

ACTIVIDAD HOLOCELULASA DE BASIDIOMICETOS CON POTENCIAL PARA PROCESOS DE BIOCONVERSIÓN

Salazar Ruiz Carmen Melisa, Arboleda Valencia Jorge William, Betancur Jhon Fredy

Universidad de Manizales

RESUMEN

Los residuos lignocelulósicos constituyen el recurso renovable más importante que existe y está conformado en su mayoría por celulosa la cual es degradada principalmente por hongos Basidiomicetos. Actualmente algunos residuos son utilizados para la generación de productos de interés biotecnológico como los biocombustibles, disolventes como butanol entre otros. En Colombia existen pocos estudios relacionados con la diversidad microbiana y su asociación con la degradación de la madera y no se han explorado las aplicaciones que se derivan de la riqueza microbiana involucrada en estos procesos, a través de la aplicación de la Biotecnología. El objetivo de este trabajo es caracterizar mediante actividad enzimática la producción de holocelulasas de hongos provenientes del bosque húmedo a partir de residuos agrícolas para procesos de bioconversión del cacao. Se evaluaron 41 cepas cualitativamente mediante la absorbancia de la prueba de DNS, determinando la relación de azúcares reductores presentes en las muestras como resultado de la degradación de celulosa contenida en cacao.

Se seleccionaron hongos basidiomicetos con la mayor actividad holocelulasa encontrando como resultado máxima actividad enzimática para CMCasa producida por *LK25* con 8,8 UI/mL, en FPasas las cepas *M1*, *A7*, *A18*, *LK17* y *A11* presentaron valores significativos de 12.5, 12.0, 11.6 y 11.0 UI/mL respectivamente, en la actividad Xilanasas las cepas *LK25*, *RIO3* y *RIO5* presentaron rendimientos de 1.9, 3.4 y 1.5 UI/mL respectivamente y la actividad β -glucosidasa en *A14*, *RIO1* y *RIO4* presentaron rendimientos de 2.6, 2.7 y 3.1 UI/mL respectivamente.

Los resultados sugieren que el hongo *LK25* presentó los mayores valores de actividad CMCasa y Xilanasas. Sin embargo, mostró baja actividad para Fpasa y β -glucosidasa, entre tanto los hongos *RIO1*, *RIO3*, *RIO4* y *RIO5* mostraron los mayores niveles de actividad Xilanasas y β -glucosidasa con rangos entre 1.5 y 3.4 UI/mL.

El presente trabajo permitió seleccionar las cepas *LK25*, *M1*, *A7*, *A18*, *LK17*, *A11*, *RIO1*, *RIO3*, *RIO4*, *RIO5* y *A14* las cuales tienen un alto potencial para ser incorporados en procesos de bioconversión.

INTRODUCCIÓN

La lignocelulosa es la principal estructura que constituye las plantas y representa la principal fuente de materia orgánica renovable de la tierra. Se puede encontrar en la pared celular, y se compone de celulosa, hemicelulosa y lignina, además de ácidos orgánicos, sales y minerales (Hamelinck et al, 2005).

Estos residuos son sustratos para el crecimiento de hongos filamentosos, que producen enzimas celulolíticas, hemicelulolíticas y ligninolíticas por fermentación en estado sólido (SSF). Estos hongos son considerados los organismos mejor adaptados para la SSF, ya que sus hifas pueden crecer en la superficie de las partículas (Santos et al., 2004). Los hongos filamentosos son los más distinguidos productores de enzimas implicadas en la degradación de material lignocelulósico.

Los hongos tienen la facilidad de colonizar rápidamente el sustrato produciendo diferentes complejos enzimáticos, entre ellos el complejo enzimático celulasa, que interviene en la descomposición de la celulosa; el complejo está constituido por tres tipos de enzima; endoglucanasas, exoglucanasas y beta glucosidasas; que actúan sinérgicamente en la degradación de la celulosa liberando moléculas de glucosa (Hernández et al., 1999).

La degradación microbiana de la biomasa lignocelulósica se lleva a cabo mediante la acción de varias enzimas, de las cuales las más importantes son las celulasas, en este proceso las endoglucanasas cortan aleatoriamente los sitios internos amorfos de las cadenas polisacáridas de celulosa, generando oligosacáridos de varias longitudes y por tanto se presentan algunas cadenas cortas (L. R. Lynd, 1996). Exoglucanasas actúan sobre las terminales reductoras y no reductoras de las cadenas de celulosa liberando tanto glucosa (glucanohidrolasas) o celobiosa (celobiohidrolasas) como los principales productos. Las exoglucanasas pueden actuar también sobre la estructura microcristalina de las cadenas. (J. Sheehan, M.E Himmel.1999).

