

PRODUCCIÓN DE CELULASAS BACTERIANAS TERMOESTABLES UTILIZANDO PAPEL PERIÓDICO RECICLADO COMO SUSTRATO

Héber Esaú Ramírez Arua^{1,a}, Roberto Castellanos Cabrera^{1,b}

RESUMEN

Dieciocho bacterias termófilas, codificadas y morfológicamente diferentes, fueron seleccionadas por su habilidad para producir enzimas celulolíticas. Entre ellas se seleccionó CB-13 por su alto potencial para producir celulasa. El análisis de su gen ARNr 16S reveló su estrecha relación con *Geobacillus thermoparaffinivorans*. El efecto de diez variables de cultivo sobre la producción de celulasa se evaluó mediante la implementación del diseño estadístico de Plackett-Burman. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, peptona y KH_2PO_4 fueron las variables más significativas que afectaron la producción de celulasa utilizando papel periódico reciclado como sustrato. Un medio no-optimizado, basado en los componentes iniciales, dio una actividad enzimática de 0,106 FPU. $min^{-1} \cdot mL^{-1}$. Para una optimización, se aplicó el diseño experimental multifactorial Box-Behnken de catorce ensayos para determinar el nivel óptimo de cada una de las variables significativas. Las variables probadas: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (X_1), peptona (X_2) y KH_2PO_4 (X_3), cada uno en tres niveles diferentes, codificados como -1, 0, +1. Los niveles óptimos de los tres componentes se constituyeron en ($g \cdot L^{-1}$): 1,1 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 1,5 peptona y 9,0 KH_2PO_4 con una actividad prevista de aproximadamente 0,324 FPU. $min^{-1} \cdot mL^{-1}$; de acuerdo con los resultados de los diseños de Plackett-Burman y Box-Behnken, la composición de medio óptimo es ($g \cdot L^{-1}$): 3,0 g papel periódico; 2,5 lactosa; 2,5 sucrosa; 11,7 $(NH_4)_2SO_4$; 0,6 $CaCl_2$; 2,0 extracto de levadura; 1,1 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 9,0 KH_2PO_4 ; 1,5 peptona; pH 6,5; temperatura de cultivo 60 °C y tiempo de incubación 72 h; la actividad enzimática medida en este medio fue de 0,292 FPU. $min^{-1} \cdot mL^{-1}$, generando un rendimiento promedio de 97,44 FPU. gss^{-1} . Adicionalmente, se intentó separar y purificar la β -glucosidasa mediante IEXC. El respectivo análisis de sus fracciones resultantes por SDS-PAGE, definió el peso molecular de la enzima con un valor aproximado de 92,6 kDa. Finalmente, la caracterización funcional de las celulastas totales, mostró el pH de 7,0 y la temperatura de 70 °C como óptimos para la actividad. En la evaluación de la termoestabilidad, la actividad FPAasa se mantuvo alrededor del 120% y 80% de su valor inicial después de la incubación a 70 °C por 60 min y 80 °C por 120 min, respectivamente.

Palabras clave: Celulasa/ β -glucosidasa; Producción de enzimas termoestables; *Geobacillus thermoparaffinivorans*.

PRODUCTION OF THERMOSTABLE BACTERIAL CELLULASE USING OLD NEWSPAPER AS SUBSTRATE

ABSTRACT

Eighteen thermophilic bacteria, codified and morphologically different, were selected for their ability to produce cellulolytic enzymes. Among them, CB-13 was selected because of its high potential to produce cellulase. Analysis of the sequences of its 16S rRNA gene revealed its close relationship with *Geobacillus thermoparaffinivorans*. The effect of ten culture variables on cellulase production was assessed by implementing the Plackett-Burman statistical design. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, peptone and KH_2PO_4 were the most significant variables affecting cellulase production. A non-optimized medium based on the initial components gave an enzymatic activity of 0,106 FPU. $min^{-1} \cdot mL^{-1}$. For an optimization, the multivariate Box-Behnken experimental design of fourteen trials was applied to determine the optimal level of each of the variables significant. The tested variables: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (X_1), peptone (X_2) and KH_2PO_4 (X_3), each in three different levels, coded as -1, 0, +1. The optimal levels of the three components were constituted in ($g \cdot L^{-1}$): 1,1 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 1,5 peptone and 9,0 KH_2PO_4 with an expected activity of approximately 0,324 FPU. $min^{-1} \cdot mL^{-1}$; according to the results of the Plackett-Burman and Box-Behnken designs, the optimum medium composition is ($g \cdot L^{-1}$): 3,0 g old newspaper; 2,5 lactose; 2,5 sucrose; 11,7 $(NH_4)_2SO_4$; 0,6 $CaCl_2$; 2,0 yeast extract; 1,1 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 9,0 KH_2PO_4 ; 1,5 peptone; pH 6,5; culture temperature 60 °C and incubation time 72 h; the enzymatic activity measured in this medium was of 0,292 FPU. $min^{-1} \cdot mL^{-1}$, generating an average yield of 97.44 FPU. gss^{-1} . Additionally, it was attempted to separate and purify β -glucosidase by IEXC. The respective analysis of their resulting fractions by SDS-PAGE, defined the molecular weight of the enzyme with an approximate value of 92.6 kDa. Finally, the functional characterization of the total cellulases showed the pH of 7.0 and the temperature of 70 °C as optimum for the activity. In the evaluation of thermostability, FPAase activity was maintained around 120% and 80% of its initial value after incubation at 70 °C for 60 min and 80 °C for 120 min, respectively.

Key words: Cellulase/ β -glucosidase; Production of thermostable enzymes; *Geobacillus thermoparaffinivorans*.

¹ Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Tacna, Perú.

^a Bachiller en ciencias biológicas.

^b Biólogo. Magister en bioquímica. Asesor e Investigador Principal Proyecto de Investigación "Tratamiento biotecnológico con enzimas termoestables bacterianas para el destintado del papel periódico y de oficina en su proceso de reciclado". FONDECYT/CONCYTEC - UNJBG

INTRODUCCIÓN

De todas las enzimas conocidas, la celulasa (glicosil hidrolasa) es un sistema enzimático que tiene la función natural de hidrolizar enlaces del tipo β -1,4-glucosídico del polímero celulosa, liberando glucosa como producto; su eficiencia hidrolítica depende de la operación secuencial y acción sinérgica al menos tres enzimas. De acuerdo al sitio de acción sobre la celulosa se clasifican en tres grandes grupos: endoglucanasas (β -1,4 glucano glucohidrolasa), exoglucanasas (1,4- β D-glucano hidrolasa, exo β -1,4 celobiohidrolasa tipo I y exo β -1,4 celobiohidrolasa tipo II) y las β -1,4 glucosidasas⁽¹⁻³⁾.

La producción de celulasas, a partir de material lignocelulósico, se intentó por muchos investigadores. Esto se debe a la gran cantidad de residuos celulósicos que pueden ser medidos en billones de toneladas y que son utilizados y producidos en el mundo entero como resultado de actividades en la agricultura y la industria⁽⁴⁾. La acumulación de papel periódico en la basura abunda durante el año, debido a que es de uso cotidiano. Este papel es usado pobremente en su reciclado, por la baja calidad de su producto final, además que, tras varios ciclos de reciclaje, se torna cada vez más inútil. La producción de enzimas de interés industrial por fermentación requiere utilizar un sustrato de bajo o nulo precio para disminuir los costos de producción en gran medida⁽⁵⁾, así como el reconocimiento de los parámetros importantes que afectan la misma, tales como: la estabilidad a elevadas temperaturas de reacción como propiedad ventajosa en aplicaciones industriales⁽⁶⁾.

