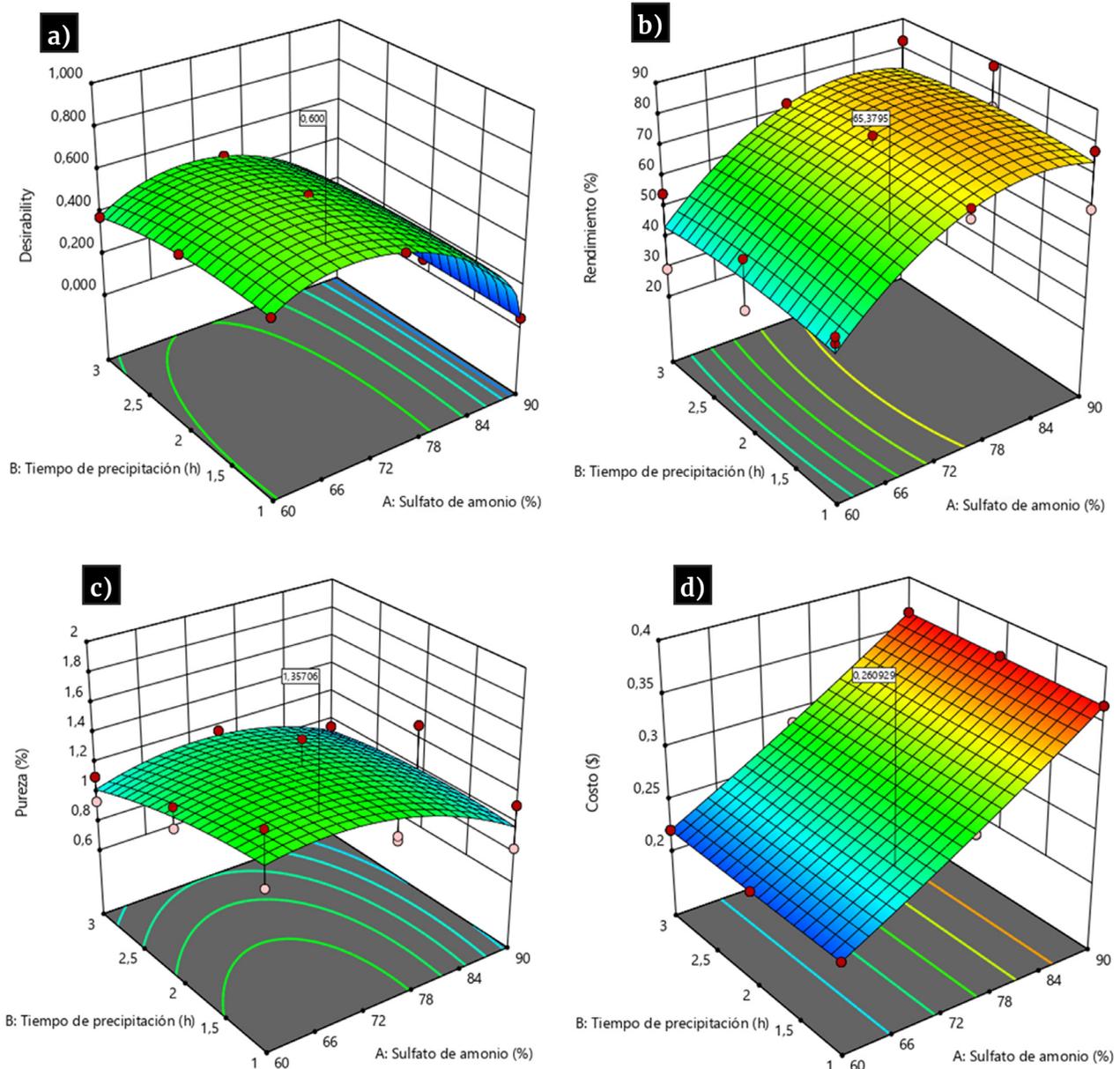
Nota. Elaboración propia.

Mediante el análisis de superficies de respuestas estimadas (Figura 1), se encontró que a una temperatura de 25 °C se obtienen los mejores resultados de las variables de respuesta. Así, para un valor de concentración de sulfato de amonio, a medida que aumenta el tiempo de precipitación aumenta también el rendimiento, se alcanzan valores máximos entre 1 y 2 h de precipitación. Se evidenció también que, para un mismo tiempo, el rendimiento varía con la concentración de sulfato de amonio, encontrándose los mayores rendimientos al utilizar entre 75 y 90 % de saturación con sulfato de amonio.