Algunos estudios relacionados con el uso potencial de enzimas para la degradación de los materiales lignocelulósicos, se han enfocado en la liberación de azúcares fermentables que se pueden convertir en etanol de segunda generación por la acción de los microorganismos fermentativos (Buaban et al, 2010; Talebnia et al, 2010). Entre los residuos lignocelulósicos destinados a la producción de etanol se pueden nombrar; cascarilla de arroz, salvado de trigo, cascarilla de trigo, aserrín, cacao, paja de maíz y bagazo de la caña de azúcar (Binod et al, 2010). Estos residuos constituyen una fuente de energía renovable y abundante, y no afectan la disponibilidad de alimentos. Además, pueden utilizarse como alimentos para animales y productos químicos. (Medina, D. A. P., Nuñez, M. F. A., &Ordoñez, M. S. 2010)

La importancia de emplear el residuo lignocelulósico del cacao en procesos de actividad enzimática, se debe a que en la producción del cacao se generan grandes volúmenes de residuos, quedando estos acumulados en el cultivo y generando problemas ambientales como la propagación de microorganismos patógenos, además de esto, la forma cóncava

de las cáscaras partidas propician la multiplicación de insectos, lo que causa pérdidas económicas de la actividad cacaotera (Ortíz Valbuena, K. L. 2013).

La tasa de descomposición del tronco depende del contenido de lignina, celulosa y hemicelulosa, la actividad enzimática determina el estado de descomposición de este (Chaparro Sosa, Rosas Wanumen., 2006) Existe poca evidencia acerca de la diversidad microbiana asociada a la degradación de la madera, además de no haberse explorado las aplicaciones que resultan de los procesos biotecnológicos. Por otra parte, se destaca que el bosque subandino ha sido transformado fuertemente por el hombre al sobreexplotar sus suelos, desconociendo la funcionalidad de los hongos presentes en este tipo de bosque. Por tal razón el objetivo de este trabajo es caracterizar mediante actividad enzimática la producción de holocelulasas de hongos provenientes del bosque húmedo a partir de residuos agrícolas para procesos de bioconversión del cacao.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de Estudio

El estudio se realizó en fragmentos del bioma bosque muy húmedo premontano bajo, del municipio de Manizales a una altitud de 2.153 msnm en las coordenadas (5°04'20"N 75°25'10"O 5°06'15"N 75°33' 10"O). Los residuos del cultivo de cacao (*Theobroma cacao*) fueron recolectados en fincas localizadas alrededor de Manizales.

Material Biológico

Las muestras de los hongos basidiomicetos fueron tomados aleatoriamente de troncos caídos de diferentes zonas de estudio, teniendo en cuentas la época de lluvias. Los hongos colectados, fueron limpiados en su exterior con solución salina para eliminar partículas en su superficie, se almacenaron en bolsas de cierre hermético debidamente rotuladas. Finalmente fueron transportadas al laboratorio de Biología Molecular de la Universidad de Manizales.

Aislamiento y purificación

Para el aislamiento se tomaron los hongos previamente desinfectados y posteriormente se sembró una porción de cada uno por medio de punción en el centro del plato, en cajas de Petri con agar SDA. Las cajas se llevaron a incubar a 30°C hasta obtener crecimiento.

Posteriormente se tomó un trozo de cada hongo del medio SDA y se sembró en un medio de cacao sin suplementos y se dejaron a temperatura ambiente (18-22°C), durante 10 días (Figura 1). Una vez crecidos los hongos en el medio de cacao se procede a realizar los extractos, tomando cada hongo y diluyéndolos en agua destilada estéril en porciones

1:1, el extracto obtenido fue filtrado con una gasa estéril para finalmente recolectarlos en tubos falcon de 15 ml.

Obtención de extractos enzimáticos.

La actividad holocelulasa de las enzimas carboximetilcelulosa (CMCasa), Fpasa, Xilanasa y β -glucosidasa fueron determinadas mediante el método DNS siguiendo la metodología de Siqueira F.G 2010.