Se han descrito una variedad de condiciones que estimulan o reprimen la producción de enzimas celulolíticas incluyendo el tipo y concentración de fuentes de carbono y nitrógeno, pH, aireación, iones metálicos y temperatura del medio de cultivo. La optimización de las condiciones de fermentación, los parámetros físicos y químicos son de importancia primordial en el desarrollo de cualquier proceso de fermentación debido a su impacto en la economía y la viabilidad del proceso. La diversidad de interacciones de los componentes del medio con el metabolismo de las células, no permiten un modelado detallado satisfactorio. Los diseños experimentales estadísticos se han utilizado por décadas y pueden ser adoptados en varias fases de una estrategia de optimización⁽⁷⁾. Algunas de las opciones de aplicación de diseños

estadísticos al bioprocesamiento, incluyen el diseño de Plackett-Burman⁽⁸⁾, y la metodología superficie de respuesta con varios diseños⁽⁹⁾.

El objetivo principal del presente estudio fue producir celulasa termoestable utilizando papel periódico residual, luego de la selección e identificación de una bacteria termófila que exprese eficientemente una celulasa termoestable en un cultivo fermentativo al que se implementaron métodos de optimización para maximizar la producción de enzima.

MATERIALES Y MÉTODOS

a. Microorganismos

Se utilizó una colección de dieciocho bacterias para la selección, de solo una, por medio de una evaluación cualitativa y cuantitativa de la actividad celulolítica. Estas bacterias proceden de los geiseres de Calientes, Candarave, Tacna, que se encuentra a 4 300 msnm; fueron aisladas y gentilmente cedidas por el grupo de investigación del Laboratorio de Bioquímica de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann.

b. Pretratamiento y proceso del papel periódico

Se hizo un pretratamiento físico de acuerdo con las ventajas descritas por Binti⁽¹⁰⁾ que consistió en sumergir el papel periódico en agua por 10 minutos, para luego triturarse en licuadora en una concentración del 0,2% (p/v).

Finalmente, el homogeneizado se llevó a ebullición por 2 minutos y se filtró para eliminar el agua; se dejó secar a 60 °C por espacio de 4 horas y se almacenó en frasco hermético.

c. Selección cualitativa

Se desarrolló empleando inóculo de 50 μ L de cultivos bacterianos puros (DO \sim 0.4), reactivados en caldo Luria Bertani, que fueron sembrados por incorporación con 150 μ L de medio de producción para celulasas [(NH₄)₂SO₄ 11,7 g/L, KH₂PO₄ 3.7 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.6 g/L, CaCl₂·2H₂O 0,8 g/L, extracto de levadura 0,5 g/L, peptoná 0,5 g/L, FeSO₄·7H₂O 500 mg/L, MnSO₄·H₂O 160 mg/L, ZnSO₄·7H₂O 140 mg/L, CoCl₂·6H₂O 370 mg/L, sustrato 1% (p/v) y agar 2% (p/v); pH 6] en microplacas de 96 pozos con fondo plano, incubadas a 60 °C por 72 horas⁽¹¹⁾.

El contenido de cada pocillo se colocó en medios sólidos [sustrato al 0,5% (p/v), tampón fosfato 50 mM pH6 y agar al 2% (p/v)] para visualizar actividad de celulasas⁽¹²⁾; incubándose a 60 °C en baña maría por 24 horas. Finalmente, para el revelado de las zonas de hidrólisis por celulasas, se agregó solución Rojo de Congo al 0,1% (p/v), se dejó a temperatura ambiente por 15 minutos y luego se retiró el exceso de colorante con solución NaCl 1M⁽¹³⁾. Los ensayos se hicieron por triplicado para cada bacteria. Se midieron los diámetros de las zonas de hidrólisis, por la aparición de zonas no teñidas, como respuesta para la selección.

d. Selección cuantitativa

Inóculo y condiciones de producción

Por cada bacteria evaluada, se originó un cultivo en fase log (DO ~0,3) que se utilizó como inóculo (5% v/v) en medio de producción para celulasas [(NH₄)₂SO₄ 11,7 g/L; KH₂PO₄ 3,7 g/L; MgSO₄·7H₂O 0,6 g/L; CaCl₂·2H₂O 0,8 g/L; extracto de levadura 0,5 g/L; peptona 0,5 g/L; FeSO₄·7H₂O 500 mg/L; MnSO₄·H₂O 160 mg/L; ZnSO₄·7H₂O 140 mg/L; CoCl₂·6H₂O 370 mg/L y sustrato 1% (p/v); pH 6] [11]. Para la obtención del extracto crudo enzimático, se procedió a centrifugar a 10 000 rpm por 10 minutos, separando biomasa y sustrato como pellet, del sobrenadante a ~4 °C.

Actividad de celulasas totales

Para la determinación de la actividad de celulasas totales en FPU.mL⁻¹, se calculó la concentración de azúcares reductores liberados en reacción, según el método de Miller⁽¹⁴⁾, fijándose volúmenes a razón de 1:1:5 para diluciones de glucosa, reactivo DNS (ácido 3-dinitrosalicílico) y agua destilada, respectivamente. Se determinó una curva de calibración utilizando una solución de dextrosa de 5 mg/mL en tampón acetato de sodio (pH 5,8) como patrón para generar las diluciones; midiendo la densidad óptica a la longitud de onda de 540 nm.

Asimismo, los ensayos enzimáticos se hicieron en base al método descrito por Ghose⁽¹⁵⁾ en una mezcla de reacción con volumen final de 300 µL, a quien se le calculó el contenido de azúcares reductores según el método anterior detallado.

Actividad de β-glucosidasas

La actividad β-glucosidasa se determinó usando p-nitrofenil glucopiranosido (pNPG) como sustrato de acuerdo con Parry *et al.*⁽¹⁶⁾ y Kaur *et al.*⁽¹⁷⁾ La mezcla de ensayo contenía 100 µL de pNPG (2 mM), 100 µL de tampón acetato 50 mM (pH 5,8) y 200 µL de solución de enzima diluida. Después de la incubación, durante 30 min a 60 °C, la reacción fue detenida por la adición de 400 µL de tampón glicina-NaOH pH 10 (0,4 M). La absorbancia se midió a 405 nm y se definió una unidad de actividad enzimática como la cantidad de enzima que liberó 1 µmol de p-nitrofenol por minuto en la mezcla de reacción.

e. Optimización del medio fermentativo

Varios componentes del medio y parámetros de cultivo se han evaluado basado en el diseño factorial Plackett-Burman. Cada factor independiente fue examinado en dos niveles: 1 para nivel bajo y +1 para nivel alto. Este es una fracción de un diseño factorial de dos niveles y permite la investigación de n-1 variables en al menos n experimentos⁽¹⁸⁾.

Diez variables independientes (factores) se seleccionaron en 12 combinaciones de acuerdo con el diseño mostrado en la sección de resultados y discusión. El efecto principal de cada variable se calculó simplemente como la diferencia entre el promedio de mediciones realizadas en el ajuste alto (+1) y el promedio de mediciones observadas en el ajuste bajo (-1) de ese factor.

Todos los ensayos se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer de 100 mL que contenían 20 mL del medio fermentativo. El diseño de Plackett-Burman se basa en el modelo de primer orden: $Y = B_0 + \sum B_i X_i$; donde, Y es la respuesta (actividad celulolítica), B₀ es el intercepto del modelo, B_i es la estimación de la variable y X_i representa la variable.

La significancia de las variables se determinó mediante el cálculo del valor de p (p-valor) a través del análisis de regresión estándar. Después de estimar la importancia relativa de las variables independientes, se seleccionaron las tres variables más significativas para determinar su nivel óptimo con respecto a la actividad enzimática como respuesta. Por esta razón,

se aplicó el diseño de Box-Behnken, que implica tres pasos principales: realizar los experimentos diseñados estadísticamente, estimar los coeficientes del modelo matemático estructurado y predecir la respuesta y comprobar la adecuación del modelo⁽¹⁸⁾.

