



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE CIENCIAS
DE LA VIDA Y DE LA NATURALEZA (ILACVN)**

BIOTECNOLOGIA

**ACTIVIDAD CELULOLÍTICA DE HONGOS FILAMENTOSOS AISLADOS DEL
PARQUE NACIONAL DE FOZ DE IGUAÇU – BRASIL EN SUSTRATOS
AGRÍCOLAS MEDIANTE LA PLANIFICACIÓN EXPERIMENTAL**

ANABEL ALEXANDRA RODRÍGUEZ ANDACHI

Foz de Iguaçu
2019



**INSTITUTO LATINOAMERICANO DE CIENCIAS
DE LA VIDA Y LA NATURALEZA (ILACVN)**

BIOTECNOLOGIA

**ACTIVIDAD CELULOLÍTICA DE HONGOS FILAMENTOSOS AISLADOS DEL
PARQUE NACIONAL DE FOZ DE IGUAÇU – BRASIL EN SUSTRATOS
AGRÍCOLAS MEDIANTE LA PLANIFICACIÓN EXPERIMENTAL**

ANABEL ALEXANDRA RODRÍGUEZ ANDACHI

Trabajo de Conclusión de Curso II presentado al Instituto Latinoamericano de Ciencias de la Vida y de la Naturaleza de la Universidad Federal de la Integración Latinoamericana, como requisito parcial a la obtención del título de grado en Biotecnología.

Orientadora: Profa. Dra. Rafaella Costa Bonugli Santos
Co-orientador: Prof. Dr. Michel Passarini

Foz de Iguaçu
2019

ANABEL ALEXANDRA RODRÍGUEZ ANDACHI

**ACTIVIDAD CELULOLÍTICA DE HONGOS FILAMENTOSOS AISLADOS DEL
PARQUE NACIONAL DE FOZ DE IGUAÇU – BRASIL EN SUSTRATOS
AGRÍCOLAS MEDIANTE LA PLANIFICACIÓN EXPERIMENTAL**

Trabajo de Conclusión de Curso II presentado al Instituto Latinoamericano de Ciencias de la Vida y de la Naturaleza de la Universidad Federal de la Integración Latinoamericana, como requisito parcial a la obtención del título de grado en Biotecnología.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Profa. Rafaella Costa Bonugli Santos
UNILA

Co-orientador: Prof. Dr. Michel Passarini
UNILA

Grte. Dra. Edimara Francisco
INNOVA

Prof. Dr. Wagner Antonio Chiba de Castro
UNILA

Foz de Iguaçu, 16 de dezembro de 2019.

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, agradezco a mi profesora orientadora, Rafaella, por el compartir en estos últimos años. Gran parte de mi formación fue adquirida de usted, le estoy muy agradecida por compartir su conocimiento en el área de microbiología y paciencia para enseñar. Siendo un gran ejemplo como investigadora y profesora.

Agradezco a mi profesor co-orientador, Michel, por los conocimientos brindados durante la carrera y desenvolvimiento de tesis.

Agradezco a la Profesora Sanely, por la ayuda, el sustento y buenos consejos de la vida académica.

Agradezco a la Gerente Dra. Edimara Francisco y al profesor Dr. Wagner Antonio Chiva de Costa por haber aceptado ser parte de la banca examinadora.

Agradezco a mi familia Rosa, Milton, Paola, Evelin, Maykel y Daniel por ser mi base fuerte. A pesar de la distancia el apoyo moral en cada momento de mi vida Universitaria fue muy manifiesta para poder alcanzar uno de mis sueños.

Agradezco a mi amigo Eric, por los buenos consejos, ser parte de momentos importantes durante estos cinco años y por el apoyo.

Agradezco a Ema, por el compañerismo y ayuda brindada.

Agradezco, a mis amigos del curso, BTC 2015, sobre todo a Hellen, Eliziane, Nathalia, Patricia y Eliane. Un inmenso gracias a todos por las buenas experiencias compartidas, por el apoyo en la vida universitaria y personal.

Agradezco al equipo de DELABEN por brindarme su ayuda.

Agradezco a Nuri y Rodrigo por su amistad y por haber hecho más amena la estadía desde mi llegada en Brasil, gracias por los buenos momentos.

Agradezco a Francisco, por el apoyo en estos últimos meses.

*“La posibilidad de realizar un sueño,
es lo que hace que la vida sea interesante”*

Paulo Coelho

RODRÍGUEZ ANDACHI, Anabel Alexandra. **Actividad celulolítica de hongos filamentosos aislados del Parque Nacional de Foz de Iguacu – Brasil en sustratos agrícolas mediante la planificación experimental.** 2019. 54 Trabajo de Conclusión de Carrera (Biotecnología) – Universidad Federal de la integración Latinoamericana, Foz de Iguacu, 2019.

RESUMEN

Las celulasas son un conjunto de enzimas hidrolíticas que descomponen la celulosa, mediante la actividad sinérgica de tres diferentes componentes, las endoglucanasa, exoglucanasa y la β -glucosidasa. A lo largo de los años estudios de celulasas han demostrado ser potencial biotecnológico en diferentes áreas, aplicada principalmente por ser biodegradables e inofensivas con el medio ambiente. Su producción es bastante estudiada en residuos agrícolas o agroindustriales. La creciente industrialización de estas áreas, ha llevado a la producción de altas cantidades de residuos que no son tratados adecuadamente. Siendo importante el aislamiento de microorganismos con potenciales celulolíticos. Esa posibilidad es brindada por la exploración del Parque Nacional Foz de Iguacu que, por su biodiversidad vegetal, materia orgánica y minerales en el suelo, pudieron haber seleccionado microorganismos con potencial, diferentes a los ya descritos. Así, este trabajo tiene como objetivo evaluar el potencial de degradación de celulosa por hongos del PNI en sustratos agrícolas mediante planificación experimental. Y estudio previo de 30 hongos presentaron degradación de celulosa, determinado por la actividad, cuando cultivados en CMC sólido. Siendo así, fueron cultivados en CMC líquido y analizado bajo el protocolo Kit CellG5 cellulase assay Megazyme. El hongo *Fusarium* sp. CCLM CX presentó la mayor actividad enzimática (1,729 U CellG5/mL), el cual fue seleccionado para la evaluación frente a los sustratos naturales (salvado de trigo, salvado de avena, mazorca de maíz y aserrín). Para este estudio fue ejecutado una planificación experimental tipo fraccional 2^{5-1} . En sustratos naturales, la actividad enzimática del hongo CX fue menor que en CMC, ya que CMC está lista para el consumo metabólico, mientras que los sustratos tienen una composición compleja para el acceso al carbono. Por otro lado, los sustratos que tuvieron efecto significativo en el análisis estadístico fueron, el salvado de trigo y mazorca de maíz. Por lo tanto, se deben realizar nuevos experimentos, con el hongo CX, conociendo el sustrato principal para la optimización enzimática. Las propiedades químicas de estos sustratos pueden ser aplicados principalmente como fuentes de producción de celulasas y aplicación en dieta animal o como biofertilizante, en regiones como Paraná.

Palabras claves: celulasas, hongos productores de celulasas, degradación de celulosa, PNI.

RODRÍGUEZ ANDACHI, Anabel Alexandra. **Actividad celulolítica de hongos filamentosos aislados del Parque Nacional de Foz de Iguazu – Brasil en sustratos agrícolas mediante la planificación experimental.** 2019. 54 Trabajo de Conclusión de Carrera (Biotecnología) – Universidad Federal de la integración Latinoamericana, Foz de Iguazu, 2019.

ABSTRACT

Cellulases are a set of hydrolytic enzymes that break down cellulose, through the synergistic activity of three different components, endoglycanase, exoglycanase and β -glucosidase. Over the year's studies of cellulases have proven to be biotechnological potential in different areas, mainly applied because they are biodegradable and harmless to the environment. Its production is quite studied in agricultural or agro-industrial waste. The increasing industrialization of these areas has led to the production of high amounts of waste that are not treated properly. The isolation of microorganisms with cellulolytic potentials is important. This possibility is provided by the exploration of the Foz de Iguazu National Park which, due to its plant biodiversity, organic matter and minerals in the soil, may have selected microorganisms with potential, different from those already described. Thus, this work aims to evaluate the potential for cellulose degradation by fungi of the PNI in agricultural substrates through experimental planning. And a previous study of 30 fungi showed cellulose degradation, determined by activity, when grown in solid CMC. Thus, they were cultured in liquid CMC and analyzed under the Kit CellG5 cellulase assay Megazyme protocol. The fungus *Fusarium* sp. CCLM CX had the highest enzymatic activity (1,729 U CellG5 / mL), which was selected for evaluation against natural substrates (wheat bran, oat bran, corn cob and sawdust). For this study, a fractional 2^{5-1} experimental planning was executed. In natural substrates, the enzymatic activity of the CX fungus was lower than in CMC, since CMC is ready for metabolic consumption, while the substrates have a complex composition for access to carbon. On the other hand, the substrates that had a significant effect on the statistical analysis were wheat bran and corn cob. Therefore, new experiments must be carried out, with the CX fungus, knowing the main substrate for enzymatic optimization. The chemical properties of these substrates can be applied mainly as sources of cellulase production and application in animal diet or as biofertilizer, in regions such as Paraná.

Key words: cellulases, cellulase-producing fungi, cellulose degradation, PNI.

ÍNDICE

1 INTRODUCCIÓN.....	10
2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1 CELULASAS.....	15
2.2 EXPLORACIÓN DE CELULASAS EN LA BIOTECNOLOGÍA.....	17
2.3 CONVERSIÓN DE CELULOSA Y TRATAMIENTO DE BIOMASA.....	22
2.4 MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE CELULASAS.....	26
2.5 DIVERSIDAD FÚNGICA DEL PARQUE NACIONAL DE FOZ DO IGUAÇU.....	27
2.6 PLANIFICACIÓN EXPERIMENTAL Y OPTIMIZACIÓN DE PROCESOS.....	28
3 OBJETIVO.....	29
3.1 GENERAL:.....	29
3.2 ESPECÍFICOS:.....	29
4 METODOLOGÍA.....	30
4.1 SELECCIÓN DE LOS AISLADOS.....	30
4.2 CULTIVO EN MEDIO LÍQUIDO PARA EVALUACIÓN CUANTITATIVA.....	31
4.3 ACTIVIDAD CMC _{case}	32
4.4 DELINEAMIENTO EXPERIMENTAL.....	34
4.4.1 Obtención del sobrenadante y actividad enzimática.....	34
5 RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	41
6 CONCLUSIÓN.....	42
REFERENCIAS.....	53

ÍNDICE DE SIGLAS

CBH: Módulo de unión a la celulosa

CBM: Celobiohidrolasa

CMC: Carboximetilcelulosa

MA₂: Medio de cultivo de Malta y Agar al 2%

NC-IUBMB: Comité de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular

PNI: Parque Nacional de Foz do Iguaçu

rpm: rotaciones por minuto

SSF: Fermentación sólida

SmF: Fermentación sumergida

U: unidad de actividad enzimática

1 INTRODUCCIÓN

Las celulasas es un grupo amplio de enzimas hidrolíticas (utilizan agua para romper ligaciones químicas) que degradan la celulosa (MOJSOV, 2016). La celulosa son polímeros lineales de glucosas, monómeros de glucosa unidos por enlaces β -1,4- glucosídicos, encontrado en la pared celular de plantas verdes, algas y ascomicetos (GUPTA et al., 2019; WINGER et al 2009). Para la degradación completa de la celulosa es necesario la participación sinérgica de tres diferentes componentes, las endoglucanasa, exoglucanasa y la β -glucosidasa, que se distinguen de acuerdo al local de acción en la celulosa (MOJSOV, 2016; OGEDA & DENISE, 2010).

A lo largo de los años las enzimas celulasas han sido muy estudiadas, siendo destacadas en investigaciones para producción y caracterizaciones. Sus estudios han demostrado su potencial biotecnológico en diversas industrias como, textiles, de papel, lavandería, procesamiento de alimentos, alimentación animal, elaboración de cerveza y vino, agricultura y producción de biocombustibles (AHMED & BIBI, 2018; MOJSOV, 2016; NUNES, 2018). Las enzimas celulasas son de fácil aplicación y son biodegradables, siendo inofensivo para el medio ambiente (ARJA, 2007; SIMIC; SOLJACIC; PUSIC., 2015). Los hongos que producen celulasas para venta comercial son mayoritariamente del género *Trichoderma* y *Aspergillus* (NOVOZYME, 2018).

La producción de enzimas celulasas es caro. Con el propósito de aprovechar material celulósico para una producción más económica de enzimas celulasas, microorganismos celulolíticos son cultivados en residuos agrícolas o agroindustriales (SADH et al., 2019; SINGHANIA et al., 2017). La creciente industrialización del sector agrícola, ha llevado a la formación alta de residuos que representa un desafío ambiental manifiesto, la mayoría de los residuos no son tratados adecuadamente, llevando al crecimiento de microorganismos patogénicos y la generación de gases efecto estufa (SADH et al., 2019; RAVINDRAN et al., 2018). De esta manera, algunos géneros de hongos filamentosos como *Rhizopus*, son explorados para producir celulasas en residuos agrícolas y su producción es optimizada mediante planificación experimental (BEHNAM et al., 2019).

La aplicación de la planificación experimental en la biotecnología tuvo inicios en el 2000 (MANDENIUS & ANDERS, 2008). Esta metodología tiene como objetivo recopilar y

analizar un conjunto de experimentos, para obtener resultados validos con un mínimo esfuerzo, tiempo y recurso (LEE & DAVID, 2006). Por medio de la combinación de optimización de medios de cultivo y variables del proceso (NUNEZ et al., 2013).

En vista de la amplia aplicación de las celulasas se hace necesario explorar nuevas fuentes para seleccionar microorganismos con potencial diferenciado. En este sentido, la biodiversidad del Parque Nacional de Iguazu (PNI) abre la oportunidad de exploración en su suelo de alta cantidad de materia orgánica por la vegetación y diferenciación litológica. Estas condiciones de suelo, pudieron haber llevado a la adecuación de microorganismos con potencial biotecnológico. Es así que el presente proyecto tiene como objetivo evaluar el potencial de hongos filamentosos aislados del PNI, capaces de producir celulasas con carboximetil celulosa (CMC) como única fuente de carbono y la degradación de residuos agrícolas mediante la metodología de la planificación experimental, visando condiciones económicas de cultivo para futuras aplicaciones biotecnológicas.