50 μ l del extracto de la muestra se mezclaron con 100 μ l de CMC al 1%, se incubó a 50°C durante 30 minutos posterior a esto se adicionaron 300 μ l de DNS y se colocó a 96°C durante 10 minutos. Para la actividad enzimática (FPasa), se tomó 20 μ l del extracto enzimático adicionándolo a cada pozo que contenía papel de filtro (Whatman N° 1) y 40 μ l de buffer pH 5, se incubó a 50°C durante 1 hora, posterior a esto se añadió 120 μ l de DNS y se incubó a 100°C durante 10 minutos. La actividad enzimática se expresó como μ mol de azúcar reductor por minuto en ml de solución de enzima, es decir, como IU ml⁻¹. La glucosa, se utilizó como patrón estándar. Las reacciones se realizaron por triplicado para cada ensayo (figura 3).

Las mediciones se realizaron teniendo en cuenta la cantidad de azúcares reductores que fueron liberados mediante la actividad enzimática a 540nm utilizando un espectrofotómetro MultiScanGo (Figura 4).

Análisis Estadístico.

El análisis de los resultados se determinó con un nivel de significancia de 0,05, las pruebas se realizaron por triplicado. Los datos se compararon mediante análisis unidireccional de varianza seguido por el test de Tukey. El análisis descriptivo, distribución normal, homogeneidad de la varianza, diferencia entre los tratamientos y las enzimas se realizaron con SPSS (versión 17.0) para Windows (SPSS, Inc., Chicago, IL).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La determinación de la cantidad de azúcares reductores producidas por cada enzima se realizó mediante el método de DNS. De acuerdo al análisis estadístico se encontró diferencias estadísticamente significativas $p < 0,05$ entre los hongos evaluados y las tasas de producción de las actividades CMCasa, FPasa, Xilanasa y β -glucosidasa.

Las figuras 1 muestra los valores de actividad de las diferentes enzimas celulasas para las cepas estudiadas, en CMCasa se presenta un pico de actividad producida por LK25 con 8,8 UI/mL (figura 1), las demás cepas presentaron una actividad homogénea; en FPasa las cepas M1, A7, A18, LK17 y A11 presentaron actividad de 12.5, 12.0, 11.6 y

11.0 UI/mL respectivamente, la actividad Xilanasa de las cepas LK25, RIO3 y RIO5 presentaron rendimientos de 1.9, 3.4 y 1.5UI/mL respectivamente y finalmente la actividad β -glucosidasa para A14, RIO1 y RIO4 presentó rendimientos de 2.6, 2.7 y 3.1UI/mL respectivamente.