Por otra parte, la pureza de las celulasas fue mayor cuando se precipitó durante 1 a 2 h, utilizando la misma concentración de sulfato de amonio (Figura 1c). Además, para un mismo

tiempo de precipitación, se observó que la pureza de las celulasas aumentó a medida que disminuyó la concentración de sulfato de amonio. Este comportamiento puede deberse a que, al incrementar la concentración de sulfato de amonio, no solo aumenta la precipitación de la enzima de interés, sino que también este aumento condiciona la precipitación de la totalidad de las enzimas presentes en el crudo, y disminuye así la pureza de la enzima de interés.

Con relación al costo de la precipitación, según las condiciones empleadas, se encontró que el costo de la precipitación aumenta fundamentalmente con la concentración de sulfato de amonio. También, utilizando una misma concentración de sulfato de amonio el costo incrementó a medidas que aumentó el tiempo de precipitación (Figura 1d).



**Figura 1**

*Influencia de la concentración de sulfato de amonio y el tiempo de precipitación*

*Nota.* a): deseabilidad (nivel en que la combinación de variables independientes satisface las metas que se definieron para las variables de respuestas). Las banderas indican las respuestas estimadas para las condiciones óptimas predichas. b): el rendimiento, c): la pureza y d): el costo de la etapa de precipitación de celulasas producidas por *Aspergillus niger* UC33 en FES. Elaboración propia.

Según el análisis de varianza los datos de la respuesta rendimiento, se ajustaron mejor a un modelo cuadrático. A, C y A<sup>2</sup> fueron términos significativos del modelo (P < 0,05). Así, los coeficientes R<sup>2</sup>, R<sup>2</sup> ajustado, y R<sup>2</sup> predicho fueron iguales a: 0,7401, 0,6602 y 0,4631,

respectivamente (Tabla 2). La ecuación del modelo obtenido en términos de factores actuales puede ser utilizada para hacer predicciones de la variable de respuesta rendimiento, para distintos niveles de cada factor:

$$\text{Rendimiento (\%)} = -341,2022 + 9,8864A + 8,1054B + 0,0014AB - 0,0593A^2 - 2,1475B^2 \quad \text{Ecu. 4}$$

**Tabla 2**

*Análisis de varianza (ANOVA) para el modelo Cuadrático. Respuesta 1: Rendimiento*

Fuente	Sum. de los cuadrados	df	Media de los cuadrados	Valor- F	Valor-P	
Bloque	1,38	1	1,38			
Modelo	5841,73	8	730,22	9,26	< 0.0001	Significativo
A-Sufato de amonio	3936,77	1	3936,77	49,91	< 0.0001	
B-Tiempo de precipitación	5,57	1	5,57	0,0706	0,7926	
C-Temperatura de precipitación	339,36	1	339,36	4,30	0,0481	
AB	0,0072	1	0,0072	0,0001	0,9924	
AC	96,56	1	96,56	1,22	0,2787	
BC	0,2563	1	0,2563	0,0032	0,9550	
A <sup>2</sup>	1426,31	1	1426,31	18,08	0,0002	
B <sup>2</sup>	36,89	1	36,89	0,4677	0,5001	
Residual	2050,96	26	78,88			
Total de corridas	7894,07	35				
R <sup>2</sup>	0,7401					
R <sup>2</sup> ajustado	0,6602					
R <sup>2</sup> predicho	0,4631					

Nota. Elaboración propia.

Los datos de pureza se ajustaron mejor a un modelo cuadrático. A, B y A<sup>2</sup> fueron términos significativos del modelo (P < 0,05). Los coeficientes R<sup>2</sup>, R<sup>2</sup> ajustado, y R<sup>2</sup> predicho fueron iguales a: 0,5903, 0,4643 y 0,2561,

respectivamente (Tabla 3). La ecuación del modelo obtenido en términos de factores actuales para hacer predicciones de la respuesta pureza para distintos niveles de cada factor, fue:

$$\text{Pureza (\%)} = -1,7022 + 0,0953A - 0,2139B - 0,0042AB - 0,007A^2 - 0,0483B^2 \quad \text{Ecu. 5}$$

**Tabla 3**

*Análisis de varianza (ANOVA) para el modelo cuadrático. Respuesta 2: Pureza*

Fuente	Sum. de los cuadrados	df	Media de los cuadrados	Valor- F	Valor-P	
Bloque	0,0702	1	0,0702			
Modelo	1,30	8	0,1625	4,68	0,0012	Significativo
A-Sufato de amonio	0,2072	1	0,2072	5,97	0,0216	
B-Tiempo de precipitación	0,6468	1	0,6468	18,64	0,0002	
C-Temperatura de precipitación	0,0023	1	0,0023	0,0673	0,7973	
AB	0,0638	1	0,0638	1,84	0,1869	
AC	0,0117	1	0,0117	0,3373	0,5664	
BC	0,1262	1	0,1262	3,64	0,0677	
A <sup>2</sup>	0,2233	1	0,2233	6,44	0,0175	
B <sup>2</sup>	0,0187	1	0,0187	0,5386	0,4696	
Residual	0,9021	26	0,0347			
Total de corridas	2,27	35				

Fuente	Sum. de los cuadrados	df	Media de los cuadrados	Valor- F	Valor-P
R <sup>2</sup>	0,5903				
R <sup>2</sup> ajustado	0,4643				
R <sup>2</sup> predicho	0,2561				

Nota. Elaboración propia.