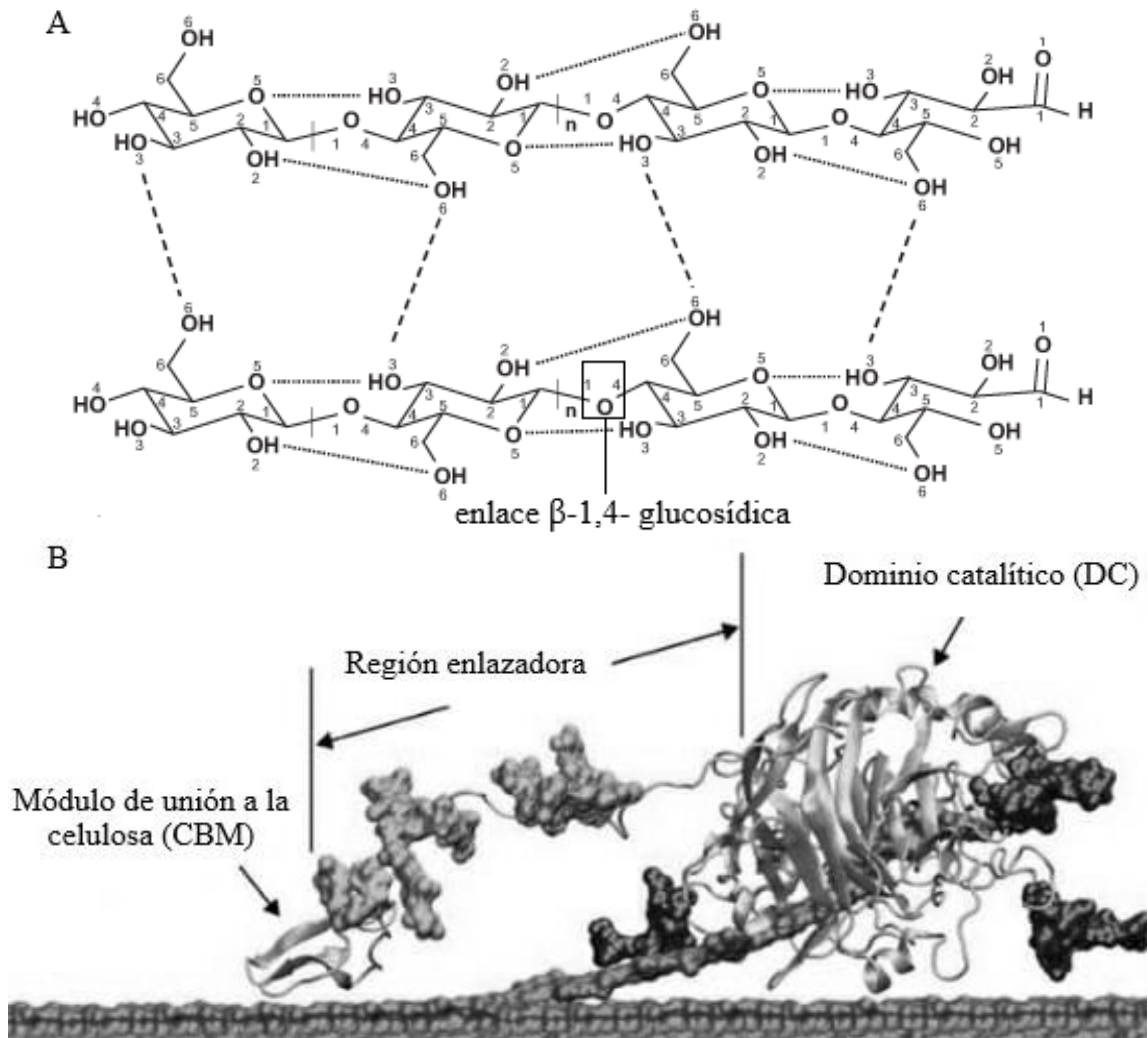
2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 CELULASAS

Las celulasas son un conjunto de enzimas hidrolíticas (utilizan agua para romper enlaces químicos) que descomponen la celulosa (MOJSOV, 2016). La celulosa es un polímero orgánico ($C_6H_{10}O_5$) de cadena lineal formada por unidades de d-glucosa unidas por enlaces β -1,4- glicosídicas, encontrado en la pared celular de plantas verdes, algas y ascomicetos (GUPTA et al., 2019) (Figura 1. A). La hidrólisis de la celulosa es efectuada en los enlaces β -1,4- glicosídicas, seguidamente, son liberados oligosacáridos, celobiosa y glucosa como producto final de la descomposición, (Figura 2) (KLYOSOV, 1990; PAUL et al., 2019). Siguiendo la nomenclatura del Comité de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (NC-IUBMB), las celulasas se clasifican en glucósidos hidrolasas (EC 3.2.1) (INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, 2019).

La mayoría de celulasas posee generalmente en su estructura dos dominios (Figura 1. B), uno de sus dominios es llamado de dominio catalítico y el otro es el módulo de unión a la celulosa (CBM), que tiene por función aproximar la celulosa hacia el dominio catalítico, permitiendo mayor accesibilidad al enlace glucosídico para su ruptura. Además, los dos dominios son separados por una región enlazadora flexible (CLIFFORD, 2019; SHARMA et al., 2019).

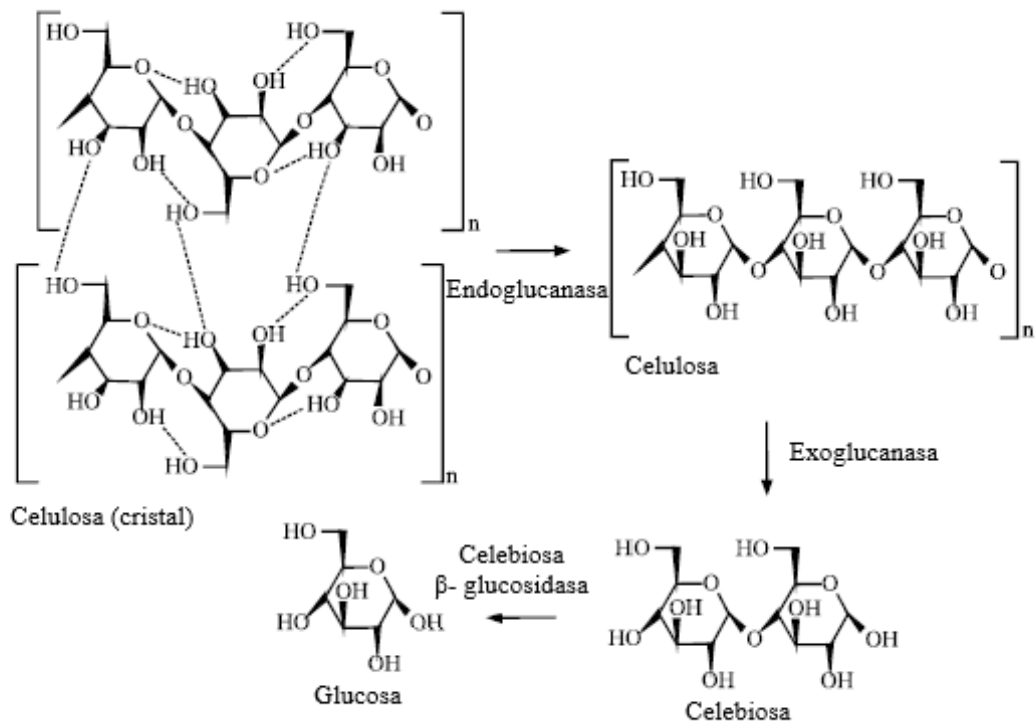
Para el hidrolisis completa de la celulosa es necesario la combinación de enzimas que actúan sinérgicamente, llamado de complejo enzimático celulosa, este conjunto de celulasas se clasifica según su sitio de actuación en la descomposición de la celulosa, están las endoglucanasas o endo-1,4- β -D-glucanasas, exoglucanasas o celobiohidrolasas (CBH) y β - glucosidasas (MOJSOV, 2016; OGEDA & DENISE, 2010).



Adaptado de: CLIFFORD, 2019; FESTUCCI-BUSELLI et al., 2007

Figura 1: a) Estructura de la celulosa con sus enlaces β -1,4- glucosídicas, b) estructura del módulo catalítico, módulo de unión y el enlazador de una celebiodrolasa.

Las endoglucanasas son las encargadas de romper ligaciones glucosídicas de las cadenas de celulosa en locales amorfos, formando nuevos terminales (JAYASEKARA & RENUKA, 2019; OGEDA & DENISE, 2010). Además, las endoglucanasas difieren en sus módulos catalíticos dependiendo del microorganismo que las produce, las endoglucanasas fúngicas poseen un módulo catalítico con o sin CBM, por otro lado, las endoglucanasas bacterianas poseen múltiples módulos catalítico CBM (ZHANG & YI-HENG, 2013). A su vez, la diferencia de la estructura del dominio catalítico en forma de hendidura está muy relacionada con su función en la descomposición de la celulosa, esto le permite a la enzima unirse para liberar fragmentos insolubles al quebrar la cadena (SHARMA et al, 2019; ZHANG & YI-HENG, 2013). Además, las endoglucanasas tienen una rápida actividad hidrolítica cuando colocadas sobre un sustrato modificado como caboximetil celulosa (CMC) (WILSON, 2016).



Adaptado de: KARMAKAR et al., 2011

Figura 2: Mecanismo de acción en la descomposición de la celulosa, iniciado por la celulasa endoglucanasa, seguido por la exoglucanasa y finalizando la β -glucosidasa.

Seguidamente, las exoglucanasas en el proceso de descomposición de la celulosa, separan las unidades de celebiosa, actuando en los terminales reductores y no reductores (OGEDA & DENISE, 2010; SAJITH et al., 2016; PANCHAPAKESAN & NAVEEN, 2016). Las exoglucanasas o celobiohidrolasas (CBH) son las más estudiadas y encontradas en diferentes microorganismos, el tipo CBH I actúa en terminaciones reductoras y la CBH II que actúa en los extremos no reductores (PANCHAPAKESAN & NAVEEN, 2016). De acuerdo a la estructura del dominio catalítico, tiene formato de túnel, y el modo de actuación de la enzima parte desde el CBM que se incrusta en la cadena de la celulosa y la cadena pasa a ser digerida por el dominio catalizador enzimático, produciendo celobiosa (SHARMA et al, 2019; ZHANG & YI-HENG, 2013).

Finalmente, la β -glucosidasa completa el proceso de hidrólisis de celulosa quebrando la celebiosa a glucosa (SAJITH et al., 2016; OGEDA & DENISE, 2010). Las β -glucosidasas a diferencias de las endoglucanasas y las exoglucanasas, no contienen CBM, por lo que su actividad en la celulosa insoluble es mínima, pero la importancia de esta enzima en el

proceso de degradación de la celulosa, es de eliminar la celobiosa producida por las exoglucanasas, puesto que la celobiosa inhibe la actividad enzimática de las endoglucanasas y exoglucanasas (SHARMA et al., 2019).

2.2 EXPLORACIÓN DE CELULASAS EN LA BIOTECNOLOGÍA

A lo largo de los años se han explorado extensamente las celulasas por medio de la biotecnología para mejorar los productos enzimáticos, puesto que la aplicación de las celulasas en diferentes industrias es muy amplia (LIU & CHANDRAKANT, 2017). Según RAVINDRAN y colaboradores (2018) estiman que el mercado mundial de las enzimas aumenta a una tasa de crecimiento anual compuesta (CAGR) de 4,7% entre el 2016 (\$5.0 mil millones) y 2021 (\$ 6.3 mil millones). Las principales enzimas comerciales son provenientes de microorganismos (Cuadro 1).

Cuadro 1. Listado de enzimas celulasas comerciales provenientes de microorganismos

Marca	Producto y actividad enzimática
1,4- α -D-Glucan glucohidrolasa AMG 300L™. Exo-1,4- α -glucosidasa Glucoamilasa	Amiloglucosidasa de <i>Aspergillus niger</i> ≥ 260 U/ml, solución acuosa
1,4- α -D-glucano-glucohidrolasa Fungamyl® 800 L	α -amilasa de <i>Aspergillus oryzae</i> solución acuosa, ≥ 800 U/g
1,6- α -D-Glucano, 6-glucohidrolasa dextranasa Plus L	Dextranasa de <i>Chaetomium erraticum</i>
D-xilosa cetol-isomerasa Sweetzyme® IT Extra Carezyme 1000L®	Glucosa isomerasa de <i>Streptomyces murinus</i> ≥ 350 U/g Celulasa de <i>Aspergillus sp.</i> solución acuosa
Lactase Lactozyme® 2600 L Pectinex Ultra Clear®	β -galactosidasa de <i>Kluyveromyces lactis</i> ≥ 2600 U/g Pectinasa de <i>Aspergillus aculeatus</i>
Pentopan Mono BG® Celluclast® 1.5L	Polvo de xilanasa, ≥ 2500 U/g, recombinante, expresado en <i>Aspergillus oryzae</i> Celulasa de solución acuosa de <i>Trichoderma reesei</i> , ≥ 700 U/g

Fuente: RAVINDRAN et al., 2018

Una de las industrias que utiliza celulasas, es la alimenticia, y junto a otras enzimas participan en procesos de extracción, clarificación de jugos de frutas y vegetales, para aumentar

el rendimiento, mejorar la textura y propiedades sensoriales, disminuyendo la viscosidad de purés de frutas, los principales microorganismos participantes en esta industria a producir celulasas son *Trichoderma reesei* y *Aspergillus niger* (JAYASEKARA & RENUKA, 2019; SOARES, et al., 2016).

Las celulasas poseen beneficios en la alimentación en animales, mediante un pretratamiento del ensilaje, elevan el valor nutritivo, mejorando la digestión en animales rumiantes, favoreciendo a una mayor producción de leche y carne, al igual que en otros animales monogástrico como cerdo y aves de corte, las celulasas junto a otras enzimas facilitan la degradación de manera más efectiva los componentes no digeribles (IMRAN et al., 2016; KUNAMNENI, 2016; NUNES, 2018).

Las celulasas, son también utilizadas en procesos de producción de cerveza, mejorando el proceso de filtración de la malta, para evitar la formación de geles (CHAKRABORTY et al., 2016). También se envuelve en procesos importantes para la producción de vino tinto, permitiendo mayor maceración de la piel y mejora la extracción de color del vino (CHAKRABORTY et al., 2016).