Figura1. Actividad Enzimática de CMCasas a partir de Cacao, durante 10 días

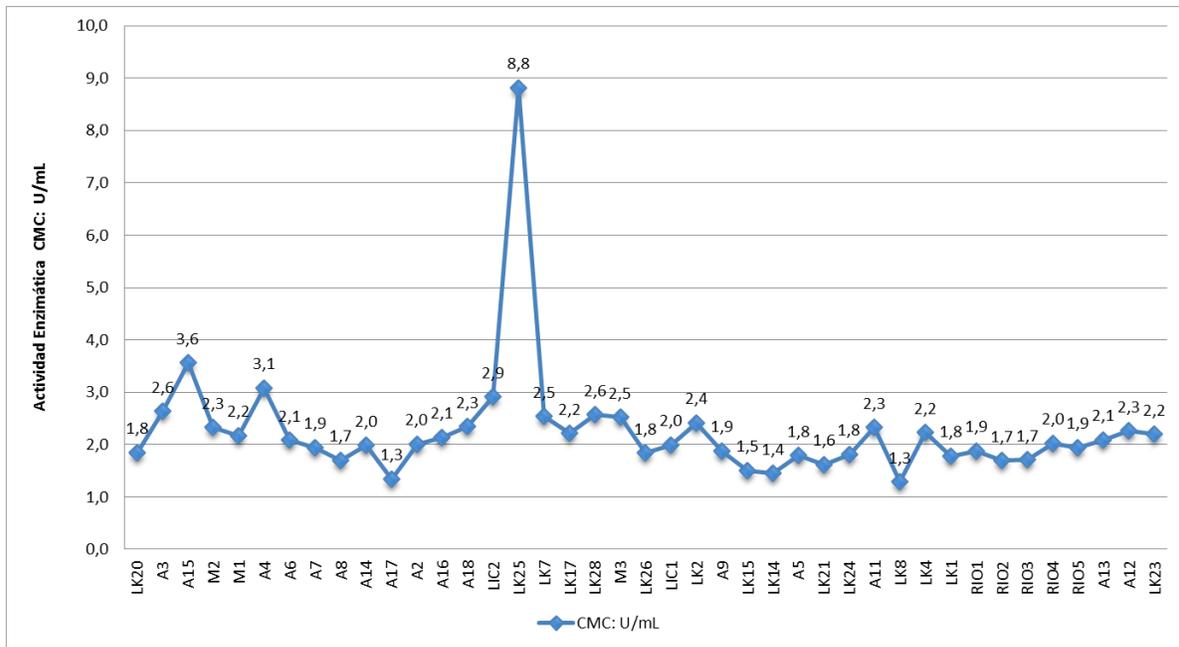


Figura 2. Actividad Enzimática de Fpsas a partir de Cacao, durante 10 días