Los datos de costo se ajustaron mejor a un modelo cuadrático al igual que las otras respuestas. A, B, C, AC, BC y A<sup>2</sup> fueron términos significativos del modelo ( $P < 0,05$ ). Los coeficientes R<sup>2</sup>, R<sup>2</sup> ajustado, y R<sup>2</sup> predicho fueron iguales a:

1,000, 1,000 y 1,000, respectivamente (Tabla 4). También, la ecuación del modelo obtenido en términos de factores actuales, puede ser utilizada para hacer predicciones de la respuesta pureza, para distintos niveles de cada factor:

Ecu. 6

$$\text{Costo (USD \$)} = 0,014788 + 0,002489A + 1,74963^{-17} B - 2,18576^{-20} AB + 0,000016A^2 - 3,88354^{-18}B^2$$

**Tabla 4**

*Análisis de varianza (ANOVA) para el modelo cuadrático. Respuesta 3: Costo*

Fuente	Sum. de los cuadrados	df	Media de los cuadrados	Valor- F	Valor-P	
Bloque	0,0000	1	0,0000			
Modelo	0,1198	8	0,0150	6,645E+05	< 0,0001	Significativo
A-Sufato de amonio	0,1170	1	0,1170	5,192E+06	< 0,0001	
B-Tiempo de precipitación	3,109E-07	1	3,109E-07	13,80	0,0010	
C-Temperatura de precipitación	0,0025	1	0,0025	1,112E+05	< 0,0001	
AB	0,0000	1	0,0000	0,0000	1,0000	
AC	0,0002	1	0,0002	7800,00	< 0,0001	
BC	3,109E-07	1	3,109E-07	13,80	0,0010	
A <sup>2</sup>	0,0001	1	0,0001	4396,75	< 0,0001	
B <sup>2</sup>	0,0000	1	0,0000	0,0000	1,0000	
Residual	5,858E-07	26	2,253E-08			
Total de corridas	0,1198	35				
R <sup>2</sup>	1,0000					
R <sup>2</sup> ajustado	1,0000					
R <sup>2</sup> predicho	1,0000					

Nota. Elaboración propia.

### Condiciones óptimas para la precipitación de celulasas con sulfato de amonio

Mediante la función de optimización del Design-Expert 11.1.2, se encontraron las condiciones óptimas para maximizar el rendimiento y la pureza, lo que minimiza el costo y mantiene las variables independientes en el rango utilizado. Las condiciones óptimas estimadas fueron: 68,99 % de sulfato de amonio, tiempo de precipitación

igual a 1,28 h y temperatura de 25 °C (Tabla 5). En estas condiciones los valores predichos para las respuestas rendimiento, pureza y costo, fueron: 74,81 %, 1,26 y USD \$ 0,2609, respectivamente (Tabla 6). Las condiciones óptimas predichas se validaron experimentalmente mediante tres réplicas, los valores promedios se encontraron dentro del intervalo de predicción con 95 % de confianza, lo que demuestra la fiabilidad de la metodología empleada (Tabla 6).

**Tabla 5**

*Condiciones óptimas estimadas para maximizar el rendimiento y la pureza, al mínimo costo posible, en la etapa de precipitación de celulasas con sulfato de amonio.*

Factores	Condiciones óptimas
Concentración de sulfato de amonio (%)	68,97
Tiempo de precipitación (h)	1,28
Temperatura de precipitación (°C)	25

Nota. Elaboración propia.

**Tabla 6**

*Valores predichos y observados experimentalmente de las variables respuestas en las condiciones óptimas estimadas.*

Respuestas	Valores predichos	n (Núm. réplicas)	Desv. Estand.	IP bajo 95 %	Valores observados	IP alto 95 %
Rendimiento (%)	67,04	3	8,88162	52,6306	74,81	78,07
Pureza (%)	1,354	3	0,186274	1,09028	1,26	1,62382
Costo (USD \$)	0,265	3	0,000150	0,26062	0,2609	0,261058

Nota. Elaboración propia.