Las celulasas en la industria textil han sido utilizadas en procesos de fabricado y acabado, mejorando el color y brillo del textil (ARJA, 2007; JAYASEKARA & RENUKA, 2019; JUTURU & JIN, 2014). De esta forma, las enzimas son aplicadas en el tratamiento de prendas, como biopulido y biostonización de jeans. Este último consiste en la degradación del extremo de la fibra del tejido, con el objetivo de desprender el tinte del textil. Facilitando así el proceso lavado mecánico (KUNAMNENI, 2016). Las celulasas son muy utilizadas en esta industria, porque agilizan los procesos y a su vez, su uso permite ahorro de energía y es desnecesario la implementación de productos químicos. Otra ventaja de las celulasas, es que son material de fácil aplicación y son biodegradables, por lo tanto, no contaminan el medio ambiente (ARJA, 2007; SIMIC; SOLJACIC; PUSIC, 2015). Las celulasas comerciales utilizadas en la industria textil provienen de hongos del género *Trichoderma reesei* y *Streptomyces* y bacterias del género *Thermobifida* (JAYASEKARA & RENUKA, 2019).

Igualmente, las celulasas son aplicadas en la industria de detergentes junto a otras enzimas. Las más utilizadas en esta industria son las celulasas alcalinas, estas consiguen infiltrarse entre las fibras, favoreciendo la completa eliminación de manchas en la tela, además adicionan a la ropa brillo de color y suavidad (JUTURU & JIN, 2014). Estudios muestran el

potencial de *Bacillus* sp. Termófilo SMIA-2 para ser aplicado en la industria de detergentes, para la producción de celulasas en fermentación con bagazo de caña (LADEIRA et al., 2015).

Además, las celulasas se aplican en uno de los sectores más grandes, la industria de fabricación de pulpa y papel, con el objetivo de mejorar sus propiedades. Las celulasas son utilizadas en procesos como biodeink, que en combinación con la xilanasas generan apariencia de limpieza y brillo en desechos de papel para reaprovechamiento, reduciendo así contaminación ambiental (JAYASEKARA & RENUKA, 2019; SINGH et al., 2016). Trabajos recientes muestran la modificación de la pulpa y el papel por medio de un complejo celulasa-xilanasas por *Escherichia coli* SD5, esta bacteria consigue realizar esa coproducción de enzimas, mediante la utilización de medios inductores (VINOD et al., 2018). Otro trabajo, con el objetivo de modificación de la pulpa y mejorar la calidad de papel en medio alcalino, insertaron un gen endoglucanasa tolerante a pH alcalino en *Bacillus subtilis* Y106 por medio de ingeniería genética, estas enzimas presentaron propiedades para ser utilizadas en pulpa de madera dura, blanda y material no maderero (WANG et al., 2017).

2.3 CONVERSIÓN DE CELULOSA Y TRATAMIENTO DE BIOMASA

A pesar de la demanda, las enzimas son reactivos relativamente caros, y esto se suma al costo operativo de los procesos que se utilizan. En base al análisis económico, la planta de proceso para la producción de la enzima revela, que casi el 50% del costo de producción está asociado con la inversión de capital, mientras que de materias primas representan casi un tercio de dicho costo. La sustitución de materias primas con fuentes celulósicas puede dar como resultado un mayor retorno de la inversión (RAVINDRAN et al., 2018).

En los últimos años los residuos agrícolas y agroindustrial en Brasil ha sido creciente, según datos colectados de 2005 hasta 2015 y seguirá aumentando según previsiones para los años 2020 y 2030 (Tabla 1), siendo Brasil un potencial para ser una fuente sustentable y económica de energía y generación de materia prima para la aplicación en otras industrias (DE MORAES et al., 2017).

El Brasil se destaca como un gran generador de biomasa por ser el mayor productor y exportador de caña de azúcar, dejando gran cantidad de residuos, además de la mazorca de

maíz y el salvado de arroz, entre otros residuos. La utilización de estas fuentes alternativas balancearía el costo en producción de celulasas (RAVINDRAN et al., 2018).

Tabla 1: Oferta de biomasa por residuos (millones de toneladas) generadas y proyecciones de residuos para el Brasil.

Biomasa	2005	2010	2015	2020	2030
Residuos agrícolas	480	633	768	909	1196
Soya	185	251	302	359	482
Maíz	176	251	304	361	485
Arroz (paja)	57	59	62	66	69
Caña de azúcar	60	73	100	119	160
Residuos agroindustriales	80	98	130	154	207
Caña de azúcar (bagazo)	58	70	97	115	154
Arroz (cascara)	2	2	3	3	3
Lejía	13	17	21	25	34
Madera	6	8	10	12	16
Florestas energéticas	13	30	31	43	46
Madera excedente	13	30	31	43	46

Fuente: DE MORAES et al., 2017

Los volúmenes crecientes de desechos agrícolas y alimentares, han generado preocupación, por los problemas medioambientales que causa la eliminación inadecuada, principalmente por la formación de gases efecto estufa tóxicos, por esta razón, son desarrolladas investigaciones para aprovechar su riqueza nutritiva que favorece el cultivo de microorganismos celulolíticos (DUNGANI et al., 2016; MARZO et al., 2019).

De esta forma, con el objetivo de aprovechar material lignocelulósico, como una alternativa ecológica sostenible, estudios demuestran la conversión por medio de celulasas para

producción de biocombustibles (SRIVASTAVA et al., 2018). El trabajo presentado por YOON y colaboradores (2019), los autores realizaron fermentación *in situ*, de un co-cultivo del hongo *Pycnoporus sanguineu* junto a la *Saccharomyces cerevisiae* en bagazo de caña, por función el hongo consiguió producir celulasas para sacarificación de la celulosa y producir azúcar reductor, sirviendo este azúcar como fuente de carbono para seguidamente ser convertido en etanol por *Saccharomyces cerevisia*.

Para una producción más económica de celulasas, microorganismos celulíticos son colocados en procesos de fermentación solida (SSF) o fermentación sumergida (SmF) en diferentes residuos agrícolas o agroindustriales (Tabla 2) (SINGHANIA et al., 2017).

Tabla 2: Producción de celulasas por microorganismos celulíticos bajo fermentación sólida (SSF) y fermentación sumergida (SmF) en diferentes residuos agrícolas y agroindustriales.

Microorganismo	Sustrato	Método	Tiempo	Actividad enzimática	Referencia
<i>Aspergillus niger</i>	Salvado de trigo y paja de trigo	SSF	96h	CMCase (14.8 U/g)	(Jecu, 2000)
<i>Trametes versicolor</i>	Astillas de madera de eucalipto	SSF	15 días	FPasa (4 U/cultivo), β -glucosidasa (3.8 U/cultivo)	(Machuca and Ferraz, 2001)
<i>C. subvermispora</i>	Astillas de madera de pino	SSF	30 días	CMCasa (15.3U/kg), β -glucosidasa (53U/kg)	(Heidorne et al., 2006)
<i>A. niger</i> MS82	Hierba	SmF	6 días	CMCase (6.8U/mL)	(Sohail et al., 2009)
<i>Aspergillus sp.</i> NAM-F35	Paja de trigo	SSF	7 días	CMCase (487U/mL), FPase (79 U/mL)	(Abo-State et al., 2010)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Paja de arroz y salvado de trigo	SSF	4 días	CMCasa (14,7 U/g), β -glucosidasa (8,51 U/g), FPasa (0,93 U/g)	(Sherief et al., 2010)
<i>Rhizopus oryzae</i>	Jacinto de agua	SmF	48h	CMCase (495 U/mL), β -glucosidasa (137.32 U/mL)	(Karmakar and Ray, 2011)
<i>A. niger</i> USMA1	Bagazo de caña de azúcar y almendra de palma	SSF	6 días	FPase (3.4 U/g)	(Lee et al., 2011)

Tabla 2: Continuación, producción de celulasas por microorganismos celulolíticos bajo fermentación sólida (SSF) y fermentación sumergida (SmF) en diferentes residuos agrícolas y agroindustriales.

Microorganismo	Sustrato	Método	Tiempo	Actividad enzimática	Referencia
<i>A. niger</i>	Residuos de fibra de coco	SSF	72h	CMCase (8.89 U/g), FPase (3.56 U/g)	(Mrudula and Murugamm I, 2011)
<i>Streptomyces sp.</i> sssr-198	Paja de arroz (1.8%)	SmF	96h	Xilanasa (100.3 U/mL), Endoglucanasa (1.56 U/mL)	(Singh et al., 2014)
<i>A. niger</i>	Cáscara de piña	SmF	48h	celulasa (0.92 U/mL)	(Kannahi and Elangeswari, 2015)
<i>Pseudomonas lutea</i> BG8	Bagazo de caña de azúcar (2,99%)	SmF	96h	β -glucosidasa (23,29 U/g)	(Tiwari et al., 2015b)
<i>Trichoderma atroviride</i>	Residuos vegetales	SSF	5 días	CMCase (178.92 U/g), FPase (98.89 U/g)	(Bairagi, 2016)
<i>Trichoderma sp.</i> RCK65	Salvado de trigo	SSF	72h	CMCase (154 U/g), FPase (46,9 U/g), β -glucosidasa (144.1 U/g)	(Chakraborty et al., 2016)
<i>Malbranchea cinnamomea</i>	Paja de sorgo (5g /mL)	SSF	3-7 días	CMCase (304 U/g-ds), β -glucosidasa (234.18 U / g-ds)	(Mahajan et al., 2016)
<i>T. viride</i> GIM	Cáscara de plátano	SSF	144h	CMCase (10.31 U/g), FPase (5.56 U/g), β -glucosidasa (3.01 U/g)	(Sun et al., 2011)
<i>T. reesei</i>	Casco de soja	SSF	96h	19.3g/L	(Ellila et al., 2017)
<i>Aspergillus tubingensis</i>	Rastrojo de maíz	SSF	4 días	Celulasa (112 μ g/mL/min)	(Imran et al., 2017)
<i>T. auranticus</i> RCKK	Salvado de trigo	SSF	72h	CMCase (102 U/g), FPase (20.24 U/g), β -glucosidase (27.32 U/g)	(Jain et al., 2017)
<i>Bacillus subtilis</i> RA 10	Paja de arroz (1.24%)	SmF	72h	β -Glucosidase (57.31 U/g)	(Tiwari et al., 2017)
Cultivo mixto de <i>T. reesei</i> y <i>A. niger</i>	Rastrojo de maíz y paja de arroz tratado con NaOH	SmF SmF	5 días	FPase (3.63 U/mL), FPase (2.56 U/mL)	(Zhao et al., 2018)

Fuente: SHARMA et al., 2019

En este sentido la utilización de metodologías de diseños factoriales auxilian a la optimización para la producción de endoglucanasas por *Streptomyces diastaticus* PA-01 bajo fermentación sumergida cultivadas en bagazo de caña y salvado de avena, las características presentadas por la endoglucanasa son interesantes para aplicación biotecnológica (BISPO et al., 2018). Además, el trabajo como KAUR y colaboradores (2018), utilizan el salvado de trigo como sustrato para la producción de celulasas por fermentación en estado sólido, optimizando diversas variables, por medio de un diseño central compuesto, para *Bacillus subtilis* PJK6 que consiguió producir 1,14 U/ml de actividad de la celulasa.

Las celulasas también son aplicadas en la agricultura para mejorar el rendimiento del cultivo, ayudando a disminuir las enfermedades de las plantas, ya que consiguen degradar la pared de patógenos, también algunos de los hongos celulolíticos ayudan a promover la germinación de semillas y consiguen aumentar el rendimiento en crecimiento de la planta mejorando el sistema de raíces (KUNAMNENI, 2016). Las celulasas también han sido utilizadas para mejorar la calidad del suelo, por lo que la suplementación de celulasas exógenas acelera la descomposición de celulosa en el suelo, aumentando fertilidad del suelo (SHARADA et al., 2014).

Por consiguiente, regiones como el estado de Paraná presenta desarrollo en el sector agrícola, generando grande producción de residuos como cascara de algunos cereales, mazorca de maíz, vaina de soya entre otros (SOUZA et al., 2002). Estos residuos agrícolas a más de estimular la producción de celulasas por fermentación en medios sólidos, la biomasa puede ser aprovechada para ser utilizada como biofertilizante (ATTYIA & SANNA et al., 2002).

Los agricultores enfrentan el alto costo de fertilizantes inorgánicos y su alta utilización contamina el aire, suelo y agua (DEVI & SUMATHY, 2017). Para superar esto, investigadores han encontrado biofertilizantes orgánicos como suministro del suelo, utilizaron la fermentación de residuos de sandía, guayaba, chirimoya para mejorar la germinación de semillas, alargamiento de raíz y botes de *Pennisetum glaucum* (cereal nativo del continente africano), estos residuos fueron los más eficientes, porque además indujeron el crecimiento de microorganismo importantes del suelo (DEVI & SUMATHY, 2017). En otro trabajo determinaron la eficiencia del biofertilizante, de sandía, papaya y plátano de fermentado solido en plantas de 5 semanas, dando como resultado un aumento significativo en las características

físicas de la planta, como el peso, longitud de raíces y número de hojas (LIM & SYLVESTER, 2015).

Según HALIMAH y colaboradores (2019) las enzimas en la agricultura también son utilizadas como biocatalizadores, para la obtención de fertilizante líquido. Un estudio evaluó la presencia de microorganismos celulolíticos en el proceso de compostaje, para analizar celulasas que pueden ser utilizadas como catalizador para la fabricación de fertilizante líquidos. La adición de celulasas mejoró la producción de nitrógeno en un 87,77% (HALIMAH et al., 2019).

2.4 MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE CELULASAS

Las celulasas son un grupo de enzimas expresas por un conjunto de microorganismos, incluyendo hongos, bacterias y arqueas (Tabla 3) (LEO et al., 2019). Las celulasas más conocidas, son las CMCasa, es una endoglucanasa que degradan el sustrato de CMC, otra es la FPasa, es una exoglucanasa que degrada papel filtro y las aviselasa, son exoglucanasa con alta actividad sobre sustrato de laminarinas, curdlán y 1,3-beta-oligoglucósidos (NAJEEB et al., 2015; SANTA-ROSA et al., 2018; RAY, 2015).

La obtención de enzimas por los microorganismos se prefiere a escala industrial debido a que son fáciles de producir, existe un abundante suministro y hay una mejor capacidad de controlar todas las fases de producción de las enzimas (KAUR et al., 2018).

De entre las especies microbianas que se destacan, son los hongos, ecológicamente, son los degradadores principales de celulosa en la naturaleza, contribuyen en un 80% de la descomposición (AHMED & BIBI, 2018; PANCHAPAKESAN & NAVEEN 2016). Según PANCHAPEKESAN & NAVEEN (2016), los hongos son también de importancia económica, porque son productores de enzimas que descomponen una variedad de moléculas de alto valor económico, como citado anteriormente. Los hongos se destacan por que sus celulasas producidas poseen mayor actividad enzimática en comparación con otros microorganismos, también consiguen producir celulasas en sustrato baratos (PANCHAPEKESAN & NAVEEN, 2016).