Se evaluaron los efectos del sulfato de magnesio, peptona y fosfato monobásico de potasio sobre la actividad celulasa. Los niveles de estos factores se optimizaron para la máxima producción de celulasa (la respuesta). En los resultados muestra un diseño experimental de 14 ensayos, donde cada variable se probó en tres niveles diferentes: bajo (-1), medio (0) y alto (+1). Una vez que se midió la actividad de la celulasa, se ajustó el modelo polinomial de segundo orden a los datos de respuesta obtenidos a partir del diseño, para generar la predicción mediante la herramienta *Optimizador de respuesta* del programa Minitab 17. La ecuación polinomial tiene la siguiente forma:

$$Y = B_0 + B_1X_1 + B_2X_2 + B_3X_3 + B_{11}X_1^2 + B_{22}X_2^2 + B_{33}X_3^2 + B_{12}X_1X_2 + B_{13}X_1X_3 + B_{23}X_2X_3$$

Donde, Y es la respuesta pronosticada; B_0 es la constante del modelo; X_1 , X_2 y X_3 son variables independientes; B_1 , B_2 y B_3 son coeficientes lineales; B_{11} , B_{13} y B_{23} son coeficientes de los productos cruzados y B_{11} , B_{22} y B_{33} son los coeficientes cuadráticos.

f. Recuperación, separación y purificación

Para la etapa de recuperación de la enzima se procedió a precipitar las proteínas del extracto crudo; obtenido de medio líquido fermentativo de 72 horas centrifugando a 10 000 rpm por 5 minutos; con $(NH_4)_2SO_4$ al 70%, seguido de su diafiltración utilizando los dispositivos Amicon™ MWCO 30 kDa para quitar el exceso de sulfato de amonio y a la vez equilibrar las proteínas en buffer Tris-HCl pH 8,5 y almacenarse para la siguiente fase.

Para la etapa de separación y purificación parcial, se realizó un ensayo cromatográfico de intercambio iónico, utilizando DEAE-Sepharose GE Healthcare. Para esto se dejó interactuar la resina, pre-equilibrada en el mismo buffer, con la muestra anterior por espacio de 1 hora. Al mismo tiempo, se preparó una curva de NaCl desde concentraciones de 0 a 1000 mM para generar los eluatos. Para todas las etapas mencionadas se trabajó a temperaturas de ~4 °C.

RESULTADOS

a. Selección cualitativa

Se determinaron los diámetros de las zonas con hidrólisis y para determinar las mejores bacterias productoras de celulasas se procedió a comparar los promedios del diámetro de la zona de hidrólisis, mediante la prueba de Duncan.

Tabla 1. Promedios de significancia de Duncan para los diámetros de la zona de hidrólisis por celulasas

Bacteria	Casos	\bar{Y}_i	GH
FT-3	2	5,50	a
FT-8	2	6,00	ab
CB-20	2	7,00	bc
Cel-10	2	7,25	bcd
CB-16	2	7,50	cd
FT-14	2	7,50	cd
BT-19	2	8,25	cde
FT-13	2	8,50	de
FT-10	2	8,50	de
BT-13	2	9,00	ef
TM-8	2	9,00	ef
BT-20	2	9,00	ef
BT-14	2	10,00	fg
BT-16	2	10,75	g
TM-12	2	13,75	h
Cel-7	2	18,50	i
CB-13	2	18,50	i
FT-4	2	21,75	j

*GH: Grupos homogéneos

Se detalla la aplicación de la comparación múltiple para determinar las \bar{Y}_i que son significativamente diferentes de otras con un nivel del 95,0% de confianza, separándolas e identificándolas en 10 grupos homogéneos. Por tanto, no existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que comparten una misma columna de letras. Esto detalla que la bacteria FT-4 superó estadísticamente en promedio al resto de bacterias con 21,75 mm de diámetro en área de hidrólisis de celulasas, seguido de la CB-13 y Cel-7, ambas con 18,5 mm. A partir de aquí, se sub-seleccionaron los grupos homogéneos "h, i, j" (4 bacterias) para el ulterior nivel de selección.

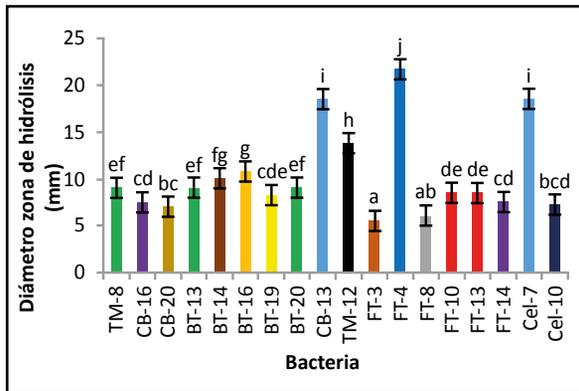


Figura 1. Distribución de los diámetros de la zona de hidrólisis por bacteria productora de celulasas

b. Selección cuantitativa

Se determinó la actividad de celulasas totales (FPasa) a los 4, 5 y 6 días de fermentación, partiendo de las 4 bacterias sub-seleccionadas anteriormente.

Tabla 2. Actividad de celulasas totales en el tiempo

Cepa	CB-13		FT-4		TM-12		CEL-7	
Días	FPU/mL	DS*	FPU/mL	DS	FPU/mL	DS	FPU/mL	DS
0	0,006	0,001	0,001	0,002	0,000	0,003	0,002	0,003
4	0,082	0,010	0,090	0,001	0,010	0,006	0,050	0,003
5	0,103	0,006	0,149	0,001	0,010	0,003	0,029	0,003
6	0,133	0,004	0,074	0,002	0,007	0,002	0,061	0,003

*DS: Desviación estándar

La cepa CB-13 y FT-4 presentaron mayor actividad enzimática; sin embargo, CB-13 mostró incremento de actividad hasta el sexto día, mientras que FT-4 tuvo máxima actividad solo hasta el quinto día.

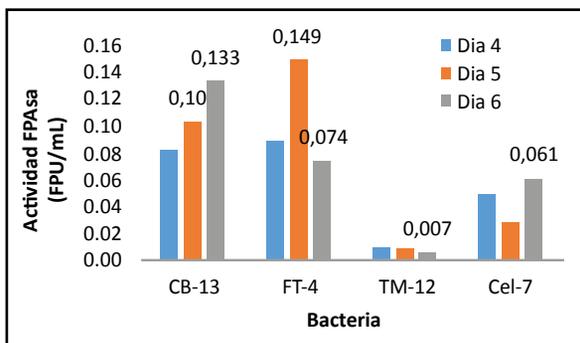


Figura 2. Actividad celulolítica de las bacterias evaluadas por día de fermentación

La figura 2 describe la actividad generada por las cuatro bacterias sub-seleccionadas en un medio de producción con papel periódico, donde la bacteria que mayor actividad generó fue la bacteria FT-4 con 0,149 FPU/mL al quinto día, seguida de la CB-13 con 0,103 FPU/mL y las de menor promedio fueron las bacterias TM-12 y Cel-7 con valores inferiores a 0,050 FPU/mL.

Se realizó un análisis de varianza para los promedios generales de actividad por bacteria evaluada, determinando la existencia de diferencias significativas. En consecuencia se recurrió a ejecutar una comparación múltiple, mediante la prueba de Duncan, para determinar las \bar{Y}_i que son significativamente diferentes de otras.

Tabla 3. Promedios de significancia de Duncan para los promedios generales de FPU.mL⁻¹

Bacteria	Casos	\bar{y}_i	GH
TM-12	3	0,009	a
Cel-7	3	0,046	a
FT-4	3	0,104	b
CB-13	3	0,106	b

*GH: Grupos homogéneos

Se identificaron 2 grupos homogéneos en donde, según la alineación de las letras en columna, no existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de letra; indicando que existe diferencia estadísticamente significativa, con un nivel del 95,0% de confianza, entre las medias de actividad FPAsa de los grupos bacterianos “a” y “b”.

La bacteria CB-13 con actividad de 0,082; 0,103 y 0,133 FPU.mL⁻¹ al tercer, cuarto y quinto día, respectivamente, se identificó y fue seleccionada para la optimización del medio de fermentación, requerido para la producción de la enzima, por describir la mayor media general de actividad con un valor de 0,106 FPU.mL⁻¹.

c. Identificación molecular

El resultado del secuenciamiento del gen ARNr 16S notifica sobre la identidad de la bacteria problema

respecto a la depositada en la base de datos de GenBank (búsqueda en BLAST), indicando el porcentaje de identidad y el porcentaje de cobertura con la secuencia que ha sido comparada.