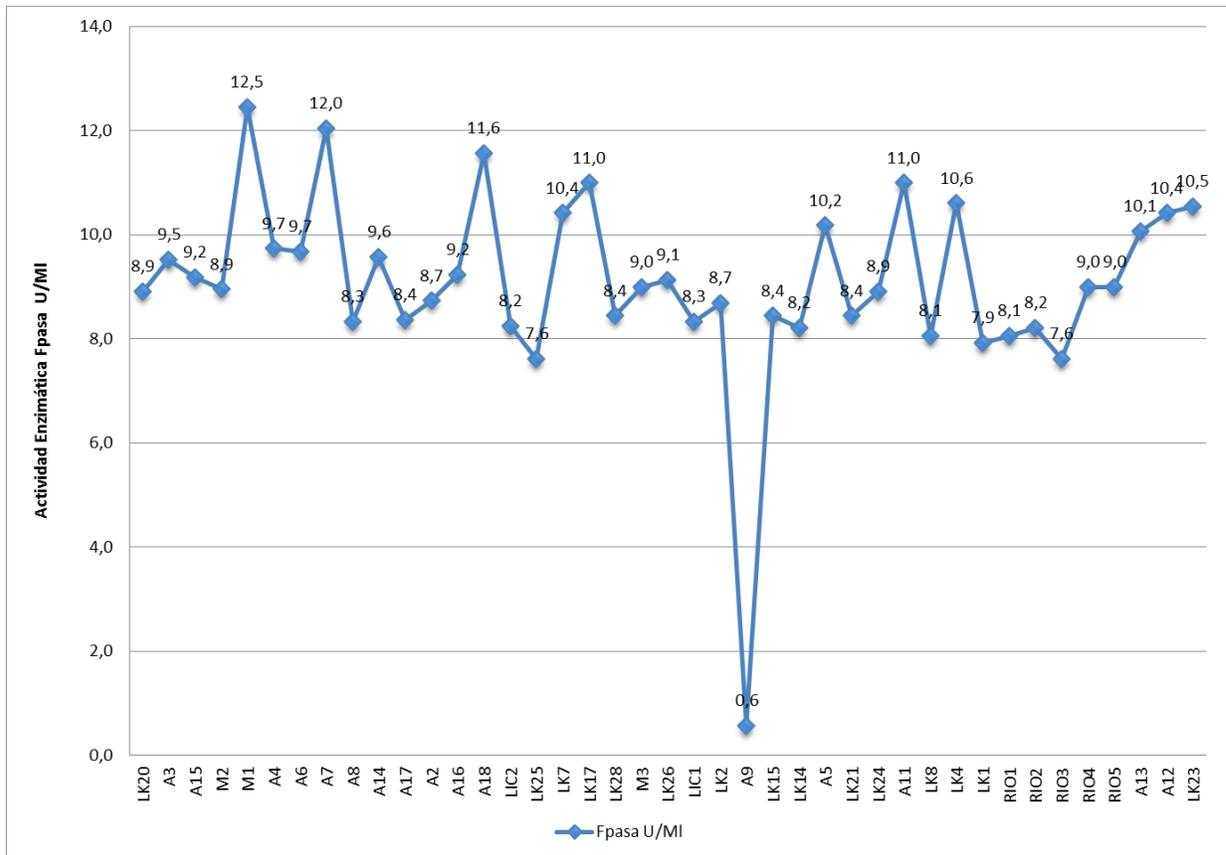


Figura3. Actividad Enzimática de Xilanas a partir de Cacao, durante 10 días

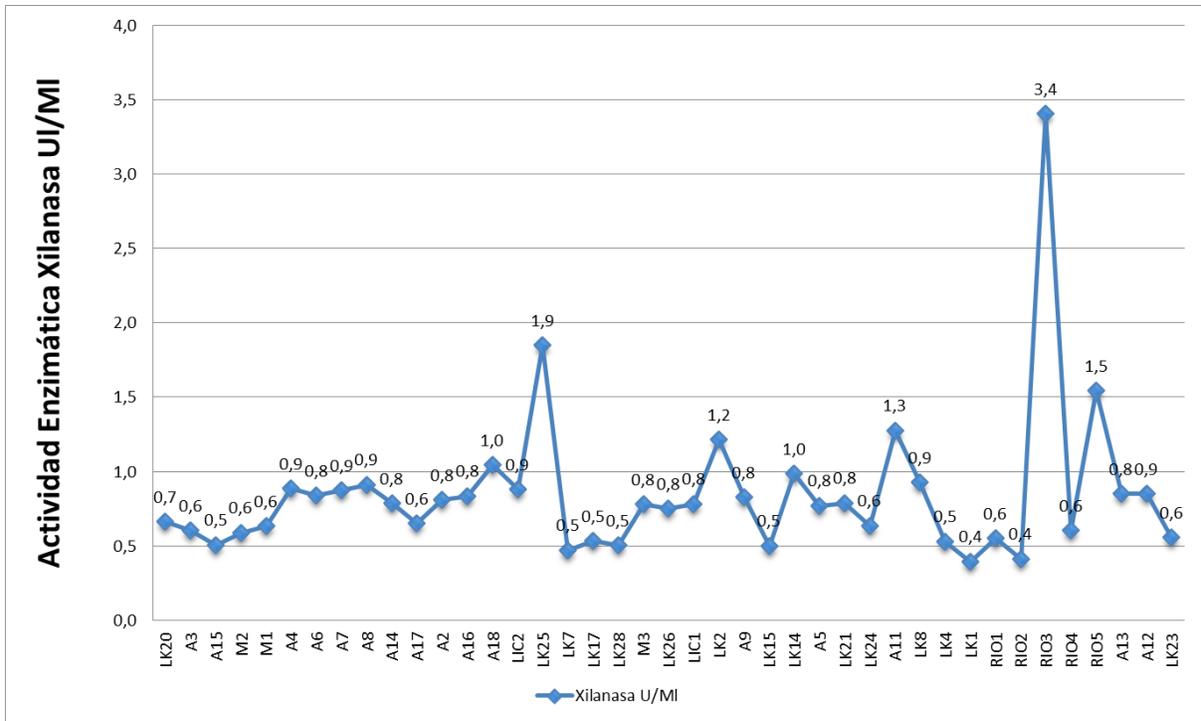
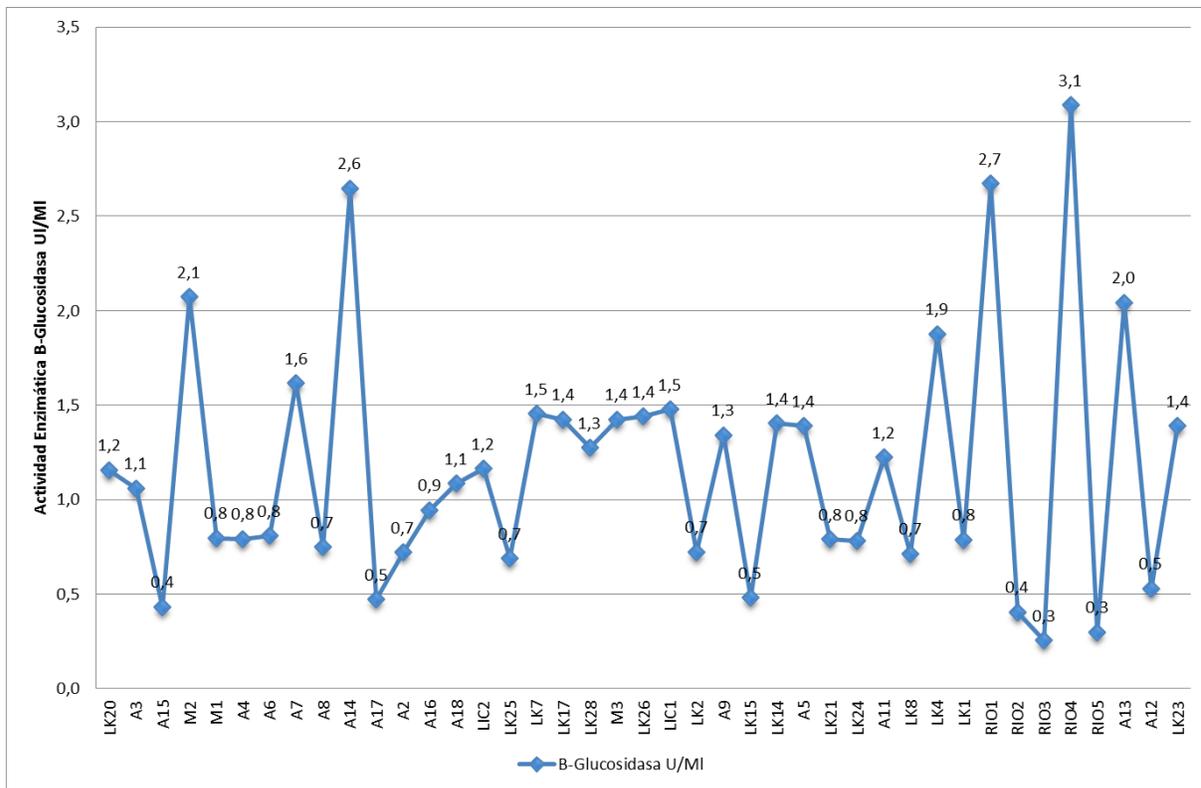