Tabla 3: Microorganismos y propiedades celulolíticas

Especies microbianas	Fuente	Enzima	Características/ acciones	Referencias
Fungi				
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Marina	CMCase	pH5.6 y 40°C	Rong et al. (2015)
<i>Talaromyces emersonii</i>	Suelo	Endoglucanasa (endo β -glucanasa) con celobiohidrolasa y FPase	pH4.8 y 80°C Termoestable	Busk and Lange (2013); Murray et al. (2001); Brienzo et al. (2008)
<i>Rhodotorula glacialis</i>	Muestras de suelo de la región subantártica	CMCase	4–22°C	Carrasco et al. (2016)
<i>Penicillium roqueforti</i>	Madera de antártica	Endoglucanasa	Abajo 15°C	Duncan et al. (2006)
<i>A. terreus AUMC 10138</i>	Lago de soda	FPase, CMCase, β -glucosidase	pH9.0–11.0	Isaac and Abu-Tahon (2015)
<i>Aspergillus niger (niger)</i>	Tejidos endofíticos del bígaro de Madagascar	CMCase	pH5.0 y 70°C	Yopi et al. (2017)
<i>Trichoderma sp. IS-05</i>	Llanuras costeras	Celulasa	pH3.0	Andrade et al. (2011)
Bacteria				
<i>Bacillus subtilis subsp. Subtilis</i>	Sedimentos marinos	CMCase, FPase, cellobiase	50°C	Kim et al. (2009)
<i>Alteromonas haloplanktis</i>	Región antártica	CMCase	5–20°C	Buchon et al. (2000)
<i>Clostridium sp</i>	Clima psicofílico	Endoglucanasa	15°C	Akila and Chandra (2003)
<i>Bacillus licheniformis</i>	Pozos geotérmicos	CMCase	Termoestable (60–80°C) K	Kiio et al. (2016)
<i>Thermotoga sp.</i>	Áreas calentadas geotérmicamente	Exo y endocelulasa	100–106°C	Ruttersmith and Daniel (1991)
<i>Bacillus sp.</i>	Tracto gastrointestinal de Cerdo tibetano	CMCase y avicelasa	pH4.0 and 60°C	Ma et al. (2015)
<i>Gracilibacillus sp.</i>	Lago salado	Exo- / endocelulasa y β -glucosidasa	pH6.0–10.0 (alkali stable)	Yu and Li (2015)

Tabla 3: Continuación, microorganismos y propiedades celulolíticas

Especies microbianas	Fuente	Enzima	Características/ acciones	Referencias
Bacteria				
<i>Streptomyces griseoaurantiacus</i>	Residuos municipales	Endoglucanasa y β -glucosidasa	pH hasta 11.0 y 45 ° C	Prasad et al. (2013); Kumar (2015)
<i>Kocuria sp.</i>	Tejidos endofíticos de <i>Rhynchotechum ellipticum</i>	CMCase	La actividad enzimática varió entre 54,6 y 74.2U / mL	Passari et al. (2017)
<i>Serratia rubidaea</i> DBT4	Tripa de cabra / tripa de cerdo	Celulasa (CMCase y FPase)	pH8 and 55°C	Asem et al. (2017)
<i>Burkholderia cepacia</i> BPS-GB3	Variedades de hierba perenne (<i>Neyraudia reynaudiana</i> y <i>Saccharum arundinaceum</i>)	β -glucosidasa (5.36–12.34IU), FPasa (0.26–0.53IU), CMCase (2.31–4.65IU)	Resultado de estudio tricultural en 55% –70% de pérdida en seco peso en perenne materia prima de biomasa	Leo et al. (2016)
<i>Acidothermus cellulolyticus</i>	Aguas termales ácidas	Avicelase, FPase, CMCase, y β -glucosidasa	pH4.0–6.0 y termoestable	Ding et al. (2003); Tucker et al. (1989)
Arquea				
<i>Pyrococcus furiosus</i>	Calentado geotérmicamente sedimentos marinos	Actividad de endoglucanasa (GH12)	112°C	Bauer et al. (1999)
<i>Pyrococcus horikoshii</i>	Fluido hidrotermal		97°C	Ando et al. (2002)
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	Aguas termales ricas en azufre		pH1.8 y 80 ° C	Huang et al. (2005)

Fuente: LEO et al., 2019

El género de hongos *Trichoderma* son ampliamente utilizados para la producción de celulasas. La cepa *T. reesei* M2-1 en un trabajo produjo celulasas actividad de degradación de papel filtro 20,3 U/ml y una eficiencia de producción de 254 U/g con la fuente de carbono tratada con invertasa. La fuente de carbono utilizada fue, la sacarosa proveniente como subproducto de la producción de azúcar, el experimento fue realizado por alimentación continua por 10 días (IKE & KEN, 2018). Como alternativa de producción de enzimas de bajo costo, como la utilización de aguas residuales que condujo a *Trichoderma harzianum* HBA03 a producir 1,41, y 1,14 veces de producción de FPasa y CMCase, comparado con un medio

sintético, siendo este un proceso sostenible y reducción del impacto ambiental (LIBARDI et al., 2017).

Otro fungo celulítico bastante estudiado es del género *Aspergillus*. En investigaciones exploran *Aspergillus fumigatus* para la producción de celulasas en fermentación semisólida de diferentes residuos agroindustriales, mediante un diseño experimental, investigaron la influencia de diferentes parámetros (humedad inicial, pH), en las actividades de las enzimas CMCasa y FPasa, donde con bagazo de caña presentaron altos valores (4.20 U/g y 0.64 U/g) (OLIVEIRA et al., 2018). La cepa *Aspergillus niger* BK01 su producción de celulasas fueron favorecidas mediante la optimización paramétrica en fermentación en estado sólido de paja de arroz pre tratado. La producción máxima fue 12.0 U/gds de carboximetilcelulosa, CMCasa (AGGARWAL et al., 2017). Mientras que otros trabajos utilizan bagazo de caña como sustrato y optimizan condiciones de *A. niger* para la producción de celulasas. Los datos se basaron en los niveles de reducción de glucosa y niveles de enzima, donde la mayor reducción de glucosa fue de la concentración de inóculo de 25% generando 12.834 g/ml. La producción de enzima más alta (0.740 g/ml), fue con una concentración de inóculo de 25% (ARDHI; SULISTYARSI; PUJIATI et al., 2017).

De entre las bacterias en cepas del género *Bacillus subtilis* son bastante estudiadas y utilizadas para la producción de celulasas, por su alta tasa de crecimiento (SILVA et al., 2018). Es por ello que trabajos como YAN y colaboradores (2019) aislaron e identificaron y optimizaron condiciones mediante un experimento de factor único y prueba ortogonal para una mayor producción de celulasas por la cepa *Bacillus subtilis* Q3. En condiciones óptimas, a 37°C, 72h, con un pH 5.4 y una velocidad máxima de 180 rpm la actividad máxima de celulasa del sobrenadante bacteriano Q3 fue de 18.667 U / ml. En otro estudio aislaron y seleccionaron cepas de *Bacillus subtilis* con mayor actividad enzimática termófilo, desde el compostaje de residuos de café, caracterizado por la excreción de enzimas con actividades de endoglucanasas y exoglucanasas 0.254 y 0.519 U / ml, respectivamente, estas enzimas pueden ser utilizadas en la adquisición de sustratos fermentables para producción de energía (SIU-RODAS et al., 2018).

2.5 DIVERSIDAD FÚNGICA DEL PARQUE NACIONAL DE FOZ DE IGUAÇU

El Parque Nacional de Foz do Iguacu (PNI), está localizado en la parte oeste del estado de Paraná (25 ° 27'38.89 "S, 53 ° 55'19.54" W) (SOUZA et al., 2017). Posee una extensión 185.262 hectáreas y un marco de 420 km. El PNI fue creado el 10 de enero de 1939 y en 1986 tuvo reconocimiento por la UNESCO como Patrimonio de la Humanidad, esto porque es la última muestra del Dominio del Bosque Atlántico (SALAMUNI et al., 2002). El PNI se sitúa en un territorio cuya temperatura mínima es de 3°C y una máxima de 40°C, además posee un escenario de humedad relativa de aire de hasta 80% y por la región geográfica ocupada posee un clima Cfa (con verano caluroso) (ALVARES et al., 2013; SALAMUNI et al., 2002)

Además, la vegetación del PNI es compuesta por, Bosque estacional semi-decidual (FES) que compone el 89,9% del PNI y el Bosque ombroflia mixta (FOM) conocido como "Bosque de Araucaria" que constituye el 13,1% del PNI (SANQUETTA et al., 2014). El Bosque de Araucaria se subdivide en, Bosque Mixto de Araucaria Aluvial, Bosque de Araucaria Mixto Sub Montaña, Bosque de Araucaria Montaña, Bosque Mixto de alta Montaña. El 20-50% de las comunidades de FES son arboles altos y pierden sus hojas durante estaciones frías y seca, la caída de sus hojas incrementa grandes cantidades de materia orgánica en los suelos, también sus suelos contienen secciones de razonable acidez y basicidad, esto por los derrames volcánicos que llevaron a una variación litológica, generando un terreno de adaptación y participación de microorganismos degradadores, como hongos y bacteria que aprovechan los nutrientes y sales minerales de los vegetales (CARVALHAL; RODRIGUES; BERCHEZ , 2019; SALAMUNI et al., 2002; SANQUETTA et al., 2014). Actualmente la diversidad funcional de estos microorganismos es desconocida, siendo necesario la exploración para encontrar potenciales Biotecnológicos.

El trabajo de DUQUE DIANA (2016) demostró, al aislar y preservar 366 morfotipos del PNI del borde y del interior de la floresta, que el efecto del borde artificial es negativo sobre la riqueza y neutro en la composición de los hongos, y en base a los caracteres morfológicos, identificó 50 morfotipos a nivel de género, familia y división (DUQUE CASTAÑO, 2016). Los potenciales degradadores de lignina, los identificó por ser positivos en guayacol, 48 de los encontrados son del interior de la floresta y 21 del borde, y muchos de los aislados pertenecen al género *Trichoderma* e *Fusarium*. Muchos hongos con potencial degradador fueron hallados en la parte interior de la floresta estudiada, pero no hubo

considerable diferencia sobre la riqueza de hongos con potencial ligninolítico entre el borde y el interior de la floresta (DUQUE CASTAÑO, 2016).

Los hongos aislados del PNI han demostrado ser potencial biotecnológico, como expuesto en el trabajo de ESPARZA – NARANJO (2018), de biodegradación de atrazina. Consistiendo su trabajo en demostrar que no existe relación entre la degradación de la atrazina, producción de la biomasa y producción de lacasa, no pudiéndose establecer un método de selección de hongos con potencial de degradar atrazina. Por consiguiente, realizó análisis cromatográficos de 9 hongos, donde 4 tuvieron potencial de degradar atrazina y fueron seleccionados en base a la formación de desetilatrazina (DEA), los hongos tuvieron capacidad de degradar atrazina y producir desisopripilatrazina (DIA), pero no hubo diferencia significativa entre los aislados, y tampoco diferencia entre los productores de DEA. Según sus características morfológicas y moleculares, algunos identificados son del género *Fusarium* y *Aschersonia*, los más destacados son del género *Fusarium* por ser fitopatógenos que catalizan la atrazina mediante el retiro de n-aquilo terminales, que consecuentemente lleva a formación de DEA.

2.6 PLANIFICACIÓN EXPERIMENTAL Y OPTIMIZACIÓN DE PROCESOS

La planificación experimental se conoce desde principios de 1900, y solo a partir del 2000 es aplicado en la biotecnología (MANDENIUS & ANDERS, 2008).

LEE & DAVID (2006) establecen que, para el desenvolvimiento de bioprocesos, los modelos teóricos o matemáticos no pueden describir el proceso con 100% de certeza, esto por la complejidad del metabolismo celular, que limita, siendo necesarios enfoques empíricos eficientes, que proporcionen abundante información y permitan al investigador llegar a conclusiones significativas (LEE & DAVID, 2006).

Los experimentos diseñados estadísticamente utilizan un pequeño conjunto de experimentos cuidadosamente planificados (LEE & DAVID; MANDENIUS & ANDERS, 2008). Este método permite estudiar muchas variables simultáneamente con un bajo número de observaciones, ahorrando tiempo y costo (MANDENIUS & ANDERS, 2008).

La planificación experimental más usual es el diseño factorial completo, donde se examinan todas las combinaciones posibles de las variables de un experimento (ANTONY, 2014). El número total de experimento se logra con las combinaciones de entre los niveles de factores (2^k), donde k es el número de variables y 2 es el número de niveles, este diseño utiliza 5 variables independientes, donde el número de ejecuciones asociado con este diseño es 32 (2^5) (NUNEZ et al., 2013).

En los diseños experimentales para seleccionar y optimizar variables, los valores reales de los niveles se identifican generalmente con un valor máximo y un valor mínimo para eliminar los efectos de diferentes rangos de variables y facilitar el análisis de datos e inferencias (NUNEZ et al., 2013).

Según NUNEZ y colaboradores (2013) el diseño factorial fraccionado es una fracción del diseño factorial completo original de dos niveles para un número definido de factores, se aplican cuando se suponen que algunas interacciones entre factores no son significativas. El diseño fraccional de dos niveles con resolución V es más aplicado, se encarga de evaluar el efecto principal y las interacciones de dos factores independientemente (hay alias de las interacciones de dos factores con interacciones de tres factores) (NUNEZ et al., 2013).

3 OBJETIVO

3.1 GENERAL:

El presente proyecto tuvo como objetivo evaluar la producción de celulasas utilizando residuos agrícolas mediante la metodología de planificación experimental con la visión de aplicación biotecnológica en hongos filamentosos con potencial celulolítico aislados del PNI.

3.2 ESPECÍFICOS:

- Seleccionar los aislados con potencial celulítico a partir de las actividades en CMC
- Seleccionar y definir, los residuos agrícolas y las concentraciones a ser evaluadas, en base a la literatura
- Definir las variables independientes de la planificación experimental y elaborar las matrices
- Analizar estadísticamente los resultados de la planificación experimental
- Delineamiento de las etapas futuras visando la optimización de la actividad enzimática.

3 METODOLOGIA

4.1 SELECCIÓN DE LOS AISLADOS

Los hongos con que se trabajó son pertenecientes a la Colección de Cultivos del Laboratorio de Microbiología (CCLM) de la UNILA (DUQUE, 2016). Los hongos seleccionados para el presente trabajo fueron evaluados previamente en medio sólido conteniendo CMC (carboximetilcelulosa es un derivado de celulosa modificado químicamente), como potenciales degradadores de celulosa, bajo la sustentación del “Proyecto de Investigación del Estudio de la Diversidad, Evaluación Funcional y Biotecnológica de hongos de la Región del PNI” del grupo de investigación, donde 30 presentaron actividad celulolítica cuando colocados en cultivo sólido Agar CMC: Agar (15g/mL) CMC 1% (10g/mL), coloridos con rojo Congo (2,5/mL) y lavados con la solución NaCl 1mol/L (Figura 3) (datos en fase de elaboración de artículo) (CHAPLIN, 2019; RUEGGER & TAUKE-TORNISIELO, 2004). Los hongos seleccionados fueron reactivados de la colección Agar Extracto de Malta 2% (MA₂), por 7 días a 28°C (BONUGLI-SANTOS et al, 2016).