En las condiciones óptimas encontradas, el máximo rendimiento que se obtuvo fue de 74,81 %, el cual es superior a los resultados obtenidos por otros autores (Ijaz *et al.*, 2014), quienes lograron un 18,97 % de rendimiento, empleando el mismo paso de purificación de celulasas obtenidas por FES a partir *Aspergillus niger*. Sin embargo, otros autores (Ahmed *et al.*, 2015) obtuvieron rendimientos de 76,4 % utilizando 80 % de saturación con sulfato de amonio para la precipitación del crudo enzimático producido por *Aspergillus niger*. También, Farinas *et al.* (2011), alcanzaron 56 % de recobrado al emplear el 80 % de saturación con sulfato de amonio, durante 3 h a una temperatura de 10 °C.

En cuanto a la pureza, en las condiciones óptimas ésta fue de 1,26, esto significa que se logró purificar la enzima de interés mediante la precipitación con sulfato de amonio hasta 1,26 veces el valor obtenido en el crudo enzimático. El nivel de pureza alcanzado fue superior al obtenido por Ijaz *et al.* (2014), Iqbal *et al.* (2011) y Hamdan y Jasim (2018) en condiciones experimentales similares. En cambio, otros autores han obtenido mayor grado de pureza. Sin embargo, no tuvieron en cuenta la determinación

de condiciones óptimas globales, donde también se considerara maximizar el rendimiento y la pureza y minimizar el costo (Afzal *et al.*, 2019; Ahmed *et al.*, 2015; Nehad *et al.*, 2019).

El costo de la purificación en las condiciones óptimas predichas en este estudio fue de USD \$ 0,2609. La purificación de celulasas para su posterior uso en la obtención de bioetanol, constituye la etapa de mayor influencia en los costos de producción de este biocombustible. En este estudio, no se consideraron todas las partidas que influyen en el costo de producción debido a que la investigación se encontraba en etapas tempranas, y no se cuenta con un sistema productivo establecido para la purificación de celulasas. Por tanto, el costo de la etapa se calculó en consideración a dos de los factores que más influyen en la precipitación: cantidad de sulfato de amonio y tiempo. De esta forma, el objetivo fue trabajar en disminuir los costos asociados a la precipitación con sulfato de amonio desde etapas tempranas. De este modo, se lograron aportes positivos para el establecimiento futuro de la purificación de celulasas a escala productiva aplicando los resultados de este estudio.

### Caracterización electroforética de las fracciones obtenidas

En la Figura 2 se muestra el patrón electroforético de las fracciones eluidas de la columna cromatográfica mediante un gradiente escalonado de concentraciones de NaCl (0,15, 0,20 y 0,30 M).

En el extracto se evidencia la presencia de bandas de proteínas que presentan un amplio rango de peso molecular desde 21 hasta más de 100 kilodaltons (kDa), las más representadas en la zona de 40 kDa aproximadamente. De

igual forma, la fracción 1 muestra una amplia distribución con respecto al peso molecular. Sin embargo, presenta poca actividad celulolítica (Figura 3). La fracción 2 exhibe visiblemente un grado mayor de pureza y despliega dos bandas predominantes en el rango de 30 a 40 kDa, con una disminución en la presencia e intensidad de prácticamente todas las bandas de peso superior y una ausencia total de bandas de peso inferior a 30 kDa. Ésta fracción mostró la mayor actividad enzimática específica (Figura 3). La fracción 3 también manifiesta un mayor grado de pureza en comparación con la primera fracción, pero con una actividad enzimática específica inferior a la segunda fracción (Figura 3).