Figura 4. Actividad Enzimática de β - glucosidasa a partir de Cacao, durante 10 días



Al analizar las figuras 1, 2, 3 y 4 de las enzimas versus la actividad enzimática generada para CMCasa, FPasa, Xilanasas y β -glucosidasa se observa buena actividad para FPasa en la mayoría de las enzimas respecto a las demás enzimas.

El hongo *LK25* presentó los mayores valores de actividad CMCasas y Xilanasas. Sin embargo, mostró baja actividad para FPasa y β -glucosidasa, entre tanto los hongos RIO1, RIO3, RIO4 y RIO5 mostraron los mayores niveles de actividad Xilanasas y β -glucosidasa con rangos entre 1.5 y 3.4 UI/mL.

Informes experimentales en la producción de celulasas mediante el cultivo de un determinado hongo "*Trichoderma viride*" sobre racimos vacíos de palma de aceite muestran mayores actividades celulolíticas en cultivos realizados con pretratamiento biológico (precultivo de *Pleurotus ostreatus*) y NaNO_3 como fuente de nitrógeno, con valores de 0,374 U/mL de FPasa y 0,776 U/mL de CMCasa; la actividad enzimática de endoglucanasas y exoglucanasas producidas por el hongo aislado son bajas, comparadas con las obtenidas en otros estudios. Estos resultados muestran que la actividad enzimática depende del material lignocelulósico, su composición y acceso enzimático, que simultáneamente dependen del pretratamiento realizado a los sustratos (Rodríguez G, I., & Piñeros C, Y. 2007).

Otros estudios encaminados a evaluar las actividades de holocelulasas de hongos filamentosos provenientes de la descomposición del tronco Tocantins (Brasil) cuando se cultiva en medios con diferentes biomásas lignocelulósicas (bagazo de la caña de azúcar, pasto elefante o okara), encontraron mejores actividades de xilanasas, CMCasas, FPasa, con una temperatura óptima de 50°C, pH 4,5 y estabilidad térmica a 45 °C. También se verificó mediante análisis químico las actividades hidrolasas y oxi-reductasa producidas por *Pleurotus ostreatus*, donde se probó que generaron mayor deslignificación de biomasa. (Facundes, B. C. 2014).

Los hongos de podredumbre blanca forman un interesante grupo de organismos con gran potencial biotecnológico debido a su habilidad para degradar el polímero de lignina y compuestos aromáticos estructuralmente relacionados. (Rodríguez, S. E, 2006). Esta potencialidad se basa especialmente en el sistema extracelular implicado en la degradación de lignina, compuesto por diferentes tipos de enzimas (peroxidasas y oxidasas extracelulares) y compuestos de baja masa molecular. (Rodríguez, S. E, 2006).

Estudios bajo diferentes fuentes de carbono donde determinan la actividad enzimática de las enzimas celulolíticas: endoglucanasa, exoglucanasa y β -glucosidasa; ligninolíticas: lacasa, ligninperoxidasa (LiP) y manganoperoxidasa (MnP) y xilanolíticas: endoxilanasas del hongo *Grifola frondosa* sobre agar papa dextrosa (PDA) en cinco generaciones, se encuentra que las enzimas más activas bajo estas condiciones de cultivo son la endoglucanasa y la exoglucanasa, mientras que la de menor actividad fue la β -glucosidasa (Barreto, S. M. 2008). La comparación de las actividades enzimáticas del hongo en las dos formulaciones de sustratos, para cinco tiempos de fermentación (20, 30,

45, 60 y 75 días) durante la fase de incubación, obtiene siempre una mayor actividad para los sustratos formulados con aserrín de roble. En cuanto a los sustratos con borra de café no fructifican por alguna sustancia tóxica presente que puede causar inhibición en el desarrollo del hongo y evitar su formación de carpóforo (Barreto, S. M. 2008).