El 99% del query, secuenciado de la bacteria CB-13, presenta matches con el hit de la cepa *Geobacillus thermoparaffinivorans* strain Ba3 depositada en la base de datos (identidad); es decir, un 99% de la secuencia del query fue alineado con dicho hit (cobertura), obteniéndose un valor de E-value menor a 0,02 que es indicador de haber ejecutado un alineamiento muy confiable.

Tabla 4. Similitud de secuencias para el gen ARNr 16S en BLASTN

Bacteria	BLASTN				
	Descripción	C %	E-value	I %	Acceso
CB-13	<i>Geobacillus thermoparaffinivorans</i> strain Ba3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99	0,0	99	KC252977.1
	<i>Geobacillus thermoparaffinivorans</i> strain Et2/4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97	0,0	99	KJ722455.1

d. Optimización del medio fermentativo

Para este propósito, se aplicó estratégicamente un diseño experimental de tamizaje, así evidenciar los componentes con mayor influencia sobre el medio fermentativo y otro de superficie respuesta para ubicar las cantidades necesarias de cada uno en mezcla fermentativa que genera la mayor actividad celulolítica; se hace mención al diseño factorial parcial de Blacket-Burman y de Box-Behnken, respectivamente.

Selección de componentes influyentes

Se examinaron diez variables de cultivo independientes, en donde el medio basal tuvo la siguiente composición: 11,7 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 3,7 g/L KH_2PO_4 ; 0,6 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,8 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,5 g/L extracto de levadura; 0,5 g/L peptona; 10,0 g/L papel periódico; pH 6,0. Y, al mismo tiempo, se incorporó inductores de producción de celulasas, tales como lactosa y sucrosa.

Tabla 5. Componentes del medio fermentativo y niveles de prueba para el experimento de Plackett-Burman

Código	Factor (g/100 mL)	Nivel bajo (-)	Nivel alto (+)
A	Papel periódico	0,30	0,50
B	Lactosa	0,25	0,50
C	Sucrosa	0,25	0,50
D	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,171	1,757
E	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,06	0,11
F	KH_2PO_4	0,57	1,00
G	CaCl_2	0,06	0,11
H	Extracto de levadura	0,05	0,50
I	Peptona	0,05	0,075
J	pH	6	7

Sus configuraciones y la matriz de diseño junto a la correspondiente respuesta (actividad celulolítica en $\text{FPU} \cdot \text{mL}^{-1}$) se muestra en la tabla 5 y 6, respectivamente.

Tabla 6. Diseño experimental aleatorizado de Plackett-Burman para evaluar los factores que influyen en la producción de celulasa

Ensayo	Variables independientes*										AE
	N°	A	B	C	D	E	F	G	H	I	
1	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	0,082
2	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	0,000
3	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	0,000
4	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	0,013
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,069

Ensayo	Variables independientes*										AE
	N°	A	B	C	D	E	F	G	H	I	
6	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	0,030
7	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	0,011
8	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	0,000
9	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	0,093
10	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	0,000
11	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	0,108
12	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	0,127

*Variables codificadas igual como se detalla en la tabla 13.

La variación de la respuesta en los diferentes ensayos del experimento osciló de 0 a 0,127 FPU.mL⁻¹. Esto refleja el efecto significativo de la composición del medio y otras condiciones ambientales en la producción de celulasa. El efecto principal de las variables examinadas en la producción de enzimas celulolíticas se calculó e ilustró gráficamente en la figura 3.

Tabla 7. Análisis estadístico del diseño Plackett-Burman

Variable	Efecto principal	Coefficientes	Valor t	Valor p
Constante		0,0444167	11,84	0,054
Papel periódico	-0,032833	-0,0164167	-4,38	0,143
Lactosa	-0,044833	-0,0224167	-5,98	0,106
Sucrosa	-0,011833	-0,0059167	-1,58	0,360
(NH ₄) ₂ SO ₄	-0,020500	-0,0102500	-2,73	0,223
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,051500	0,0257500	6,87	0,092
KH ₂ PO ₄	0,002500	0,0012500	0,33	0,795
CaCl ₂	-0,014833	-0,0074167	-1,98	0,298
Extracto de levadura	-0,022500	-0,0112500	-3,00	0,205
Peptona	0,020500	0,0102500	2,73	0,223
pH	0,031166	0,0155833	4,16	0,150

Los coeficientes de regresión, los valores de t, p y los porcentajes de nivel de confianza para las diez variables experimentales se muestran en la tabla 7.

El nivel de significación (p-valor) se determina usando la prueba t de Student. La prueba t, para cualquier efecto individual, permite una evaluación de la probabilidad de encontrar el efecto observado puramente por casualidad; de esta probabilidad que

es suficientemente pequeña, se acepta la idea de que el efecto fue causado por la variación del nivel de la variable bajo prueba.

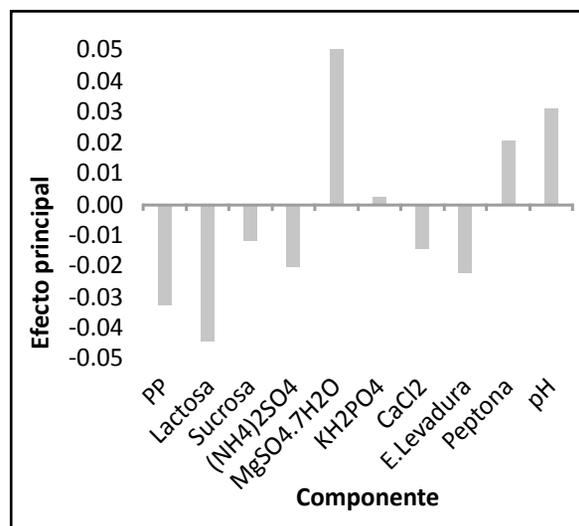


Figura 3. Efecto de las condiciones ambientales sobre la producción de celulasa

El signo de una estimación de factor indica, en promedio, cuál factor de ajuste da lugar a grados más altos de respuesta. Una estimación grande, sea positiva o negativa, cercana de cero, significa que un factor tiene poco o ningún efecto.

Sobre la base de estos resultados fue comprensible que la actividad celulolítica estuvo directamente relacionada con MgSO₄·7H₂O, peptona y pH; en consecuencia, fueron seleccionados para su optimización los dos primeros y, aunque fue el componente con menor influencia según el experimento, el KH₂PO₄; debido a que su incremento o descenso en masa influye directamente sobre el pH, generando el cambio detectado durante la fermentación.

Por otra parte, la lactosa y el papel periódico en exceso reprimieron parcialmente la actividad enzimática durante el bioproceso. Mientras que el extracto de levadura, CaCl₂, (NH₄)₂SO₄ y sucrosa, solo ligeramente. Por lo que se mantuvieron en su nivel bajo para el siguiente experimento.

Maximización y predicción de la respuesta

De acuerdo con el diseño de Box-Behnken, para determinar el nivel óptimo de cada una de las variables independientes más significativas y

obtener la máxima producción de enzima celulasa. Se examinó cada uno de los tres factores de las influencias más elevadas como se dilucidó a través del diseño experimental de Plackett-Burman, siendo $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (X_1), KH_2PO_4 (X_2) y peptona (X_3) en tres niveles diferentes codificados (tabla 8).

Tabla 8. Niveles de las variables elegidas para el experimento de optimización Box-Behnken

Variable (g/100mL)	Código	Nivel bajo (-1)	Nivel medio (0)	Nivel alto (+)
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	X_1	0,110	0,275	0,440
KH_2PO_4	X_2	0,900	1,350	1,800
Peptona	X_3	0,075	0,1125	0,150

Las 14 combinaciones examinadas diferentes se muestran en la tabla 9; en donde todos los ensayos se realizaron por triplicado y se utilizó el promedio de las observaciones.

Los resultados experimentales se introdujeron en forma de gráficos de superficie (figura 4), donde mostró que los niveles de 0,11 g/100mL; 0,90 g/100mL y 0,15 g/100mL de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, KH_2PO_4 y peptona, respectivamente, apoyan una actividad celulasa alta.