Figura 3: Verso de un fungo cultivado en medio (CMC) por 7 días y colorido con colorante rojo Congo. La región más clara determina la ausencia de adsorción del colorante, debido a la quiebra de la ligación glucosídica de (CMC) por acción enzimática del metabolismo fúngico.

4.2 CULTIVO EN MEDIO LIQUIDO PARA EVALUCIÓN CUANTITATIVA

Para confirmar la actividad celulolítica y seleccionar los aislados positivos, tres discos de cinco milímetros de diámetro de cada aislado, es decir de los 30 hongos pertenecientes a los siguientes códigos CCLM: AH, AI, BF, CH, CX, DA, DE, DF, EF, EB, EL, GF, GU, GW, IB, IL, IE, IF, IT, JC, JI, JP, KQ, MD, MN, MP, OB, OJ, PK, LF; fueron transferidos individualmente, para 25 mL de medio liquido de CMC 1% (10g/mL) y extracto de levadura (6,7 g/mL) por 7 días a 28°C y 130 rpm. Después los cultivos fueron transferidos para tubos falcon y centrifugados por 6000 rpm a 4°C por 30 minutos. Los sobrenadantes fueron conservados a 4°C para la evaluación enzimática (BONUGLI-SANTOS et al, 2016; RUEGGER & TAUKE-TORNISIELO, 2004).

4.3 ACTIVIDAD CMC_{Case}

Para la evaluación de la actividad enzimática de la CMC_{Case}, fue utilizado el Kit CellG5 cellulase assay Megazyme, de acuerdo al protocolo del fabricante con algunas modificaciones. Fueron transferidos 25uL de sobrenadante de cada fungo anteriormente cultivado y centrifugado, a los pozos de la microplaca juntamente con 25uL de la solución del sustrato enzimático: 4,6-0- (3-cetobutilideno)-4-nitrofenil-β-D cellopentaósido (BPNPGS) en DMSO/H₂O a 10% (3mL) más azida de sodio (0,02% w/v).

La microplaca marcada con las muestras de cada fungo fue colocada en baño térmico por 10 minutos a 37°C, después, para la detención de la actividad enzimática fue adicionado 300 uL de una solución tampón de Na₂CO₃ en cada pozo con la muestra para finalizar la reacción enzimática. Para el análisis de la actividad enzimática de la CMC_{Case}, la microplaca fue colocada en un lector de microplaca a 405nm.

La actividad enzimática definida como la cantidad de enzima, en presencia de exceso de β-glucosidasa termoestable, requerida para liberar un micromol de 4-nitrofenol de CellG5 en un minuto en las condiciones del ensayo definido, se denominan unidades CellG5. Las unidades de CellG5/mL o g de preparación original es representada en la Ecuación 1.

$$= \frac{\Delta A_{405}}{\text{T tiempo de incubación}} \times \frac{\text{Volumen total en célula}}{\text{Aliquota ensayada}} \times \frac{1}{\epsilon_{mM}} \times \frac{\text{Vol de extracción}}{\text{Peso de la muestra}} \times \text{Dilución}$$

Ecuación 1

Donde:

ΔA_{405} : Absorbancia (reacción) – Absorbancia (Control)

Tiempo de incubación: 10 min

Volumen total en célula: 300 uL

Aliquota ensayada: 25 uL

Aparente ϵ_{mM} de p-nitrofenol (a 405nm) en carbonato de sodio 500m, pH 11: 12,456

Volumen de extracción: 50mL por 1 mL (celulasa)

Dilución: Dilución del extracto incluyendo la extracción original

Por lo tanto, Unidades CellG5/mL o g de la preparación original enzimática, para la valoración de actividad enzimática de cada fungo fue obtenida mediante la Ecuación 2.

$$= \frac{\Delta E_{405}}{10} \times \frac{350}{25} \times \frac{1}{12,456} \times \text{Dilución}$$

$$= \Delta E_{405} \times 0,1124 \times$$

Ecuación 2

4.4 DELINEAMIENTO EXPERIMENTAL

Fue ejecutado un experimento factorial fraccionada como un análisis inicial exploratoria, a fin de seleccionar variables fundamentales en la optimización de los resultados.

En este sentido, cada delineamiento es independiente y a cada delineamiento los niveles de las variables pueden ser alterados (BONUGLI-SANTOS et al., 2016). Inicialmente se tomaron cinco variables independientes (Cuadro 2) incluyendo las concentraciones de diferentes residuos agrícolas (salvado de avena, trigo, aserrín y mazorca de maíz) y cantidad de discos del inóculo, en base a la literatura. Los diferentes residuos agrícolas fueron obtenidos de una tienda de productos naturales en su forma seca y este mismo aspecto fue mantenido para el estudio. El cuadro 2 presenta los valores usados en cada nivel de las variables estudiadas. EL valor 0 (cero) corresponde a los valores centrales de cada variable a través del diseño factorial 2^{5-1} , y los valores 1 presenta corresponde a los valores altos (se suma la mitad del valor de cero más cero) y -1 al nivel bajo (se resta la mitad del valor de cero) (RODRIGUES & IEMMA, 2005).

Los residuos escogidos para el presente trabajo fueron utilizados por la grande demanda del producto, principalmente los tres cereales que son mayormente producidos, por su importancia en la dieta humana, según datos del 2017 mundialmente el maíz y trigo generan grandes cantidades de residuos, seguido por la avena (FAOSTAT, 2019). Otro de los sustratos utilizados fue el aserrín, que precede como un subproducto de la industria maderera, a pesar de sus amplias utilizaciones como fuente de combustible, se exploró como fuente para producción de celulasas, ya que se compone principalmente de celulosa, lignina, hemicelulosa (5-10%) (FELBER et al., 2019; PHONPHUAK & CHINDAPRASIRT, 2015).

El fungo *Fusarium CCLM_CX* seleccionado (fungo seleccionado en base a la actividad enzimática cuantitativa) para la optimización y evaluación de la actividad enzimática celulítica frente a los sustratos naturales mencionados anteriormente, después de haber sido cultivado en Agar y CMC 1%, fue transferido para los 20 ensayos elaborados conforme a la matriz 1 (Cuadro 3), conteniendo la concentración de los inóculos (número de discos de cinco milímetros de diámetro del fungo aislado cultivado en CMC solido) y concentración de los sustratos. En cada ensayo además del inóculo y de los sustratos el medio de cultivo fue humedecido con 25 mL de extracto de levadura 6,7 g/L. El ensayo 2 de la matriz corresponde al control negativo y el fungo también fue cultivado en triplicado en CMC 1% y extracto de levadura 6,7 g/L como control positivo. Los ensayos fueron incubados a 28°C por 10 días (BONUGLI-SANTOS et al., 2016).

Cuadro 2. Variables y niveles del inoculo y de los sustratos naturales evaluados en el Diseño Factorial 2^{5-1}

Variables independientes		Niveles		
		-1	0	1
X1	Inóculo*	1	3	5
X2	Salvado de avena (g)	0	1,25	2,5
X3	Salvado de trigo (g)	0	1,25	2,5
X4	Aserrín (g)	0	1,25	2,5
X5	Mazorca de maíz (g)	0	1,25	2,5

*número de discos de cinco milímetros de diámetro del fungo seleccionado cultivado en medio solido

Cuadro 3. Matriz, combinación de las variables independientes y niveles.

Matriz Codificada 2^{5-1}					
Ensayos	Inóculo	Salvado de avena	Salvado de trigo	Aserrín	Mazorca de Maíz
1	-1	-1	-1	-1	1
2	1	-1	-1	-1	-1
3	-1	1	-1	-1	-1
4	1	1	-1	-1	1
5	1	-1	1	-1	-1
6	1	-1	1	-1	1
7	1	1	1	-1	1
8	1	1	1	-1	-1
9	-1	-1	-1	1	-1
10	1	-1	-1	1	1
11	-1	1	-1	1	1
12	1	1	-1	1	-1
13	-1	-1	1	1	1
14	1	-1	1	1	-1
15	-1	1	1	1	-1
16	1	1	1	1	1
17	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0

4.4.1 Obtención de los sobrenadantes y actividad enzimática

Después del cultivo en cada sustrato indicado anteriormente en el (Cuadro 3), los sobrenadantes de los controles fueron preparados de acuerdo al ítem 4.2. Para los ensayos del diseño, en cada tratamiento fue adicionado 50 mL g⁻¹ de tampón acetato de sodio a 0,2 mol L⁻¹ y pH 4,5 (RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA et al., 2011). La homogenización fue realizada por 1 hora a 120 rpm y 30°C, en seguida el material fue centrifugado a 6000 rpm por 30 minutos. Los sobrenadantes fueron evaluados conforme al ítem 4.3 y los resultados fueron analizados utilizando el software Statistica versión 8. Los resultados fueron evaluados en relación al efecto de cada variable y su significancia (p-valor) a un nivel de 90%.

4 RESULTADOS Y DISCUSIONES

Los hongos analizados en el ensayo cuantitativo son pertenecientes a los siguientes códigos CCLM: AH, AI, BF, CH, CX, DA, DE, DF, EF, EB, EL, GF, GU, GW, IB, IL, IE, IF, IT, JC, JI, JP, KQ, MD, MN, MP, OB, OJ, PK, LF y sus respectivas actividades enzimáticas están presentados en el (Gráfico 1). Prácticamente todos los hongos positivos en el ensayo cualitativo en placa (realizado en el estudio anterior) fueron positivos para la actividad enzimática cuantitativo, a excepción del hongo CCLM_GF, CCLM_IE, CCLM_MN, CCLM_JC, CCLM_OJ (no identificado). Estos validan el método de selección en placa (método cualitativo), como una alternativa en la bioprospección de hongos con potencial celulolítico.

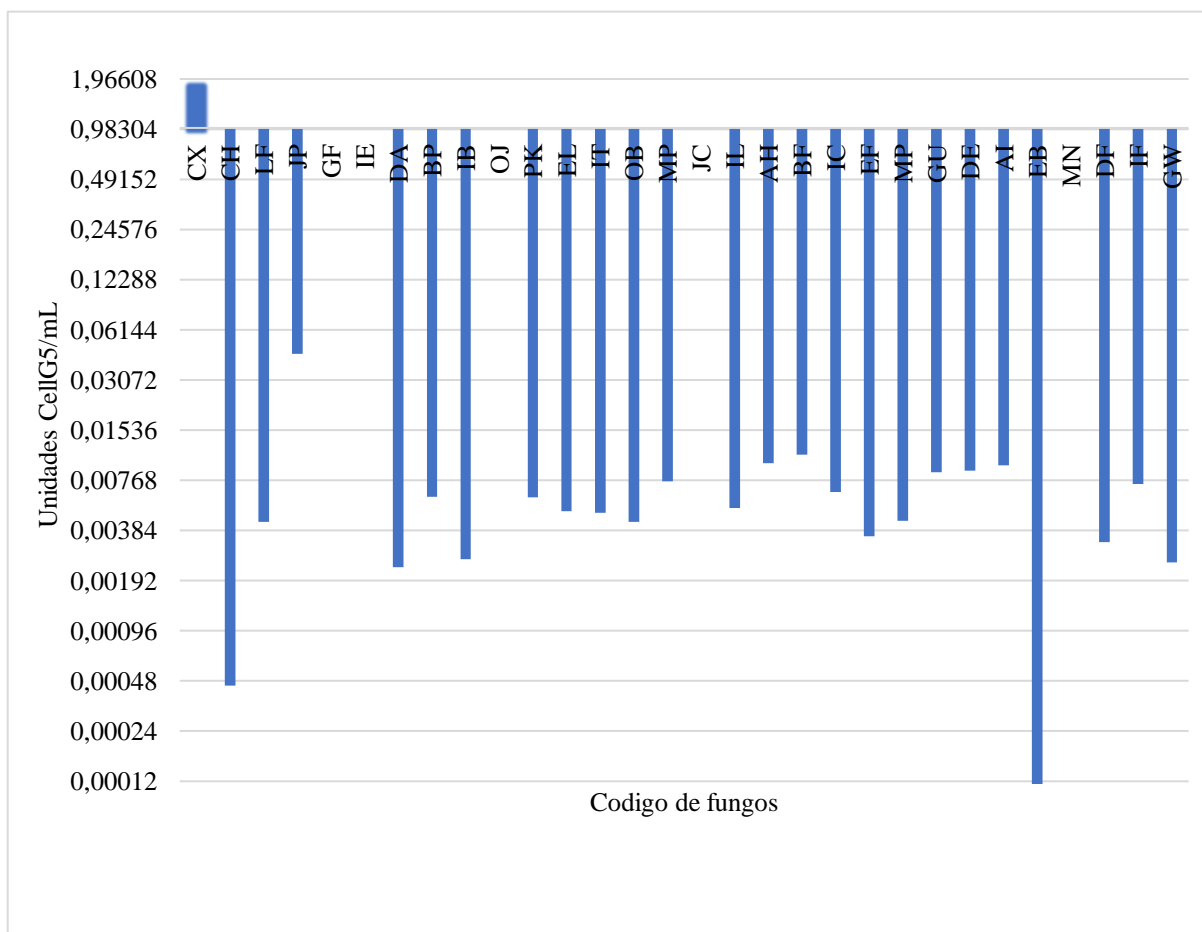


Gráfico 1: Representación gráfica de la actividad enzimática valorada perteneciente al código de cada fungo.

El *Fusarium* sp. CCLM_CX presentó mayor actividad enzimática, 1,729 Unidades de CellG5/mL, que se destaca altamente de los otros hongos de cada código. Según DUQUE DIANA (2016) el fungo referente al código CCLM_CX pertenece al género *Fusarium*, futuros ensayos se realizarán con miras a la confirmación taxonómica. VASQUEZ-MONTOYA y colaboradores (2019) muestran en su trabajo reciente, que especies del género *Fusarium* aislados fueron identificados con un alto nivel de actividad de β -glucosidasa a (664 U/l) cuando cultivadas en medio CMC. En otro trabajo, el aislamiento del género *Fusarium* junto a otros géneros con actividad celulolítica explorados en diferentes hábitats, fueron identificadas mediante análisis molecular, y también reconocieron el poder de degradación cuando cultivadas en CMC de la especie *Fusarium oxysporum* como uno de los sobresalientes (EFFIONG et al., 2019; WAING, 2015).