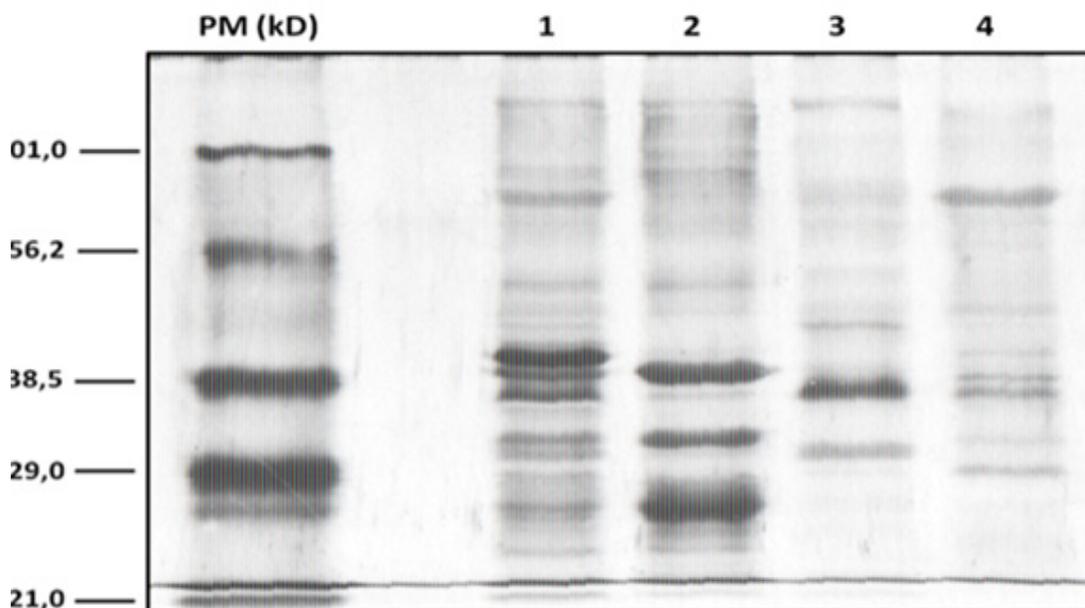


Figura 2

*Patrón electroforético del extracto con actividad celulolítica obtenido a partir de *Aspergillus niger* y de las fracciones resultantes de la cromatografía de intercambio iónico.*

*Nota. PM: patrón de peso molecular, 1: extracto de celulasas, 2: fracción 1 eluida con 0,15 M de NaCl, 3: fracción 2 eluida con 0,20 M de NaCl y 4: fracción 3 eluida con 0,30 M de NaCl. Elaboración propia.*

Al integrar el análisis de las bandas de proteínas presentes en cada fracción con el valor de la actividad enzimática específica de las mismas, se obtuvo como resultado preliminar la identificación de una banda con probabilidad de ser responsable de la actividad endoglucanasa. En la fracción 2, la banda reforzada está presente alrededor de los 38 kDa, también se observa, pero con menor intensidad en la fracción 3, y casi de forma insignificante en la fracción 1. El resto de

las bandas principales presentes en la fracción 2 no presentan coincidencia en la fracción 3. Teniendo en cuenta que estas dos fracciones son las de mayor actividad enzimática específica (16,5 y 12,9 UI/mg, respectivamente), es probable que la proteína representada por esta banda sea, al menos en parte, la responsable de la actividad endoglucanasa del crudo enzimático obtenido a partir de *Aspergillus niger* UC33.

El cálculo del peso molecular de la banda identificada en la fracción 2 arrojó un valor de 38,47 kDa. El peso molecular de endoglucanasas producidas por *Aspergillus niger* se encuentran

en el rango de 30 a 45 kDa, según otros autores (Devi y Kumar, 2012; Ijaz *et al.*, 2014). Este dato refuerza la probabilidad de que la banda propuesta corresponda a una endoglucanasa.

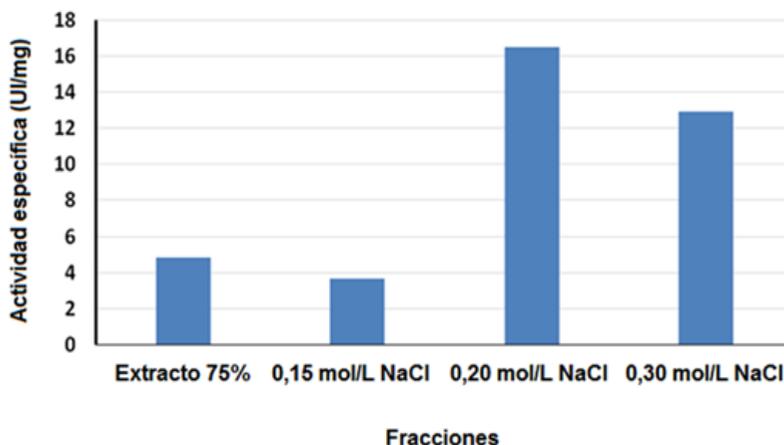


Figura 3

*Actividad enzimática endoglucanasa específica del crudo enzimático obtenido a partir de Aspergillus niger y las fracciones obtenidas mediante cromatografía de intercambio iónico.*

Nota. Elaboración propia.

## Conclusiones

Las variables tiempo de precipitación, concentración de sulfato de amonio y temperatura influyen significativamente en la precipitación de celulasas. La determinación de los valores óptimos de las variables experimentales, teniendo en cuenta la interrelación entre ellas, permite maximizar, a la vez, el rendimiento y la pureza de celulasas. La precipitación de celulasas con el uso de sulfato de amonio constituye un método eficiente para garantizar buenos resultados de rendimientos y pureza, a un bajo costo de la etapa.