Tabla 9. Respuesta de la actividad celulolítica influenciada por X_1 , X_2 y X_3 en el experimento Box-Behnken

N°	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	KH_2PO_4	Peptona	FPU.mL ⁻¹
1	0,275	0,9	0,150	0,146
2	0,275	1,8	0,075	0,151
3	0,275	1,35	0,1125	0,141
4*	0,275	1,35	0,1125	0,146
5	0,44	0,9	0,1125	0,124
6	0,44	1,35	0,075	0,137
7	0,11	0,9	0,1125	0,138
8	0,275	1,35	0,1125	0,125
9	0,11	1,8	0,1125	0,098
10	0,11	1,35	0,075	0,135
11	0,44	1,8	0,1125	0,138
12	0,44	1,35	0,150	0,124
13	0,11	1,35	0,15	0,112
14	0,275	1,8	0,15	0,106

N°	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	KH_2PO_4	Peptona	FPU.mL ⁻¹
15	0,275	0,9	0,075	0,108

*Ensayo repetido

Fuente: Elaboración propia

Para predecir el punto óptimo, dentro de las restricciones experimentales, una función polinomial de segundo orden se ajustó a los resultados experimentales (algoritmo de optimización no lineal) de la actividad celulasa:

$$FPU = 0,562 - 0,351X_1 - 0,272X_2 - 0,75X_3 + 0,023X_1 * X_1 + 0,0262 X_2 * X_2 + 4,33X_3 * X_3 + 0,496X_1 * X_2 - 2,93X_1 * X_3 + 0,279X_2 * X_3.$$

A nivel de modelo, las medidas de correlación para la estimación de la ecuación de regresión son los coeficientes de correlación múltiple R y el coeficiente de determinación R². Cuanto más cercano sea el valor de R² a 1, mejor es la correlación entre los valores medidos y los predichos.

Tabla 10. Análisis de varianza para actividad celulasa

Fuente*	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
A	5.E-7	1	5.E-7	0,00	0,9777
B	0,001860	1	0,0018605	3,22	0,1329
C	0,000480	1	0,0004805	0,83	0,4039
AA	0,000001	1	0,0000018	0,00	0,9571
AB	0,005402	1	0,0054022	9,34	0,0282
AC	0,001332	1	0,0013322	2,30	0,1896
BB	0,000100	1	0,0001001	0,17	0,6946
BC	0,000090	1	0,0000902	0,16	0,7092
CC	0,000142	1	0,0001423	0,25	0,6409
Error total	0,002892	5	0,0005785		
Total (corr.)	0,012284	14			

R-cuadrada = 76,4525 por ciento
R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 34,0671 por ciento

*A: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; B: KH_2PO_4 ; C: Peptona

Fuente: Elaboración propia

En este experimento, el valor de R² fue de 0,7645 para la actividad de la celulasa, indicando que el modelo, así ajustado, explica 76,5% de la variabilidad de la actividad celulasa. Además, se observa que el valor 0,0006 como cuadrado medio del error, que

llega a constituir la varianza del error, es menor que la unidad, por lo que la variabilidad de los datos es adecuada para el trabajo realizado.

Tabla 11. Resumen de valores de salida del optimizador de respuesta con meta a maximizar actividad celulasa

Factor (mg/100mL)	Nivel bajo	Nivel alto	Nivel óptimo
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,11	0,44	0,11
KH ₂ PO ₄	0,9	1,8	0,90
Peptona	0,075	0,15	0,15

Fuente: Elaboración propia

Se calcularon los niveles óptimos de los tres componentes, obtenidos del punto máximo del modelo polinomial utilizando la función de optimizador de respuesta de las herramientas de Minitab 17,0 y se encontró que eran: MgSO₄·7H₂O 0,11 g/100mL; KH₂PO₄ 0,90 g/100mL y peptona 0,15 g/100mL, con una respuesta máxima prevista de 0,324 FPU.mL⁻¹.

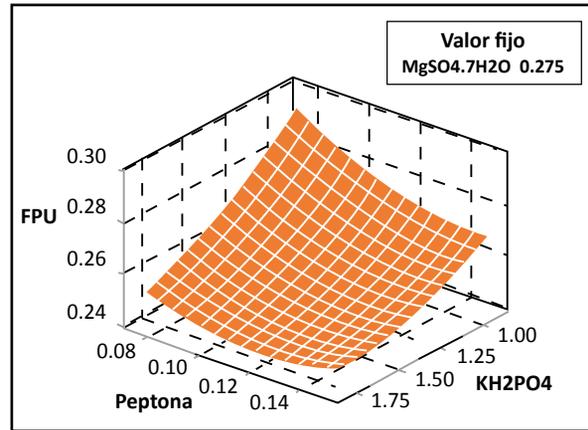
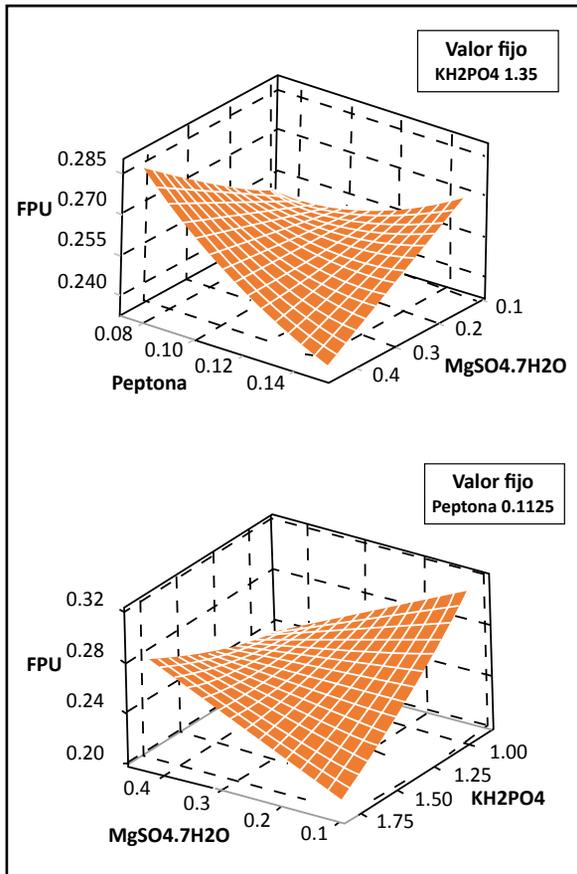


Figura 4. Gráficos tridimensionales que muestran la superficie respuesta afectada por las variables de cultivo durante la producción de enzimas celulolíticas

La fórmula del medio optimizado, para 100 mL, es la siguiente: 0,30 g papel periódico; 0,25 g lactosa; 0,25 g sucrosa; 1,17 g (NH₄)₂SO₄; 0,06 g CaCl₂; 0,2 g extracto de levadura; 0,11 g MgSO₄·7H₂O; 0,90 g KH₂PO₄; 0,15 g peptona; pH 6,5; temperatura de cultivo 60 °C y tiempo de incubación 72 horas.

La actividad enzimática medida en un experimento de verificación, utilizando este medio, fue de 0,292 FPU.mL⁻¹.

e. Contraste de la recuperación de celulasas totales

El extracto crudo enzimático recuperado del ensayo fermentativo, se constituyó en un solo volumen, al cual se le hizo determinaciones de proteína, actividad específica y rendimiento, en función del peso seco de sustrato. Y se compararon los resultados obtenidos antes y después del experimento de optimización.

Tabla 12. Comparación de resultados mediante indicadores de producción

Indicador	Fuente de enzima		Relación (veces)
	Extracto crudo Antes	Después	
Rendimiento (U/gss*)	10,61	97,44	9,18
Actividad específica (U/mg)	2,81	1,56	0,55
Proteína total (mg/mL)	0,04	0,20	5,00

*Gramos de sustrato seco

f. Separación y purificación de la β -glucosidasa

El extracto crudo enzimático se constituyó en un volumen total de 120 mL, al cual se le sometió a los pasos de recuperación y concentración proteica detallados en los métodos anteriores. Decurso a esto, se intentó separar y purificar la enzima β -glucosidasa mediante cromatografía de intercambio aniónico, generando fracciones de composición proteica distintas.