En base a su actividad celulolíticas el *Fusarium* sp. CCLM_CX fue seleccionado para la optimización y evaluación celulolítica frente a los sustratos naturales, salvado de avena, trigo, aserrín y mazorca de maíz. Donde mediante la matriz se obtuvieron los ensayos, donde cada uno combina variables independientes y sus correspondientes concentraciones y número de disco, en el caso del inóculo (Cuadro 4).

La actividad enzimática frente a los residuos agrícolas es presentada en la (Tabla 4). Se demuestra diferencia si se compara al fungo cuando cultivado en CMC, donde hubo mayor actividad celulolítica (1,729 UCellG5/mL), mientras que en residuos agrícolas fue menor, teniendo un máximo de actividad celulolítica de (0,0163). Esto porque, CMC como única fuente de carbono esta libremente disponible, siendo más fácil la degradación para el fungo, ya los sustratos agrícolas están compuestos por diversos componentes, haciendo más complejo el acceso de las celulasas. Es por ello que, trabajos muestran la efectividad de un pretratamiento químico en los residuos agrícolas. La producción de Fpase 4.90 U, CMCase 1.608 U pasa a ser de FPasa 14.89 U y CMCase 18.60 U cuando tratadas con NaOH y hay un híper producción cuando tratadas con ácido y álcali Fpase 20.46 U, CMCase 17.6 U (NARASIMHA; REDDI PRADEEP; SRIDEVI, 2016).

Cuadro 4. Matriz, combinación de las variables independientes y sus concentraciones según sus niveles

Matriz Codificada 2⁵⁻¹					
Ensayos	Inóculo	Salvado de avena	Salvado de trigo	Aserrín	Mazorca de Maíz
1	1	0	0	0	2,5
2	5	0	0	0	0
3	1	2,5	0	0	0
4	5	2,5	0	0	2,5
5	1	0	2,5	0	0
6	5	0	2,5	0	2,5
7	1	2,5	2,5	0	2,5
8	5	2,5	2,5	0	0
9	1	0	0	2,5	0
10	5	0	0	2,5	2,5
11	1	2,5	0	2,5	2,5
12	5	2,5	0	2,5	0
13	1	0	2,5	2,5	2,5
14	5	0	2,5	2,5	0
15	1	2,5	2,5	2,5	0
16	5	2,5	2,5	2,5	2,5
17	3	1,25	1,25	1,25	1,25
18	3	1,25	1,25	1,25	1,25
19	3	1,25	1,25	1,25	1,25
20	3	1,25	1,25	1,25	1,25

Los resultados en los residuos agrícolas Tabla 4 utilizando planificación experimental fueron analizados estadísticamente, desarrollado por medio del software Statistica versión 8, son presentados en el (Cuadro 5).

Tabla 4: Actividad enzimática del fungo Fusarium sp. CCLM_CX cultivado en diferentes concentraciones de sustratos agrícolas

Ensayos	Inóculo	Salvado de avena	Salvado de trigo	Aserrín	Mazorca de Maíz	CellG5 Units/m
1	1	0	0	0	2,5	0,0071
2	5	0	0	0	0	0,0000
3	1	2,5	0	0	0	0,0000
4	5	2,5	0	0	2,5	0,0098
5	1	0	2,5	0	0	0,0075
6	5	0	2,5	0	2,5	0,0097
7	1	2,5	2,5	0	2,5	0,0110
8	5	2,5	2,5	0	0	0,0163
9	1	0	0	2,5	0	0,0036
10	5	0	0	2,5	2,5	0,0026
11	1	2,5	0	2,5	2,5	0,0093
12	5	2,5	0	2,5	0	0,0000
13	1	0	2,5	2,5	2,5	0,0051
14	5	0	2,5	2,5	0	0,0018
15	1	2,5	2,5	2,5	0	0,0033
16	5	2,5	2,5	2,5	2,5	0,0134
17	3	1,25	1,25	1,25	1,25	0,0024
18	3	1,25	1,25	1,25	1,25	0,0018
19	3	1,25	1,25	1,25	1,25	0,0020
20	3	1,25	1,25	1,25	1,25	0,0034

Cuadro 5. Análisis del efecto de las variables evaluadas en la planificación 2^{5-1}

Sustratos	Efecto	Error estándar	p-valor
Intercepción/significativa	0,005689	0,000857	0,00001
Inoculo	0,000838	0,001867	0,66118
Salvado de avena	0,003213	0,001867	0,10907
Salvado de trigo	0,004463	0,001867	0,03271*
Aserrín	-0,002788	0,001867	0,15937
Mazorca de maíz	0,004438	0,001867	0,03354*

*variables significativas

Los sustratos que presentaron efecto significativo (p-valor = <0.05) fueron el salvado de trigo y mazorca de maíz. Como sus efectos fueron positivos, o sea, aumenta la

respuesta enzimática, es posibles que cuanto mayores concentraciones y adición en los ensayos de estos sustratos, mayor fue su impacto. Con base en el análisis, la concentración del inóculo y los otros residuos no impactaron significativamente para el fungo CX.

Según BISWAS y colaboradores (2019) el salvado de trigo es la mejor fuente de carbono, alcanzando una producción de 11 U/gds de endo β -1,4-glucanasa. Además, el salvado de trigo es también utilizado como suplemento junto a otros residuos como fuente de nitrógeno, su adición incrementa la producción de celulasa de CMCasa (12.6 a 16.8 U/g) B-glucodiasa (0.31 a 5.23U / g) (KITANAN et al., 2018). Así mismo, la mazorca de maíz, es un sustrato que demuestra en un estudio el potencial de la fibra consigue una productividad optima de celulasas de 15.787 U/ml (IRE; OKOLI; EZEBUIRO, 2018).

En el presente trabajo se colocaron variables referentes a la concentración de los residuos agrícolas y numero de discos del inóculo, en otros trabajos colocan diferentes variables: temperatura, tiempo de incubación, pH, humedad inicial, la mejor fuente de nitrógeno, surfactantes (BISWAS et a., 2019). También la importancia de la optimización es demostrada en el trabajo de KUMBAR y coladoradores (2018), donde hubo un aumento de 5,35 veces en la CMCasa y un aumento de 6,62 veces en la actividad de FPasa en comparación con la condición no optimizada, la condición optimizada consistía en, 1% (p / v) de salvado de trigo, 0.3 g / L de MgSO₄, 0.8–1.0 g / L de CaCl₂, temperatura de 25°C y pH 5. Así mismo la adición de iones metálicos Fe²⁺, Co²⁺ estimulan la actividad celulítica (IRE; OKOLI; EZEBUIRO, 2018).

La mazorca de maíz, es la parte central de la inflorescencia femenina, después de la eliminación del grano (PATSIOS et al., 2016). El subproducto del trigo es la capa externa del grano de trigo, llamado de salvado de trigo (PATSIOS et al., 2016). Según su análisis químico poseen propiedades, de entre ellas, cantidades significantes de celulosa, que pudieron favorecer a la producción de celulasas (Cuadro 6). El salvado de avena (capas externas pericarpio del grano que es separado en el proceso de tamizado) no contiene valores significantes de celulosa (PATSIOS et al., 2016). En el caso del aserrín sus cantidades significantes de lignina pudieron haber dificultado el acceso de la celulosa por el fungo (PHONPHUAK & CHINDAPRASIRT, 2015; SIQUEIRA et al., 2017).

Cuadro 6. Propiedades químicas de los subproductos (salvado de avena, mazorca de maíz, salvado de avena).

Propiedades Químicas de Subproductos	Salvado de trigo	Mazorca de maíz	Salvado de avena
Nitrógeno (g/Kg) ^{db}	21.4-139.2	5.38	10.6
Fósforo(g/Kg)	11.1	0.48	7.34
Potasio(g/Kg) ^{db}	13.7	7.04	5.6
Calcio(g/Kg) ^{db}	1.4	1.24	0.58
Magnesio(g/Kg) ^{db}	4.5	-	2.35
Zinc(g/Kg) ^{db}	89.0	-	31.1
Cobre(g/Kg) ^{db}	13.0	-	4.03
Hierro (g/Kg) ^{db}	155.3	-	54.1
Azufre (g/Kg) ^{db}	-	0.66	1.1
Proteína bruta (% en peso) ^{db}	17.3	3.36	15.7-17.3 (16.5)
Azúcares totales (% en peso) ^{db}	7.2	-	-
Celulosa(% g/Kg)	6.8	45	-
Hemicelulosa (% g/Kg)	20.0	35	-
Lignina (% g/Kg)	5.6	15	-

Fuente: PATSIOS et al., 2016; SRIVASTAVA et al., 2019

En base a sus composiciones expuestas, los residuos agrícolas muestran propiedades como fertilizantes (PATSIOS et al., 2016). Efectos de la aplicación de celulasa exógena sobre la descomposición de este tipo de sustratos pueden aumentar la fertilidad de suelo y el crecimiento de las plantas, así lo demuestra en el trabajo de HAN & HE (2010) donde las tasas de descomposición de paja de arroz y trigo aumentaron en un 6.3–26.0% y 6.8–28.0% y el crecimiento de las plantas de arroz aumentaron en un corto plazo, y sobre todo teniendo un efecto respetuoso con el medio ambiente.

Además, las composiciones de estos sustratos, como las cantidades de proteínas y minerales, son importantes para la alimentación animal, al igual que las cantidades de celulosa (PATSIOS et al., 2016). Se ha mostrado en trabajos que las celulasas juegan un papel importante en la digestión alimentaria de animales, la adición de celulasas en la dieta de pequeños rumiantes (cabras) eleva la producción de leche y mejora la composición, ya que las celulasas permiten un mayor aprovechamiento del alimento (ROJO et al., 2015). El tratamiento de estos residuos agrícolas con la adición de celulasas aumenta la degradación de la fibra y en vacas lecheras esto contribuyó a producir 5-25% más de leche (MURAD & AZZAZ, 2010). Las celulasas son de gran utilidad también en animales monogástricos como aves de corral y

cerdos, que no consiguen digerir alimentos altos en fibra (GETABALEW & TEWODROS, 2019).

Este sustrato natural proporciona una alternativa más económica para la producción de enzimas celulasas para ser aplicadas en diferentes industrias, anteriormente mencionado 2.2. (HOLBAN & GRUMEZESCU, 2018). Muchos de los estudios realizados se basan en la producción de celulasas en bagazo de caña, con la futura intención del hidrolisis de este mismo sustrato para producción de etanol de segunda generación, pero para la utilización de este sustrato es necesario la implantación de tratamientos fisicoquímicos para disminuir la cantidad de lignina que obstaculiza la interacción de celulasas-celulosa, además la lignina puede unirse a las celulasas, a veces de manera irreversible, disminuyendo la disponibilidad de la celulasas para catalizar la hidrolisis de la celulosa (ROCHA et al., 2013; SIQUEIRA et al., 2017). Existiendo estas limitaciones se hace necesario la exploración de otros sustratos, como los expuestos en el siguiente trabajo. Se logró identificar mediante la planificación experimental y análisis estadístico al salvado de trigo y mazorca de maíz como variables con posible efecto para la producción de celulasas.

Los resultados, evidencia de la potencial para degradar residuos agrícolas, principalmente salvado de trigo y mazorca de maíz, siendo muy sugerente la aplicación en el Estado de Paraná, por ser el mayor productor nacional de maíz y trigo (FEDERAÇÃO DAS INDÚSTRIAS DO ESTADO DO PARANÁ, 2019).

6 CONCLUSIÓN

En este estudio se evidencio el potencial de degradación de celulosa por hongos aislados de la basura en el Parque Nacional Iguazu, em especial do fungo referente al género *Fusarium* sp. CCLMCX, cuando cultivado en CMC. Bajo la planificación se obtuvo la producción de celulasas del seleccionado en sustratos naturales (salvado de trigo, mazorca de maíz, salvado de avena y aserrín). En base al análisis estadístico, el salvado de trigo y la mazorca de maíz poseen mayores potenciales de sustrato para la producción de celulasas por el fungo *Fusarium* sp. CCLM CX.

La planificación experimental permitió definir y evaluar la concentración del inóculo y la concentración de sustratos para cada ensayo y se evidenció la necesidad de nuevas variables como: pH, temperatura, humedad, tiempo de incubación y fuente de nitrógeno.

El presente estudio abre la posibilidad de futuros trabajos de aplicación biotecnológica, para la utilización y exploración de las celulasas en áreas como la agricultura, usado como biofertilizante o suplemento en la dieta animal.

REFERENCIAS

AGGARWAL, Neeraj Kumar, et al. “Enzymatic Saccharification of Pretreated Rice Straw by Cellulases from *Aspergillus Niger* BK01”. 3 **Biotech**, vol. 7, no 3, junho de 2017, p. 158.

AHMED, Amer.; BIBI, Aasia. Fungal cellulase; production and applications: minireview. **LIFE: International Journal of Health and Life-Sciences**, v. 4, n. 1, 2018.

AKILA, G.; CHANDRA, TS. A novel cold-tolerant *Clostridium* strain PXYL1 isolated from a psychrophilic cattle manure digester that secretes thermolabile xylanase and cellulase. **FEMS microbiology letters**, v. 219, n. 1, p. 63-67, 2003.

ALVARES, Clayton Alcarde, et al. “Köppen’s Climate Classification Map for Brazil”. **Meteorologische Zeitschrift**, dezembro de 2013, p. 711–28.

ANDO, Susumu et al. Hyperthermostable endoglucanase from *Pyrococcus horikoshii*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, n. 1, p. 430-433, 2002.

ANDRADE, Jackeline Pereira et al. Production and partial characterization of cellulases from *Trichoderma* sp. is-05 isolated from sandy coastal plains of northeast Brazil. **Enzyme research**, v. 2011, 2011.

ANTONY, Jiju. “6 - Full Factorial Designs”. *Design of Experiments for Engineers and Scientists (Second Edition)*, organizado por Jiju Antony, **Elsevier**, 2014, p. 63–85.

ATTYIA, Shahera H., e SANAA M. Ashour. “Biodegradation of Agro-Industrial Orange Waste under Solid State Fermentation and Natural Environmental Conditions”. **Egyptian Journal of Biology**, vol. 4, no 1, janeiro de 2002.

ARDHI, Muh Waskito; SULISTYARSI, Ani; PUJIATI. The production and activity test of cellulases using bagasse substrate on *Aspergillus niger* isolated from Clove field, Kare, Madiun. In: **AIP Conference Proceedings**. **AIP Publishing**, 2017. p. 020002.

ARJA, Miettinen-Oinonen. “Cellulases in the Textile Industry”. *Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications*, organizado por Julio Polaina e Andrew P. MacCabe, **Springer Netherlands**, 2007, p. 51–63.