## Referencias

Abdullah, R., Akhtar, A., Nisar, K., Kaleem, A., Iqtedar, M., Iftikhar, T., Saleem, F., y Aslam, F. (2021). Process optimization for enhanced production of cellulases from locally isolated fungal strain by submerged fermentation. *Bioscience Journal*, 37, e37021. <https://doi.org/10.14393/BJ-v37n0a2021-53815>

Afzal, M., Qureshi, M. Z., Khan, S., Khan, M. I., Ikram, H., Ashraf, A., Iqbal, A., y Quresh, N. A. (2019). Production, purification and optimization of cellulase by *Bacillus licheniformis* HI-08 isolated from the

hindgut of wood-feeding termite. *International Journal of Agriculture & Biology*, 21(1), 125-134. <https://doi.org/10.17957/IJAB/15.0872>

Ahmed, K., Munawar, S., y Naz, S. (2015). Purification and characterization of cellulase from *Aspergillus niger* (Van Tieghem, 1867). *Science International (Lahore)*, 27(5), 4341-4344. <http://www.sci-int.com/pdf/636341779348991064.pdf>

Amritkar, N., Kamat, M., y Lali, A. (2004). Expanded bed affinity purification of bacterial alpha-amylase and cellulase on composite substrate analogue-cellulose matrices. *Process Biochemistry*, 39(5), 565-570. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00123-7](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00123-7)

Bakare, M. K., Adewale, I. O., Ajayi, A., y Shonukan, O. O. (2005). Purification and characterization of cellulase from the wild-type and two improved mutants of *Pseudomonas fluorescens*. *African Journal of Biotechnology*, 4 (9), 898-904. <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/download/7111/60085>

Behera, S. S., y Ray, R. C. (2016). Solid state fermentation for production of microbial cellulases: Recent advances and improvement strategies. *International Journal of Biological Macromolecules*, 86, 656-669. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.10.090>

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of

protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72 (1-2): 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

Cerda, A., Gea, T., Vargas-García, M. C., y Sánchez, A. (2017). Towards a competitive solid state fermentation: Cellulases production from coffee husk by sequential batch operation and role of microbial diversity. *Science of the Total Environment*, 589, 56-65. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.184>

Chaplin, M. F. (1994). Monosaccharides. In M. F. En Chaplin, M. F. y Kennedy, J. F. (Eds.), *Carbohydrate Analysis: A Practical Approach*, 24-25. Oxford University Press.

Das, A., Paul, T., Halder, S. K., Jana, A., Ghosh, K., Maity, C., Das, P. K. M., Pati, B., y Mondal, K. C. (2013). Low cost single-step purification of endoglucanase from *Aspergillus fumigatus* ABK-9. *Indian Journal of Experimental Biology*, 51 (11), 954-959. [http://nopr.hiscair.res.in/bitstream/123456789/23461/1/IJEB%2051\(11\)%20954-959.pdf](http://nopr.hiscair.res.in/bitstream/123456789/23461/1/IJEB%2051(11)%20954-959.pdf)

Devi, M. C., y Kumar, M. S. (2012). Production, optimization and partial purification of cellulase by *Aspergillus niger* fermented with paper and timber sawmill industrial wastes. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 2 (1): 120-128. <https://www.semanticscholar.org/paper/Production%2C-Optimization-and-Partial-purification-Devi-Kumar/59dc009e5be5abd213284c2529f92d086aa2063b>

Doi, R. H., y Kosugi, A. (2004). Cellulosomes: Plant-cell-wall degrading enzyme complexes. *Nature Reviews: Microbiology*, 2, 541-551. <https://doi.org/10.1038/nrmicro925>

Ejaz, U., Sohail, M., y Ghanemj, A. (2021). Cellulases: From bioactivity to a variety of industrial applications. *Biomimetics*, 6 (3). <https://doi.org/10.3390/biomimetics6030044>

EnCor Biotechnology Inc. (2022). Ammonium sulfate calculator. <http://www.encorbio.com/protocols/AM-SO4.htm>

Faheina, G. d. S., Amorim, M. V. da F. S., Souza, C. G. d., Sousa, D. M. d., Sousa, K. A. d., y Pinto, G. A. S. (2015). Strategies to increase cellulase production with submerged fermentation using fungi isolated from the Brazilian biome. *Acta Scientiarum. Biological Science*, 37 (1), 15-22. <https://doi.org/10.4025/actasciobiolsci.v37i1.23483>

Farinas, C. S., Scarpelini, L. M., Miranda, E. A., y Neto, V. B. (2011). Evaluation of operational parameters on the precipitation of endoglucanase and xylanase produced by solid state fermentation of *Aspergillus niger*. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 28

(1), 17-26. <https://www.scielo.br/j/bjce/a/7bmDY3gM5svf6mW4zDmVskS/?format=pdf&lang=en>

Hamdan, N. T., y Jasim, H. M. (2018). Purification and characterization of cellulase enzyme from *Trichoderma longibrachiatum* isolated in Iraqi soil. *IOSR Journal of Biotechnology and Biochemistry*, 4 (1), 32-41. <https://doi.org/10.8790/264X-04013241>

Han, W., y He, M. (2010). The application of exogenous cellulase to improve soil fertility and plant growth due to acceleration of straw decomposition. *Bioresource Technology*, 101 (10), 3724-3731. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.104>