En la fase experimental los datos obtenidos de actividad de exoglucanasa se relacionan con el modo de acción de la misma; ya que ésta genera principalmente rupturas secuenciales en la molécula de celulosa a partir de un extremo no reductor liberado, produciendo unidades de glucosa y celobiosa. El comportamiento de esta enzima demuestra una mayor actividad en los primeros 30 días de incubación, período correspondiente a la colonización total del sustrato por el micelio del hongo (Barreto, S. M. 2008), donde probablemente se requiere la mayor cantidad disponible de nutrientes.

Existe un gran interés en el estudio de la actividad enzimática de hongos debido a la creciente demanda de productos que pueden ser perjudiciales para el ambiente, y al mismo tiempo, una mayor conciencia con respecto a un menor daño al mismo. La búsqueda no solo está encaminada a encontrar cepas que puedan producir enzimas, sino al hecho de que sean eficientes en la degradación de compuestos altamente recalcitrantes y, que de igual forma, sean capaces de producir enzimas en cantidad suficiente para ser aplicadas en otros procesos biotecnológicos que requieran cantidades elevadas (Rojas Verde, M. G. 2010).

El interés en este tipo de investigaciones se debe al aumento de la demanda de energía realizado en los últimos 100 años, como resultado del crecimiento demográfico y la industrialización de los países (Sun y Cheng, 2002). La energía renovable es cada vez más importante para llegar a ser el futuro de la generación de energía.

Es evidente que las enzimas hidrolíticas juegan un papel importante durante el proceso de degradación final de los residuos biológicos. Sin embargo, la presencia de concentraciones más altas de lignina en la estructura afecta directamente al proceso de descomposición mediante la reducción de la actividad holocelulasa (Arboleda Valencia, J. W., et al 2011). La biotecnología, a través de tecnología enzimática, oferta la posibilidad de nuevos procesos de bioconversión a partir de residuos agroindustriales tales como paja, salvado, cáscaras de frutas, hojas de maíz, caña de azúcar bagazo, residuos de madera, entre otros, los cuales son ricos en materiales lignocelulósicos como las fibras de bambú, que podrían ser alternativas apropiadas como unas nuevas fuentes de energía (Arboleda Valencia, J. W., et al 2011).

El uso de enzimas microbianas no sólo se aplica a los biocombustibles. Estas también pueden ser aplicadas a la alimentación animal. Tolan y Foody (1999) argumentaron que el descubrimiento de líneas superproductoras y el desarrollo de procesos productivos, habrían incrementado su viabilidad económica. Estos mismos autores también reportaron que la absorción de celulasas por pollos y cerdos actuarían conjuntamente con xilanasas en la reducción de la viscosidad de los polisacáridos presentes en el trigo y la cebada, para ayudar a la función intestinal de los animales.

CONCLUSIONES

Se seleccionaron once cepas (LK25, LK17 M1, A7, A11, A14, A18, RIO1, RIO3, RIO4 y RIO5) de un total de 41 (100%) con capacidad de producir enzimas celulolíticas, es decir que cualquiera de estas cepas que se utilice con fines de degradación de materiales lignocelulósicos seguramente será efectiva.

Las cepas seleccionadas demuestran su potencialidad en procesos de producción de enzimas a partir de materiales lignocelulósicos residuales.

Los hongos de podredumbre blanca constituyen factor importante para el medio ambiente debido a su capacidad de incrementar la accesibilidad de la celulosa en el pretratamiento de residuos lignocelulósicos.

BIBLIOGRAFÍA

Sun, J. Z., & Scharf, M. (2010). Exploring and integrating cellulolytic systems of insects to advance biofuel technology. *Insect Science*, 17(3), 163.

Medina, D. A. P., Nuñez, M. F. A., & Ordoñez, M. S. (2010). Obtención de Enzimas Celulasas por Fermentación Sólida de Hongos para ser Utilizadas en el Proceso de Obtención de Bioalcohol de Residuos del Cultivo de Banano. *Revista Tecnológica-ESPOL*, 23(1).