ASEM, Dhaneshwaree et al. Evaluation of gastrointestinal bacterial population for the production of holocellulose enzymes for biomass deconstruction. **PloS one**, v. 12, n. 10, p. e0186355, 2017.

BAIRAGI, Sakshi; ROHTAK, H. Optimization of Cellulase Enzyme from Vegetable Waste by Using *Trichoderma atroviride* in Solid State Fermentation. **Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology**, v. 10, n. 5, p. 68-73, 2016.

BAUER, Michael W. et al. An endoglucanase, EglA, from the hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus* hydrolyzes β -1, 4 bonds in mixed-linkage (1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 4)- β -D-glucans and cellulose. **Journal of bacteriology**, v. 181, n. 1, p. 284-290, 1999.

BEHNAM, Sanaz, et al. “Cellulase Production Under Solid-State Fermentation by Ethanolic *Zygomycetes* Fungi: Application of Response Surface Methodology”. **Nutrition and Food Sciences Research**, vol. 6, no 1, janeiro de 2019, p. 27–34.

BISPO, A. S. R., et al. “UTILIZATION OF AGROINDUSTRIAL BY-PRODUCTS AS SUBSTRATE IN ENDOGLUCANASE PRODUCTION BY *Streptomyces Diastaticus* PA-01 UNDER SUBMERGED FERMENTATION”. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, vol. 35, no 2, junho de 2018, p. 429–40.

BISWAS, Pallavi et al. Wheat Bran as Substrate for Enzyme Production and its Application in the Bio-deinking of Mixed Office Waste (MOW) Paper. **BioResources**, v. 14, n. 3, p. 5788-5806, 2019.

BONUGLI-SANTOS et al, 2016. Enhanced textile dye decolorization by marine-derived basidiomycete *Peniophora* sp. CBMAI 1063 using integrated statistical design. **Environmental Science and Pollution Research**, 2016.

BRIENZO, Michel; ARANTES, Valdeir; MILAGRES, Adriane MF. Enzymology of the thermophilic ascomycetous fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Fungal biology reviews**, v. 22, n. 3-4, p. 120-130, 2008.

BUCHON, L. et al. Temperature dependence of extracellular enzymes production by psychrotrophic and psychrophilic bacteria. **Biotechnology Letters**, v. 22, n. 19, p. 1577-1581, 2000.

BUSK, Peter Kamp; LANGE, Lene. Cellulolytic potential of thermophilic species from four fungal orders. **AMB Express**, v. 3, n. 1, p. 47, 2013.

CARVALHAL, Fabiana; RODRIGUES, Suzana S. Rodrigues; BERCHEZ, Flávio A. S. Mata Atlântica. Projeto Ecossistemas Costeiros, Instituto de Biociências da USP, 2009. Disponível em: <http://www.ib.usp.br/ecosteiros/textos_educ/mata/index.htm> Acessado 06 de julho de 2019.

CHAKRABORTY, Subhojit, et al. “Chapter 17 - Cellulases: Application in Wine and Brewery Industry”. New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering, organizado por Vijai Kumar Gupta, **Elsevier**, 2016, p. 193–200.

CHAKRABORTY, Subhojit et al. Cost-effective production of cellulose hydrolysing enzymes from *Trichoderma* sp. RCK65 under SSF and its evaluation in saccharification of cellulosic substrates. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 39, n. 11, p. 1659-1670, 2016.

CARRASCO, Mario et al. Screening and characterization of amylase and cellulase activities in psychrotolerant yeasts. **BMC microbiology**, v. 16, n. 1, p. 21, 2016.

CHAPLIN, Martin: Carboxymethylcellulose (CMC), 2018. <http://www1.lsbu.ac.uk/water/carboxymethylcellulose.html>. Acessado 16 de dezembro de 2019.

CLIFFORD, Caroline Burgess. EGEE 439: Alternative Fuels from Biomass Sources, 6.3.2 Composition of Enzymes. John A. **Dutton e-Education Institute, Penn State's College of Earth and Mineral Sciences. Pennsylvania State University**. Disponível em <<https://www.e-education.psu.edu/egee439/node/670>>. Acessado 18 de septiembre de 2019.

DE MORAES, Sandra Lúcia et al. Cenário brasileiro da geração e uso de biomassa adensada. **Revista IPT: Tecnologia e Inovação**, v. 1, n. 4, 2017.

DEVI, Vidhya; SUMATHY, V. Judia Harriet. Production of biofertilizer from fruit waste. **European journal of pharmaceutical and medical research**, v. 4, n. 9, p. 436-443, 2017.

DING, Shi-You, et al. “Glycoside Hydrolase Gene Cluster of *Acidothermus cellulolyticus*”. Applications of Enzymes to Lignocellulosics, vol. 855, **American Chemical Society**, 2003, p. 332–60

DUNGANI, Rudi et al. Agricultural waste fibers towards sustainability and advanced utilization: a review. **Asian Journal of Plant Sciences**, v. 15, n. 1-2, p. 42-55, 2016.

DUNCAN, Shona M. et al. Endoglucanase-producing fungi isolated from Cape Evans historic expedition hut on Ross Island, Antarctica. **Environmental Microbiology**, v. 8, n. 7, p. 1212-1219, 2006.

DUQUE CASTAÑO, Diana Carolina. **Efecto de borde en hongos de un Bosque Atlántico Semidecíduo**. 2016. 52 páginas. Trabajo de Conclusión de Curso (Graduación en Ciencias Biológicas–Ecología y Biodiversidad) – Universidad Federal de Integración Latinoamericana, Foz do Iguaçu, 2016.

NAJEEB, El Mubarak Musa Tibin Musa, et al. Optimization of FPase activity using sorghum straw planted in malaysia by *aspergillus terreus* SUK-1 via solid substrate fermentation. **Biotechnology**, v. 14, n. 1, p. 23-28, 2015.

EFFIONG, T. E., et al. “Screening of fungi isolates from soil, pulp waste water and rotten wood for cellulase producing potentials”. **Journal of Applied Sciences and Environmental Management**, vol. 23, no 6, julho de 2019, p. 1051.

ELLILÄ, Simo et al. Development of a low-cost cellulase production process using *Trichoderma reesei* for Brazilian biorefineries. **Biotechnology for biofuels**, v. 10, n. 1, p. 30, 2017.

ESPARZA - NARANJO, Samantha Beatriz. **Biodegradación de la atrazina mediante hongos del Parque Nacional do Iguaçu**. 2018. 65 Trabajo de Conclusión de Carrera (Ciencias Biológicas – Ecología y Biodiversidad) – Universidad Federal de la Integración Latinoamericana, Foz do Iguaçu, 2018.

FELBER, A. C, et al. “Endoglucanase Production by Endophytic Fungi Isolated from *Vitis Labrusca* L. with Peanut Hull and Sawdust as Substrates”. **Bioscience Journal**, vol. 35, junho de 2019.

FEDERAÇÃO DAS INDÚSTRIAS DO ESTADO DO PARANÁ. Brazil - Parana - Fiepr - CIN PR - English. <http://www.fiepr.org.br/cinpr/english/brazil-parana-1-29935-279655.shtml>. Acessado 8 de dezembro de 2019.

FESTUCCI-BUSELLI, Reginaldo A., et al. “Structure, Organization, and Functions of Cellulose Synthase Complexes in Higher Plants”. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, vol. 19, no 1, março de 2007, p. 1–13.

FAOSTAT. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/GA>. Acessado 28 de novembro de 2019.

GETABALEW, M, e TEWODROS, A. “The Application of Biotechnology on Livestock Feed Improvement”. **Archives in Biomedical Engineering & Biotechnology**, 24 de maio de 2019

GUPTA, Praveen Kumar, et al. “An Update on Overview of Cellulose, Its Structure and Applications”. **Cellulose**, maio de 2019.

HALIMAH, N., et al. “Exploration of Cellulolytic Microorganism as A Biocatalyst Candidate for Liquid Fertilizer Production”. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, vol. 217, janeiro de 2019, p. 012021.

HAMMAD, A. I. et al. Enhanced production of cellulase (S) by *Aspergillus* spp. isolated from agriculture wastes by solid state fermentation. **American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science**, v. 8, n. 4, p. 402-410, 2010.

HAN, Wei; HE, Ming. The application of exogenous cellulase to improve soil fertility and plant growth due to acceleration of straw decomposition. **Bioresource technology**, v. 101, n. 10, p. 3724-3731, 2010.

HEIDORNE, Fernando O. et al. Characterization of hemicellulases and cellulases produced by *Ceriporiopsis subvermisporea* grown on wood under biopulping conditions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, n. 3-4, p. 436-442, 2006.

HOLBAN, A. M e GRUMEZESCU, A. M. *Advances in Biotechnology for Food Industry*. Academic Press. v 14, 2018.

HUANG, Yiwei et al. A highly acid-stable and thermostable endo- β -glucanase from the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. **Biochemical Journal**, v. 385, n. 2, p. 581-588, 2005.

IMRAN, Muhammad et al. Optimization of cellulase production from a novel strain of *Aspergillus Tubingensis* IMMIS2 through response surface methodology. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 12, p. 191-198, 2017.

IKE, Masakazu, e KEN Tokuyasu. “Cellulase Production of *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*) by Continuously Fed Cultivation Using Sucrose as Primary Carbon Source”. **Journal of Applied Glycoscience**, vol. 65, no 4, 2018, p. 51–56.

IMRAN, Muhammad, et al. "Cellulase Production from Species of Fungi and Bacteria from Agricultural Wastes and Its Utilization in Industry: A Review". **Advances in Enzyme Research**, vol. 4, no 2, maio de 2016, p. 44–55

INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY. **EC 3. Hydrolase Nomenclature**. School of Biological and Chemical Sciences, Queen Mary, University of London, Mile End Road, London. Disponível em <<https://www.qmul.ac.uk/sbcs/iubmb/enzyme/EC3/>> Acessado 22 de outubro de 2019.

IRE, F. S; OKOLI, A. O; EZEBUIRO, V. Production and optimization of cellulase from *Penicillium* sp. using corn-cob and pawpaw fibre as substrates. **Journal of Advances in Microbiology**, v. 8, p. 1-10, 2018.

ISAAC, George Saad; ABU-TAHON, Medhat Ahmed. Enhanced alkaline cellulases production by the thermohalophilic *Aspergillus terreus* AUMC 10138 mutated by physical and chemical mutagens using corn stover as substrate. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 4, p. 1269-1277, 2015.

JAIN, Kavish Kumar et al. Improved production of thermostable cellulase from *Thermoascus aurantiacus* RCKK by fermentation bioprocessing and its application in the hydrolysis of office waste paper, algal pulp, and biologically treated wheat straw. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 181, n. 2, p. 784-800, 2017.

JECU, Luiza. Solid state fermentation of agricultural wastes for endoglucanase production. **Industrial Crops and Products**, v. 11, n. 1, p. 1-5, 2000.

JAYASEKARA, Sandhya, e RENUKA Ratnayake. "Microbial Cellulases: An Overview and Applications". **Cellulose**, abril de 2019.

JUTURU, Veeresh, e JIN Chuan Wu. "Microbial cellulases: Engineering, production and applications". **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, vol. 33, maio de 2014, p. 188–203.

KANNAHI, M.; ELANGESWARI, S. Enhanced production of cellulase on different fruit peel under submerged fermentation. **Int J Pharm Sci Rev Res**, v. 32, n. 2, p. 161-165, 2015.

KARMAKAR, M. et al. Current trends in research and application of microbial cellulases. **Res J Microbiol**, v. 6, n. 1, p. 41-53, 2011.

KARMAKAR, Moumita; RAY, Rina Rani. A statistical approach for optimization of simultaneous production of β -glucosidase and endoglucanase by *Rhizopus oryzae* from solid-state fermentation of water hyacinth using central composite design. **Biotechnology research international**, v. 2011, 2011.

KAUR, Prabhjot, et al. "Lignocellulosic Waste as A Sole Substrate for Production of Crude Cellulase From *Bacillus Subtilis* PJK6 Under Solid State Fermentation Using Statistical Approach". **Journal of Carbohydrates**, vol. 1, no 1, dezembro de 2018, p. 1.

KIIO, Irene K. et al. Isolation and Characterization of a Thermostable Cellulase from *Bacillus licheniformis* Strain Vic Isolated from Geothermal Wells in the Kenyan Rift Valley. **The Open Biotechnology Journal**, v. 10, n. 1, 2016.

KIM, Young Jun et al. Phenolic extraction from apple peel by cellulases from *Thermobifida fusca*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 24, p. 9560-9565, 2005.

KITTANAN, Thammaratchai et al. Uses of Copra Waste and Wheat Bran for Cellulase Production by *Trichoderma reesei* in Solid State Fermentation. **In: Proceedings of the 2018 8th International Conference on Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics**. ACM, 2018. p. 56-59.

KLYOSOV, A. A. “Trends in biochemistry and enzymology of cellulose degradation”. **Biochemistry**, vol. 29, no 47, novembro de 1990, p. 10577–85.

KUMAR, Bikash et al. Production, purification and characterization of an acid/alkali and thermo tolerant cellulase from *Schizophyllum commune* NAIMCC-F-03379 and its application in hydrolysis of lignocellulosic wastes. **AMB Express**, v. 8, n. 1, p. 173, 2018.

KUNAMNENI, Adinarayana. “Chapter 23 - Cellulase in Biomedical Research”. New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering, organizado por Vijai Kumar Gupta, **Elsevier**, 2016, p. 267–75.

LADEIRA, Silvania A., et al. “Cellulase production by thermophilic *Bacillus* sp. SMIA-2 and its detergent compatibility”. **Electronic Journal of Biotechnology**, vol. 18, no 2, março de 2015, p. 110–15.

LEE, Kwang-Min, e DAVID F. Gilmore. “Statistical Experimental Design for Bioprocess Modeling and Optimization Analysis”. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, vol. 135, no 2, novembro de 2006, p. 101–15.

LEE, C. K.; DARAHA, I.; IBRAHIM, C. O. Production and optimization of cellulase enzyme using *Aspergillus niger* USM AI 1 and comparison with *Trichoderma reesei* via solid state fermentation system. **Biotechnology research international**, v. 2011, 2011.

LEO, Vincent Vineeth, et al. “Chapter 4 - Microorganisms as an Efficient Tool for Cellulase Production: Availability, Diversity, and Efficiency”. New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering, organizado por Neha Srivastava et al., **Elsevier**, 2019, p. 45–61.

LEO, Vincent V. et al. A novel triculture system (CC3) for simultaneous enzyme production and hydrolysis of common grasses through submerged fermentation. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 447, 2016.