Cromatografía de intercambio iónico (IEX)

En la cromatografía, las fracciones eluidas con actividad glucosidasa se hallaron principalmente a lo largo del tercer al sexto segmento del gradiente, es decir, eluyeron entre 250 mM y 550 mM de eluyente (amortiguador con sal). Los eluatos con actividad positiva con valores de DO_{595} mayores a 0,2 fueron juntados y concentrados para su almacenamiento y futura caracterización. Asimismo, se elaboró el cromatograma correspondiente que se detalla en la figura 5.

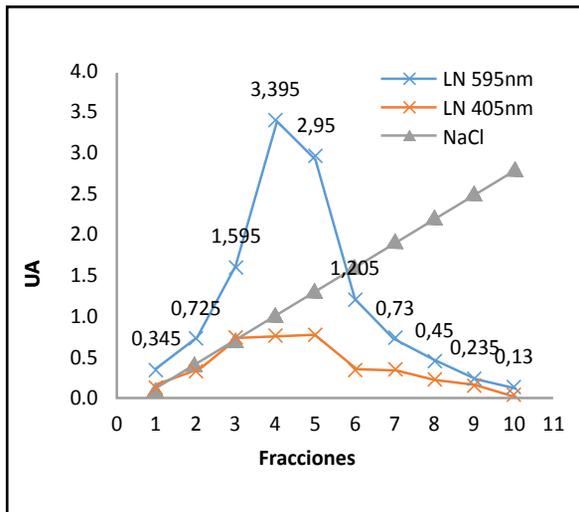


Figura 5. Cromatograma de intercambio aniónico

Se observa el perfil de absorbancia a 595 nm y 405 nm para la detección de las proteínas y la actividad β -glucosidasa, respectivamente. Así mismo se evidencia la separación de la enzima en las fracciones 3, 4 y 5 debido a que el pico de proteína y actividad en el cromatograma se corresponden.

Análisis electroforético de proteínas (SDS-PAGE)

Para el seguimiento y análisis de pureza de la muestra final, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% (p/v), el cual se ilustra en la figura 6.

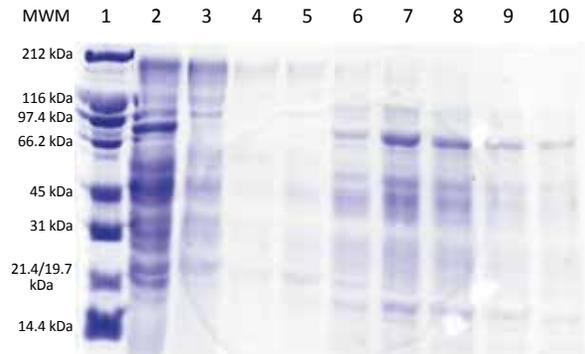


Figura 6. Análisis electroforético de la purificación por IEX de la enzima glucosidasa. Carril 1: Marcador de masa molecular. Carril 2: Diafiltrado. Carril 3: Excluido. Carril 4: Remanente. Carril 5 al 10: Fracciones (100 – 1 000 mM NaCl)

Una banda única, bastante pronunciada, entre los 97,4 kDa y 66,2 kDa, aislada respecto de otras más tenues (carriles 3 y 4), en donde se encontró actividad β -glucosidasa, lo que indica que, dentro de la composición proteica de la fracción en cuestión, existen todavía otras proteínas que no son enzimas.

Sin embargo, el carril 3 correspondiente al excluido muestra una buena cantidad de proteínas que no establecieron una unión lo suficientemente fuerte como para ser retenidas por el grupo DEAE.

g. Caracterización funcional de celulasas totales

Con el fin de caracterizar la enzima recuperada y ver su comportamiento frente a la temperatura y el pH, se realizaron ensayos de actividad catalítica y estabilidad térmica para que con ello se permita dilucidar mejor el enfoque de su uso para su futura aplicación.

Efecto del cambio de temperatura sobre la actividad de la enzima

Se determinó el efecto del cambio de temperatura sobre la actividad enzimática expresado en FPU,

realizando ensayos de reacción en un gradiente de temperatura desde los 60 a 90 °C.

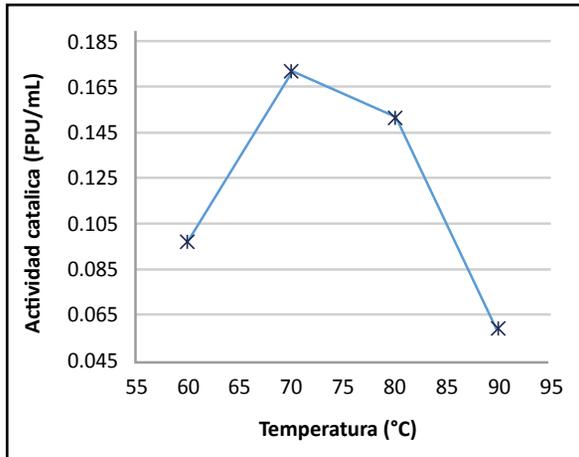


Figura 7. Curva de temperatura para la actividad de celulasas totales

Efecto del cambio de pH sobre la actividad de la enzima

Se determinó el efecto del cambio de pH sobre la actividad enzimática expresado en FPU.mL⁻¹ realizando ensayos de reacción en un gradiente de pH desde valores de 4 a 10.

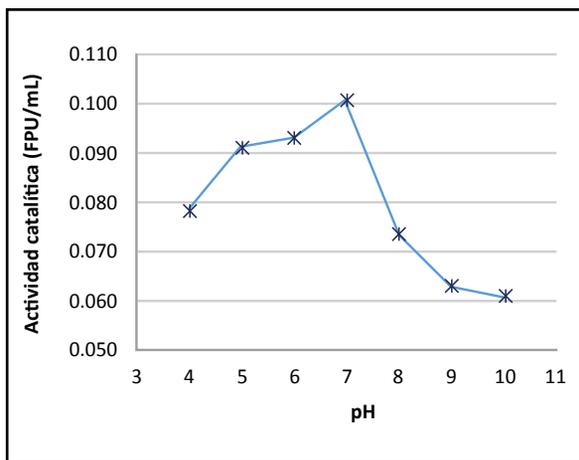


Figura 8. Curva de pH para la actividad de celulasas totales

Estabilidad térmica

La termostabilidad de la enzima frente a 60, 70, 80 y 90 °C evidencia la existencia de actividad residual en todos los tiempos de cada exposición. Además,

los descensos súbitos solo se observan para los tratamientos a 80 y 90 °C después de los 120 minutos; para los demás casos, la actividad residual supera el 45% de la enzima a tiempo cero.

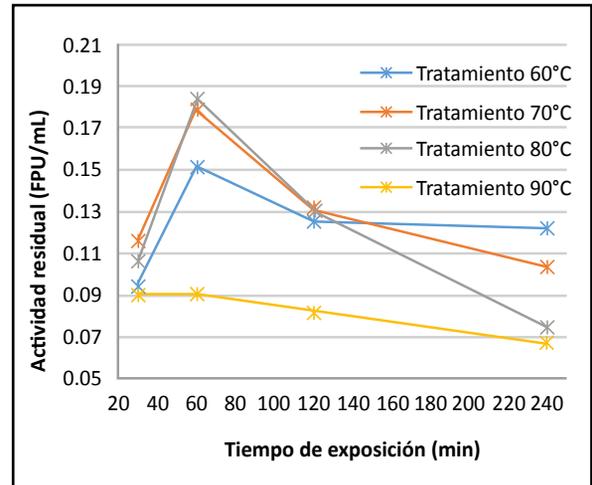


Figura 9. Curvas de actividad residual frente a tiempos de exposición

La estabilidad de la enzima frente a distintas temperaturas por tiempos de hasta 240 minutos, resalta el incremento de la actividad a los 60 minutos de exposición para todos los casos y el descenso súbito muestra evidencia para los tratamientos de 80 y 90 °C; para este último, la actividad residual resultó con valores más bajos en comparación a los otros tratamientos y con poca variación durante los tiempos de exposición.