Hasunuma, T., Okazaki, F., Okai, N., Hara, K. Y., Ishii, J., y Kondo, A. (2013). A review of enzymes and microbes for lignocellulosic biorefinery and the possibility of their application to consolidated bioprocessing technology. *Bioresource Technology*, 135, 513-522. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.047>

Heukeshoven, J., y Dernick, R. (1985). Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis*, 6 (3), 103-112. <https://doi.org/10.1002/elps.1150060302>

Hölker, U., Höfer, M., y Lenz, J. (2004). Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Appl Microbiol Biotechnol*, 64, 175-186. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1504-3>

Ijaz, A., Anwar, Z., Irshad, M., Iqbal, Z., Arshad, M., Javed, M., Zulfiqar, M., Rehman, A., y Ahmad, A. (2014). Purification and kinetic characterization of statistically optimized cellulase produced from *Aspergillus niger*. *Romanian Biotechnological Letters*, 19 (6), 9835-9845. <https://e-repository.org/rbl/vol.19/iss.6/4.pdf>

ITW Reagents Division. (2022). Ammonium Sulfate for molecular biology. PanReac AppliChem. <https://www.itwreagents.com/rest-of-world/en/product/ammonium-sulfate-for-molecular-biology/A3485>

Iqbal, H. M. N., Ahmed, I., Zia, M. A., y Irfan, M. (2011). Purification and characterization of the kinetic parameters of cellulase produced from wheat straw by *Trichoderma viride* under SSF and its detergent compatibility. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 2 (3), 149-156. <https://doi.org/10.4236/abb.2011.23024>

Islam, F., y Roy, N. (2018). Screening, purification and characterization of cellulase from cellulase producing bacteria in molasses. *BMC Research Notes*, 11, 1-6. <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3558-4>

Juturu, V., y Wu, J. C. (2014). Microbial cellulases: Engineering, production and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 33, 188-203. <http://doi.org/10.1016/j.rser.2014.01.077>

Kumar, B., Bhardwaj, N., Alam, A., Agrawal, K., Prasad, H., y Verma, P. (2018). Production, purification and characterization of an acid/alkali and thermo tolerant cellulase from *Schizophyllum commune* NAIMCCF03379 and its application in hydrolysis of lignocellulosic wastes. *AMB Express*, 8 (173), 1-16. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0696-y>

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>

Lee, K. C., Tong, W. Y., Ibrahim, D., Arai, T., Murata, Y., Mori, Y., y Kosugi, A. (2016). Evaluation of enzymatic deinking of non-impact ink laser-printed paper using crude enzyme from *Penicillium rolsii* c3-2(1) IBRL. *Appl Biochem Biotechnol*, 181 (1), 451-463. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2223-4>

Leon-Revelo, G., Cujilema-Quitio, M. C., Baryolo, L., Rosero, E., Córdova, J., y Ramos-Sánchez, L. B. (2017). Efecto del pH en la producción de celulasas de *Aspergillus niger* en fermentación sólida. *Revista Centro Azúcar*, 44 (2), 27-38. [http://centrozucar.uclv.edu.cu/index.php/centro\\_azucar/article/view/98/91](http://centrozucar.uclv.edu.cu/index.php/centro_azucar/article/view/98/91)

Liu, Y., Guo, H., Gu, J., y Qin, W. (2019). Optimize purification of a cellulase from *Bacillus velezensis* A4 by aqueous two-phase system (ATPS) using response surface methodology. *Process Biochemistry*, 87, 196-203. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.08.017>

Lodha, A., Pawar, S., y Rathod, V. (2020). Optimised cellulase production from fungal co-culture of *Trichoderma reesei* NCIM 1186 and *Penicillium citrinum* NCIM 768 under solid state fermentation. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 8(5), 103958. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.103958>

Malik, W. A., y Javed, S. (2021). Biochemical characterization of cellulase from *Bacillus subtilis* strain and its effect on digestibility and structural modifications of lignocellulose rich biomass. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 1-15. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.800265>

Manan, M. A., y Webb, C. (2017). Design aspects of solid state fermentation as applied to microbial bioprocessing. *Journal of Applied Biotechnology & Bioengineering*, 4 (1), 511-532. <https://doi.org/10.15406/jabb.2017.04.00094>

Marín, R. M. (2007). Caracterización y expresión recombinante de una celulasa de origen antártico. (Tesis de pregrado, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Universidad de Chile). Repositorio Institucional. Santiago de Chile. [https://repositorio.uchile.cl/tesis/uchile/2007/marin\\_ra/sources/marin\\_ra.pdf](https://repositorio.uchile.cl/tesis/uchile/2007/marin_ra/sources/marin_ra.pdf)

Mrudula, S., y Murugammal, R. (2011). Production of cellulase by *Aspergillus niger* under submerged and solid state fermentation using coir waste as a substrate. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42 (3), 1119-1127. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822011000300033>