LIBARDI, Nelson, et al. “Domestic wastewater as substrate for cellulase production by *Trichoderma harzianum*”. **Process Biochemistry**, vol. 57, junho de 2017, p. 190–99.

LIM, Soh-Fong, e SYLVESTER Usan Matu. “Utilization of Agro-Wastes to Produce Biofertilizer”. **International Journal of Energy and Environmental Engineering**, vol. 6, no 1, março de 2015, p. 31–35.

LIU, Xiangyang, e CHANDRAKANT Kokare. “Chapter 11 - Microbial Enzymes of Use in Industry”. *Biotechnology of Microbial Enzymes*, organizado por Goutam Brahmachari, **Academic Press**, 2017, p. 267–98.

MA, Li et al. Characterization of an acidic cellulase produced by *Bacillus subtilis* BY-4 isolated from gastrointestinal tract of Tibetan pig. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 56, p. 67-72, 2015.

MACHUCA, Angela; FERRAZ, André. Hydrolytic and oxidative enzymes produced by white- and brown-rot fungi during *Eucalyptus grandis* decay in solid medium. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, n. 6-7, p. 386-391, 2001.

MAHAJAN, Chhavi et al. *Malbranchea cinnamomea*: a thermophilic fungal source of catalytically efficient lignocellulolytic glycosyl hydrolases and metal dependent enzymes. **Bioresource technology**, v. 200, p. 55-63, 2016.

MANDENIUS, Carl-Fredrik, e ANDERS Brundin. “Bioprocess Optimization Using Design-of-Experiments Methodology”. **Biotechnology Progress**, vol. 24, no 6, 2008, p. 1191–203.

MARZO, C., et al. “Valorization of Agro-Industrial Wastes to Produce Hydrolytic Enzymes by Fungal Solid-State Fermentation”. **Waste Management & Research**, vol. 37, no 2, fevereiro de 2019, p. 149–56.

MOJISOV, K. D. “Chapter 16 - Aspergillus Enzymes for Food Industries”. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*, organizado por Vijai Kumar Gupta, **Elsevier**, 2016, p. 215–22.

MRUDULA, Soma; MURUGAMMAL, Rangasamy. Production of cellulase by *Aspergillus niger* under submerged and solid state fermentation using coir waste as a substrate. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 1119-1127, 2011.

MURAD, H. A., e H. H. Azzaz. “Cellulase and Dairy Animal Feeding”. **Biotechnology (Faisalabad)**, vol. 9, no 3, março de 2010, p. 238–56.

MURRAY, Patrick G. et al. Isolation and characterization of a thermostable endo- β -glucanase active on 1, 3-1, 4- β -D-glucans from the aerobic fungus *Talaromyces emersonii* CBS 814.70. **Enzyme and microbial technology**, v. 29, n. 1, p. 90-98, 2001.

NARASIMHA, G.; REDDI PRADEEP, M.; SRIDEVI, A. Chemical Pretreatment of Agricultural Feedstock for Enhanced Production of Cellulase by Mutant Fungus. **Aspergillus Niger. J Appl Biotechnol Bioeng**, v. 1, n. 1, p. 00004, 2016.

NOVOZYMES. *Novozymes: Quality Environmentally-Friendly Enzymes*, 2018. Página inicial. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/life-science/biochemicals/biochemical-products.html?TablePage=14572954>> Acesado em: 10 outubro de 2019.

NUNES, Carlos Simões. “Chapter 6 - Depolymerizing enzymes—cellulases”. *Enzymes in Human and Animal Nutrition*, organizado por Carlos Simões Nunes e Vikas Kumar, **Academic Press**, 2018, p. 107–32.

NUNEZ, Eutimio Gustavo Fernandez et al. Using statistical tools for improving bioprocesses. **Asian Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 1-20, 2013.

OGEDA, Thais Lucy, e DENISE F. S. Petri. “Hidrólise Enzimática de Biomassa”. **Química Nova**, vol. 33, no 7, 2010, p. 1549–58.

OLIVEIRA, Sérgio Dantas, et al. “Utilization of agroindustrial residues for producing cellulases by *Aspergillus fumigatus* on Semi-Solid Fermentation”. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, vol. 6, no 1, fevereiro de 2018, p. 937–44.

PANCHAPAKESAN, Arun, e NAVEEN Shankar. “Chapter 2 - Fungal Cellulases: An Overview”. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*, organizado por Vijai Kumar Gupta, **Elsevier**, 2016, p. 9–18.

PASSARI, Ajit Kumar et al. Detection of biosynthetic gene and phytohormone production by endophytic actinobacteria associated with *Solanum lycopersicum* and their plant-growth-promoting effect. **Research in microbiology**, v. 167, n. 8, p. 692-705, 2016.

PAUL, Pandeeti Emmanuel Vijay, et al. “Chapter 9 - Emerging Trends in the Industrial Production of Chemical Products by Microorganisms”. *Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry*, organizado por Viswanath Buddolla, **Academic Press**, 2019, p. 107–25.

PATSIOS, S. et al. Characterisation of agricultural waste co-and by-products. **AGROCYCLE Project**, 2016.

PRASAD, Pinky; SINGH, Tanuja; BEDI, Sheila. Characterization of the cellulolytic enzyme produced by *Streptomyces griseorubens* (Accession No. AB184139) isolated from Indian soil. **Journal of King Saud University-Science**, v. 25, n. 3, p. 245-250, 2013.

RAY, R. R. Microbial Avicelase: and Overview. **Bull. Env Pharmacol Life Sci**, v. 4, n. 4, p. 03-13, 2015.

RAVINDRAN, Rajeev, et al. “A Review on Bioconversion of Agro-Industrial Wastes to Industrially Important Enzymes”. **Bioengineering (Basel, Switzerland)**, vol. 5, no 4, outubro de 2018.

ROCHA. V. A. L, et al. “Sugarcane bagasse as feedstock for cellulase production by *Trichoderma harzianum* in optimized culture medium”. **Electronic Journal of Biotechnology**, vol. 16, no 5, setembro de 2013, p. 1–1.

ROJO, R., et al. “Influence of Cellulase Addition to Dairy Goat Diets on Digestion and Fermentation, Milk Production and Fatty Acid Content”. **The Journal of Agricultural Science**, vol. 153, no 8, novembro de 2015, p. 1514–23.

RONG, Yanjun et al. A carboxymethyl cellulase from a marine yeast (*Aureobasidium pullulans* 98): Its purification, characterization, gene cloning and carboxymethyl cellulose digestion. **Journal of Ocean University of China**, v. 14, n. 5, p. 913-921, 2015.

RUTTERSMITH, Leon D.; DANIEL, Roy M. Thermostable cellobiohydrolase from the thermophilic eubacterium *Thermotoga* sp. strain FjSS3-B. 1. Purification and properties. **Biochemical Journal**, v. 277, n. 3, p. 887-890, 1991.

RUEGGER, Marcelo JS; TAU-K-TORNISIELO, Sâmia M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Brazilian Journal of Botany**, p. 205-211, 2004.

SALAMUNI, R. et al. Parque Nacional do Iguaçu, PR - Cataratas de fama mundial. In: SCHOBENHAUS, C. et al. C. **Sítios Geológicos e Paleontológicos do Brasil**. 1. ed. Brasília, DNPM/CPRM - Comissão Brasileira de Sítios Geológicos e Paleobiológicos (SIGEP), 2002. p. 313-321. Disponível: <http://sigep.cprm.gov.br/sitio011/sitio011.htm>. Acessado 6 de julho de 2019.

SADH, Pardeep Kumar, et al. “Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review”. **Bioresources and Bioprocessing**, vol. 5, no 1, janeiro de 2018, p. 1.

SANQUETTA, Carlos Roberto et al. Biomass and carbon in non-woody vegetation, dead wood and litter in Iguaçu National Park. **Floresta**, v. 44, n. 2, p. 185-194, 2014

SANTA-ROSA, Pamella S., et al. “Production of thermostable β -glucosidase and CMCCase by *Penicillium* sp. LMI01 isolated from the Amazon region”. **Electronic Journal of Biotechnology**, vol. 31, janeiro de 2018, p. 84–92.

SHARADA, R. et al. APPLICATIONS OF CELLULASES-REVIEW. International Journal of Pharmaceutical, **Chemical & Biological Sciences**, v. 4, n. 2, 2014.

SHARMA, Abha, et al. “Chapter 2 - Cellulose as Potential Feedstock for Cellulase Enzyme Production: Versatility and Properties of Various Cellulosic Biomasses”. New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering, organizado por Neha Srivastava et al., **Elsevier**, 2019, p. 11–27.

SHERIEF, A.A., EL-TANASH, A.B., ATIA, N., 2010. Cellulase production by *Aspergillus fumigatus* grown on mixed substrate of rice straw and wheat bran. **Res. J. Microbiol.** 5, 199–211.

SILVA, H. N. L., et al. “CELLULASE PRODUCTION BY *Bacillus subtilis*”. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, vol. 1, 2018, p. 3434–37.

SINGH, Shalini, et al. “Chapter 13 - Cellulase in Pulp and Paper Industry”. New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering, organizado por Vijai Kumar Gupta, Elsevier, 2016, p. 152–62.

SINGH, Surender et al. Production, optimization and evaluation of multicomponent holocellulase produced by *Streptomyces* sp. ssr-198. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 45, n. 5, p. 2379-2386, 2014.

SIMIC, Kristina; SOLJACIC, Ivo; PUSIC, Tanja. Application of Cellulases in the Process of Finishing. **Tekstilec**, v. 58, n. 1, p. 47-56, 2015.

SINGHANIA, Reeta R., et al. “4 - Cellulases”. Current Developments in Biotechnology and Bioengineering, organizado por Ashok Pandey et al., **Elsevier**, 2017, p. 73–101.

SIQUEIRA, G, et al. “Limitation of cellulose accessibility and unproductive binding of cellulases by pretreated sugarcane bagasse lignin”. **Biotechnology for Biofuels**, vol. 10, no 1, julho de 2017, p. 176.

SIU-RODAS, Yadira, et al. “Bacillus subtilis with endocellulase and exocellulase activities isolated in the thermophilic phase from composting with coffee residues”. **Revista Argentina de Microbiología**, vol. 50, no 3, julho de 2018, p. 234–43.

SOARES, Juliana Ferreira, et al. “Chapter 18 - Cellulases for Food Applications”. New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering, organizado por Vijai Kumar Gupta, **Elsevier**, 2016, p. 201–08.

SOHAIL, Muhammad et al. Cellulase production from *Aspergillus niger* MS82: effect of temperature and pH. **New Biotechnology**, v. 25, n. 6, p. 437-441, 2009.

SOUZA, Ronan Felipe de, et al. “FITOSSOCIOLOGIA DA VEGETAÇÃO ARBÓREA DO PARQUE NACIONAL DO IGUAÇU”. **Ciência Florestal**, vol. 27, no 3, setembro de 2017, p. 853–69.

SOUZA, Samuel NM de; SORDI, Alexandre; OLIVA, Carlos A. Potencial de energia primária de resíduos vegetais no Paraná: 4º Encontro de Energia no Meio Rural. Proceedings of the 4th Encontro de Energia no Meio Rural, 2002.

SRIVASTAVA, Neha, et al. “Applications of fungal cellulases in biofuel production: Advances and limitations”. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, vol. 82, fevereiro de 2018, p. 2379–86.

S, SAJITH, et al. “An Overview on Fungal Cellulases with an Industrial Perspective”. **Journal of Nutrition & Food Sciences**, vol. 6, no 1, 2016, p. 1–13.

SUN, Hai-Yan et al. Banana peel: A novel substrate for cellulase production under solid-state fermentation. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 77, p. 17887-17890, 2011.

TIWARI, Rameshwar et al. Two-step statistical optimization for the production of cold active β -glucosidase from *Pseudomonas lutea* BG8 and its application to improve saccharification of rice straw. **Biotechnology and applied biochemistry**, v. 63, n. 5 p. 659-668, 2016.

TIWARI, Rameshwar et al. Bioprospecting of novel thermostable β -glucosidase from *Bacillus subtilis* RA10 and its application in biomass hydrolysis. **Biotechnology for biofuels**, v. 10, n. 1, p. 246, 2017.

VÁZQUEZ-MONTOYA, Elva Lorena, et al. “Moringa Straw as Cellulase Production Inducer and Cellulolytic Fungi Source”. **Revista Argentina de Microbiología**, junho de 2019.

VINOD Kumar, N., et al. “Paper pulp modification and deinking efficiency of cellulase-xylanase complex from *Escherichia coli* SD5”. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. 111, maio de 2018, p. 289–95.

WAING, Kgd. “Molecular identification of leaf litter fungi potential for cellulose degradation”. **Mycosphere**, vol. 6, no 2, 2015, p. 139–44.

WANG, Meimei, et al. “Modification of Different Pulps by Homologous Overexpression Alkali-Tolerant Endoglucanase in *Bacillus Subtilis* Y106”. **Scientific Reports**, vol. 7, no 1, junho de 2017, p. 1–10.

WILSON, David B. “Chapter 5 - Microbial Diversity and Cellulase Production”. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*, organizado por Vijai Kumar Gupta, **Elsevier**, 2016, p. 43–48.

WINGER, Moritz, et al. “On the Conformational Properties of Amylose and Cellulose Oligomers in Solution”. **International Journal of Carbohydrate Chemistry**, vol. 2009, 2009, p. 1–8

YAN, Shigan, et al. “Isolation, identification and cellulase-producing condition optimization of *Bacillus subtilis* Q3 strain”. **AIP Conference Proceedings**, vol. 2110, no 1, junho de 2019, p. 020004.

YOON, Li Wan, et al. “Process intensification of cellulase and bioethanol production from sugarcane bagasse via an integrated saccharification and fermentation process”. **Chemical Engineering and Processing - Process Intensification**, vol. 142, agosto de 2019, p. 107528.

YOPI, Y. et al. Cellulase and xylanase production from three isolates of indigenous endophytic fungi. In: **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**. IOP Publishing, 2017. p. 012035.

YU, Hui-Ying; LI, Xin. Alkali-stable cellulase from a halophilic isolate, *Gracilibacillus* sp. SK1 and its application in lignocellulosic saccharification for ethanol production. **Biomass and Bioenergy**, v. 81, p. 19-25, 2015.

ZHAO, Chen et al. Efficient bioethanol production from sodium hydroxide pretreated corn stover and rice straw in the context of on-site cellulase production. **Renewable energy**, v. 118, p. 14-24, 2018.

ZHANG, Xiao-Zhou, e YI-HENG Percival Zhang. “Cellulases: Characteristics, Sources, Production, and Applications”. **Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers**, John Wiley & Sons, Ltd, 2013, p. 131–46.