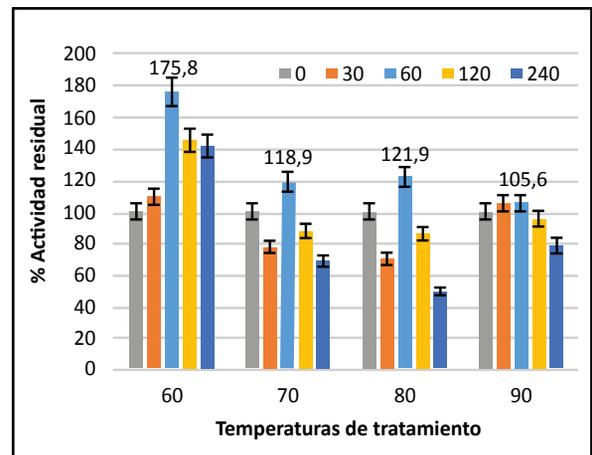


Figura 10. Diagrama de barras en porcentaje de actividad residual frente a las temperaturas de tratamiento

En la figura 9 y 10, se observa el comportamiento que sigue la actividad residual frente al avance del tiempo de exposición y a las temperaturas de tratamiento, respectivamente. Hay un aumento de actividad y una buena estabilidad para 60 °C, por lo que se encuentran concentrados allí los mayores valores en % de actividad residual; en los demás casos, hay un descenso de actividad residual progresivo por el tiempo de exposición y el incremento de temperatura.

DISCUSIÓN

a. Identificación molecular

La bacteria CB-13 presenta un 99% de identidad con la cepa *Geobacillus thermoparaffinivorans* strain Ba3, la cual es termófila y productora de celulasas, tiene correlación con el reporte de Chao *et al.*⁽¹⁹⁾, quienes identificaron y mostraron que bacterias termófilas del género *Geobacillus* aisladas originalmente de un géiser son capaces de producir celulasas termoestables; encontradas junto a *Desulfotomaculum*, *Bacillus*, *Exiguobacterium*, *Paenibacillus* y *Enterobacter*, a las cuales denominó Consorcio XM70 para su estudio.

b. Componentes influyentes

Se observó que el papel periódico en exceso influyó negativamente sobre la actividad celulasa; una causa probable de esto, además de los productos de degradación acidificantes, es que el material lignocelulósico presente en el papel periódico tiene inhibidores de celulasas, tales como sustancias con grupos SH-, metales como el hierro, mercurio, níquel y cobre⁽²⁰⁾; procedentes del procesamiento para la impresión del mismo.

En los ensayos fermentativos anteriores a la optimización, se observó la caída en el valor de pH del medio y detención del crecimiento al mismo tiempo; esto corresponde con Marquina⁽²¹⁾, quien concluyó que un descenso en los valores de pH del medio produce un descenso en el rendimiento y, consecuentemente, en la tasa específica de crecimiento. Y, en consecuencia, explica por qué fue detectado al pH como factor influyente en el experimento de Plackett-Burman.

c. Producción de celulasas

Los valores del rendimiento de producción en celulasas bacterianas del género *Bacillus*. Los reportados son en algunos casos similares y hasta superados, tales como FPAsa 2,8 UI/gds y B-glucosidasa 4,5 UI/gds; obtenido de *Bacillus subtilis* por FSS de residuos de banana⁽²²⁾. Además, de actividad FPAsa de 1,08 UI/mg obtenido de *Bacillus subtilis* por fermentación, en biorreactor cilíndrico, de residuos de la industria de soya⁽²³⁾. Y por dos cepas de *Bacillus licheniformis* termotolerantes con 0,02 FPU/mg y 0,10 FPU/mg, respectivamente⁽²⁴⁾.

Chao *et al.*⁽¹⁹⁾ obtuvo actividades máximas sobre celulosa de papel de filtro y β -glucosidasa del consorcio XM70 después de incubación a 80 °C y pH 7,0 (2 días) y 70 °C y pH 8,0 (4 días), respectivamente.

d. Inducción por fuentes de carbono y nitrógeno

El mejoramiento del medio fermentativo se explica en gran parte, por el fundamento de inducción de Sachslehner *et al.*⁽²⁵⁾, quien señala que la formación simultánea de las glicanasas podría ser provocado por varios polisacáridos estructuralmente semejantes a los constituyentes de carbohidratos del material lignocelulósico, tras haber obtenido buenos resultados en la inducción de mananasas, xylanases y glucanasas. Esto se refuerza con los resultados de Shankar y Isaiarasu⁽²⁶⁾, quienes detallan el efecto de las fuentes de carbono sobre la producción de celulasa por *Bacillus pumilus* EWBCM1; en donde tras 72 horas de período de incubación a 37 °C, se registró la máxima producción de celulasa en medio suplementado con galactosa ($0,5851 \pm 0,006$ UI/mL), en cambio la producción mínima de celulasa se registró en medio no suplementado, es decir, solo celulosa ($0,0419 \pm 0,004$ UI/mL).

Además, para Asha *et al.*⁽²⁷⁾ la presencia de 0,5% de extracto de levadura indujo en un mismo ensayo fermentativo la máxima producción de celulasa y biomasa por la bacteria termófila *Paenibacillus barcinonensis*. Asimismo, es importante señalar que para Shahzadi *et al.*⁽²⁸⁾ la producción patrón de enzimas cambia por la interacción entre fuentes de carbono y nitrógeno; es así que, en su estudio, la combinación de glucosa y sulfato de amonio resultó ser la mejor para

una producción máxima de exoglucanasa ($399 \pm 4,1$ U) y β -glucosidasa ($230 \pm 3,6$ U).

e. Caracterización funcional

La mayor actividad enzimática de celulasas según Nataraja *et al.*⁽²⁹⁾, depende, entre otros factores, del pH y temperatura óptima, lo que se comprobó para la enzima inmersa en el extracto crudo, reportando un pH y temperatura óptima de 7 y 70 °C, respectivamente. Encontrándose la existencia de un efecto real sobre dichos factores. De aquí, también resalta que existe relación con el pH y la temperatura óptima de actividad FPasa de enzimas provenientes de bacterias del orden Firmicutes y algunos de la Familia Bacillaceae, reportadas por Chao *et al.*⁽¹⁹⁾, en donde la actividad máxima de celulasa del Consorcio XM70 (*Geobacillus*, *Desulfotomaculum*, *Bacillus*, *Exiguobacterium*, *Paenibacillus* y *Enterobacter*) purificada fue de 3,77 U/mg a pH 7,0 y 70 °C.

Además, su actividad se mantuvo alrededor del 70% de su valor máximo después de una incubación a 80 °C durante 60 min. Concluyendo que la celulasa purificada tiene cualidades para ser útil en aplicaciones industriales, debido a su alta estabilidad a la temperatura.

CONCLUSIONES

Se obtuvo 4 bacterias CB13, Cel-7, FT-4 y TM-12 selectas en base al carácter cualitativo de la actividad celulasa sobre medio sólido con sustrato papel periódico; las cuales conformaron los tres grupos homogéneos de mayor diámetro de la zona de hidrólisis de entre un conjunto total de 18 bacterias.

Se seleccionó la bacteria CB-13 en base al carácter cuantitativo de la actividad celulasa del extracto

crudo enzimático recuperado de una fermentación sumergida con sustrato papel periódico, con un valor de 0,106 FPU.mL⁻¹ como promedio general. Asimismo su identificación molecular con una similitud del 99% con *Geobacillus thermoparaffinivorans* strain Ba3.