Nehad, E. A., Yoness, M. F., y Reem, A. A. (2019). Optimization and purification of cellulase produced by *Penicillium decumbens* and its application. *Egyptian Pharmaceutical Journal*, 18(4): 391-402. [https://doi.org/10.4103/epj.epj\\_31\\_19](https://doi.org/10.4103/epj.epj_31_19)

Oliveira, J. S. D., de Araujo, P. C. E., Alves, E. de A., Ribeiro, G. de M., y dos Santos, E. S. (2020). Recovery and purification of cellulolytic enzymes from *Aspergillus fumigatus* CCT 7873 using an aqueous two-phase micellar system. *Annals of Microbiology*, 70 (23): 1-12. <https://doi.org/10.1186/s13213-020-01573-w>

Pathak, P., Bhardwaj, N. K., y Singh, A. K. (2014). Production of crude cellulase and xylanase from *Trichoderma harzianum* PPDDN10 NFCCI-2925 and its application in photocopier waste paper recycling. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172 (8), 3776-3797. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-0758-9>

Rabinovich, M. L., Melnick, M. S., y Bolobova, A. V. (2002). The structure and mechanism of action of cellulolytic enzymes. *Biochemistry (Moscow)*, 67 (8), 850-871. <https://doi.org/10.1023/A:1019958419032>

Raju, P. S., y Bawa, A. S. (2006). Food additives in fruit processing. In Hui, Y. H. (Ed.), *Handbook of Fruits and Fruit Processing*, 145-170. Blackwell Publishing. <https://doi.org/10.1002/9780470277737.ch9>

Sajith, S., Sreedevi, S., Priji, P., Unni, K. N., y Benjamin, S. (2014). Production and partial purification of cellulase from a novel fungus, *Aspergillus flavus* BS1. *Annals of Microbiology*, 64, 763-771. <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0711-0>

Sathya, T. A., y Khan, M. (2014). Diversity of glycosyl hydrolase enzymes from metagenome and their application in food industry. *Journal of Food Science*, 79 (11), R2149 - R2156. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12677>

Singhania, R. R., Sukumaran, R. K., Patel, A. K., Larroche, C., y Pandey, A. (2010). Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme and Microbial Technology*, 46 (7), 541-549. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.03.010>

Siqueira, J. G. W., Rodrigues, C., Vandenberghe, L. P. d. S., Woiciechowski, A. L., y Soccol, C. R. (2020). Current advances in on-site cellulase production and application on lignocellulosic biomass conversion to biofuels: A review. *Biomass and Bioenergy*, 132, 105419. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.105419>

Sukumaran, R. K., Singhania, R. R., y Pandey, A. (2005). Microbial cellulases - Production, application and challenges. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 64 (11), 832-844. [https://www.researchgate.net/profile/Reeta-Singhania/publication/228635285\\_Microbial\\_cellulases-Production\\_applications\\_and\\_challenges/links/09e41507fb3568861a000007\\_Microbial-cellulases-Production-applications-and-challenges.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Reeta-Singhania/publication/228635285_Microbial_cellulases-Production_applications_and_challenges/links/09e41507fb3568861a000007_Microbial-cellulases-Production-applications-and-challenges.pdf)

Sulyman, A. O., Igunnu, A., y Malomo, S. O. (2020). Isolation, purification and characterization of cellulase produced by *Aspergillus niger* cultured on *Arachis hypogaea* shells. *Heliyon*, 6 (12), e05668. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05668>

Wu, J. C., Ng, K. R., Chong, J., Yang, K. J., Ping, X. L., Nam, C. T., y Nugroho, A. J. (2010). Recovery of cellulases by adsorption/desorption using cation exchange resins. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 27 (2), 46-473. <https://doi.org/10.1007/s11814-010-0096-8>

Yang, S.-T., El-Enshasy, H., y Thongchul, N. (2013). *Bioprocessing technologies in biorefinery for sustainable production of fuels, chemicals, and polymers*. John Wiley & Sons, Inc. New Jersey, USA. <https://es.b-ok.lat/book/2159136/f07836>

Zahra, T., Irfan, M., Nadeem, M., Ghazanfar, M., Ahmad, Q., Ali, S., Siddique, F., Yasmeen, Z., y Franco, M. (2020). Cellulase production by *Trichoderma viride* in submerged fermentation using response surface methodology. *Punjab University Journal of Zoology*, 35(2), 223-228. <https://dx.doi.org/10.17582/journal.pujz/2020.35.2.223.228>

Zapata, Y. M., Galviz-Quezada, A., y Osorio, V. M. (2018). Cellulases production on paper and sawdust using native *Trichoderma asperellum*. *Universitas Scientiarum*, 23(3), 419-436. <https://doi.org/10.11144/Javeriana.SC23-3.cpop>