Se optimizó el medio fermentativo para la mayor producción de celulasas describiendo una nueva fórmula (para 100 mL): 0,30 g papel periódico; 0,25 g lactosa; 0,25 g sucrosa; 1,17 g (NH₄)₂SO₄; 0,06 CaCl₂; 0,2 extracto de levadura; 0,11 MgSO₄·7H₂O; 0,90 KH₂PO₄; 0,15 peptona; pH 6,5; temperatura de cultivo 60 °C y tiempo de incubación 72 horas. Con una actividad de 0,292 FPU.mL⁻¹, verificada experimentalmente utilizando este medio. Y un rendimiento de 97,44 U.gss⁻¹ que es 9,18 veces, respecto del rendimiento sin optimizar.

El peso molecular aproximado de la β -glucosidasa constituyente de las celulasas totales, en estudio tiene un valor aproximado de 92,6 kDa, según el análisis electroforético de la purificación.

La celulasa extracelular, secretada por el microorganismo *Geobacillus thermoparaffinivorans*, es estable por 4 horas a temperatura de 70 °C y 2 horas a 80 °C. La actividad máxima se alcanza a pH 7,0 y su temperatura óptima de reacción es de 70 °C.

Agradecimientos

Mi reconocimiento y agradecimiento al equipo de investigación del Laboratorio de Bioquímica de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, por las cepas cedidas.

Conflictos de interés:

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Lynd, L., Weimer, P., Zyl, W. y Pretorius, I. *Microbial cellulose utilization: Fundamentals and Biotechnology*. USA. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2002; 66(3) pp. 506- 577.
- Zhang, Y.; Himmel, M. y Mielenz, J. *Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies*. Biotechnology Advances, 2006; 24 pp. 452- 481.
- Castro, A. M y Pereira, N. Jr. *Produção, propriedades e aplicações de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais*. Química Nova, 2010; v. 33, n. 33, p. 181-188.
- Jahangeer, S., Khan, N., Jahangeer, S., Sohail, M., Shahzad, S., Ahmad, A. and Khan, SA. *Screening and characterization of fungal cellulases isolated from the native environmental source*. Pak. J. Bot, 2005; 37(3): 739-748.
- Khan, J. A., y Singh, S. K. *Production of cellulase using cheap substrates by solid state fermentation*. International

- Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences, 2011; 1(3), 179–187.
6. Zeikus, G.; Benbassat, A.; Ng, T. y Lamed, R. *Thermophilic ethanol fermentations*. Editor Hollander, A. et al. Trends in the biology of fermentations for fuels and chemicals. Plenum Publishing Corp. New York, USA. 1981. pp. 441-461.
 7. Box, G. y Behnken, D. *Some new three-level designs for the study of quantitative variables*. Technometrics. 1960; 2, 455–475.
 8. Liu C., Liu Y., Liao W., Wen Z., Chen S. *Application of statistically based experimental designs for the optimization of nisin production from whey*. Biotechnol. Lett. 2003; 25, 877–882.
 9. Abdel-Fattah Y.R., El-Enshasy H.A., Soliman N.A., El-Gendi H. *Bioprocess development for production of alkaline protease by bacillus pseudofirmus Mn6 through statistical experimental designs*. J. Microbiol. Biotechnol. 2008; 19 (4) 378–386.
 10. Binti, N. F. *Enzyme hydrolysis of old newspaper to produce simple sugar for fermentation process*. Faculty of Chemical & Natural Resources Engineering, University Malaysia Pahang. UMP Institutional Repository, 2013. 24pp.
 11. Mandels, M. y Reese, E. *Induction of cellulase in Trichoderma viride as influenced by carbon sources and metals*. Journal of Bacteriology, 1957; 73(2) pp. 269–278.
 12. Meza, V., Moreno, P., Tengerdy, R. y Gutiérrez, M. *Transfer of a benomyl resistance marker by heat-inactivated Trichoderma reesei protoplasts*. Biotechnology Letters, 1995; 17(8) pp. 827–832.
 13. Teather, R. y Wood, P. *Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen*. Applied and Environmental Microbiology, 1982; 43(4) pp.777-780.
 14. Miller, L. *Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar*. Analytical Chemistry, 1959; 31 pp. 426-428.
 15. Ghose, T. *Measurement of cellulase activities*. Pure and Applied Chemistry, 1987; 59 (2) pp. 257-268.
 16. Parry, N. J., Beever, D. E., Owen, E., Vandenberghe, L., Van Beeumen, J., y Bhat, M. K. *Biochemical characterization and mechanism of action of a thermostable beta-glucosidase purified from Thermoascus aurantiacus*. Biochemical Journal, 2001; 353(Pt 1), 117-127.
 17. Kaur, J., Chadha, B. S., Kumar, B. A., Ghatore, S. K., y Saini, H. S. *Purification and characterization of β -glucosidase from Melanocarpus sp. MTCC 3922*. Electronic Journal of Biotechnology, 2007; 10(2), 0-0. <https://doi.org/10.2225/vol10-issue2-fulltext-4>.
 18. Plackett, R.L. y Burman, J.P. *The design of optimum multifactorial experiments*. Biometrika 1946; 33, 305–325.
 19. Chao, Z., Yunjin, D., Bin, L., Xiong, L., & Yifan, H. *Purification and characterization of thermostable cellulase from consortium XM70 in terrestrial hot spring with sugarcane bagasse*. 2015. Recuperado a partir de <http://or.nsf.gov.cn/handle/00001903-5/249088>
 20. Guerfali, M., Saidi, A., Gargouri, A., y Belghith, H. *Enhanced Enzymatic Hydrolysis of Waste Paper for Ethanol Production Using Separate Saccharification and Fermentation*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2015; 175(1), 25-42. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1243-1>
 21. Marquina, D. *Producción de biomasa de hongos para la degradación de residuos celulósicos*. Tesis Doctoral, Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid. 1991. pp. 0-279.
 22. Heck, J. X., Hertz, P. F., y Ayub, M. A. Z. *Cellulase and xylanase productions by isolated Amazon Bacillus strains using soybean industrial residue based solid-state cultivation*. Brazilian Journal of Microbiology, 2002; 33(3), 213-218. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822002000300005>
 23. Krishna, C. *Production of bacterial cellulases by solid state bioprocessing of banana wastes*. Bioresource Technology, 1999; 69(3), 231-239. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(98\)00193-X](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(98)00193-X)
 24. Fujimoto, N., Kosaka, T., Nakao, T., y Yamada, M. *Bacillus licheniformis bearing a high cellulose-degrading activity, which was isolated as a heat-resistant and micro-aerophilic microorganism from bovine rumen*. Open Biotechnology Journal, 2011; 5, 7–13.
 25. Sachslehner, A., Nidetzky, B., Kulbe, K. D., y Haltrich, D. (1998). *Induction of mannanase, xylanase, and endoglucanase activities in sclerotium rolfsii*. Applied and Environmental Microbiology, 64(2), 594–600.
 26. Shankar, T., & Isaiarasu, L. *Cellulase production by Bacillus pumilus EWBCM1 under varying cultural conditions*. Middle-East Journal of Scientific Research, 2011; 8(1), 40–45.
 27. Asha, B. M., Revathi, M., Yadav, A., y Sakthivel, N. *Purification and characterization of a thermophilic cellulase from a novel cellulolytic strain, Paenibacillus barcinonensis*. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2012; 22(11), 1501-1509.
 28. Shahzadi, T., Anwar, Z., Iqbal, Z., Anjum, A., Aqil, T., Bakh, T., ... Irshad, M. *Induced production of exoglucanase, and β -Glucosidase from Fungal Co-Culture of T. viride and G. lucidum*. Advances in Bioscience and Biotechnology, 2014;05(05),426. <https://doi.org/10.4236/abb.2014.55051>
 29. Nataraja, S.; Chetan, D. y Krishnappa, M. *Effect of temperature on cellulose enzyme activity in crude extracts isolated from solid wastes microbes*. International Journal of Microbiology Research, 2010; 2 (2) pp. 44-47.

Correspondencia: Héber Esaú Ramírez Arua

Dirección: Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Av. Miraflores s/n. Facultad de Ciencias - Laboratorio de Bioquímica, Tacna 23000 - Perú
Correo electrónico: haearsam_dv@hotmail.com / hbr.ramirez.ar@gmail.com