Buaban, B., Inoue, H., Yano, S., Tanapongpipat, S., Ruanglek, V., Champreda, V., & Eurwilaichitr, L. (2010). Bioethanol production from ball milled bagasse using an on-site produced fungal enzyme cocktail and xylose-fermenting *Pichia stipitis*. *Journal of bioscience and bioengineering*, 110(1), 18-25.

Talebnia, F., Karakashev, D., & Angelidaki, I. (2010). Production of bioethanol from wheat straw: an overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. *Bioresource technology*, 101(13), 4744-4753.

Binod, P., Sindhu, R., Singhania, R. R., Vikram, S., Devi, L., Nagalakshmi, S., ... & Pandey, A. (2010). Bioethanol production from rice straw: an overview. *Bioresource technology*, 101(13), 4767-4774.

Hamelinck, C. N., Van Hooijdonk, G., & Faaij, A. P. (2005). Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. *Biomass and bioenergy*, 28(4), 384-410.

Sharma, R. K., & Arora, D. S. (2010). Production of lignocellulolytic enzymes and enhancement of in vitro digestibility during solid state fermentation of wheat straw by *Phlebia floridensis*. *Bioresource Technology*, 101(23), 9248-9253.

González, A. P., Acosta, E. A., Olivas, A. V. E., de Anda Jáuregui, A., Blanco, J. C., & Garza, R. V. (2011). *Los Macromicetos del Jardín Botánico de ECOSUR "Dr. Alfredo Barrera Marín" Puerto Morelos, Quintana Roo* (No. EE/589.2097267 M3).

Gutiérrez-Rojas, I., Moreno-Sarmiento, N., & Montoya, D. (2014). Mechanisms and regulation of enzymatic hydrolysis of cellulose in filamentous fungi: classical cases and new models. *Revista iberoamericana de micología*, 32(1), 1-12.

Arantes, V., Jellison, J., & Goodell, B. (2012). Peculiarities of brown-rot fungi and biochemical Fenton reaction with regard to their potential as a model for bioprocessing biomass. *Applied microbiology and biotechnology*, 94(2), 323-338.

Hernández A., García E., Rodríguez A., 1999 Celulosomas: sistemas multienzimáticos. *Journal of the Mexican Chemical Society*, Vol:43. N°.3-4.

Ortiz-Valbuena, K. L., & Álvarez-León, R. (2015). Effect of dumping of benefit products cacao (*Theobroma cacao* L.) On Some Chemical And Biological Properties In Soils Of A Cocoa Farm, City Of Yaguara (Huila, Colombia). *Boletín Científico. Centro de Museos. Museo de Historia Natural*, 19(1), 65-84.

Lynd L. R., (1996) "Overview and evaluation of fuel ethanol from cellulosic biomass: Technology, economics, the environment, and policy". *Annu Rev Energy Environ* Vol.21..pp.403- 465

Sheehan J., M .E Himmel. (1999) "Enzymes, energy, and the environment: A strategic perspective on the u.s. department of energy's research and development activities for bioethanol" *Biotechnol Prog* Vol. 15..pp.817-827.

Chaparro Sosa, Rosas Wanumen., (2006). Aislamiento y Evaluación de la Actividad Enzimática de Hongos descomponedores de Madera en la Reserva Natural la Montaña del Ocaso, Quimbaya – Quindío. Pontificia Universidad Javeriana Facultad De Ciencias. Tesis Microbióloga Industrial.

De Siqueira, F. G., de Siqueira, E. G., Jaramillo, P. M. D., Silveira, M. H. L., Andreus, J., Couto, F. A., ...& Ferreira Filho, E. X. (2010). The potential of agro-industrial residues for production of holocellulase from filamentous fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 64(1), 20-26.

Rodríguez G, I., & Piñeros C, Y. (2007). Producción de complejos enzimáticos celulolíticos mediante el cultivo en fase sólida de *Trichoderma* sp. sobre los racimos vacíos de palma de aceite como sustrato. *Vitae*, 14(2), 35-42.

Facundes, B. C. (2014). Fungos filamentosos produtores de Holocelulases prospectados em Mata de galeria do cerrado tocantinense. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Tocantins, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

J. SEOP BAK, M. KIM, I. CHOI, K. KIM. 2010. Biological pretreatment of rice straw by fermenting with *Dichomitus squalens*. *New Biotechnology*, 00, 00. R.

JURI Awad, Sebastián Andrés. Sacarificación y fermentación simultánea para la producción de bioetanol de segunda generación, mediante pre-tratamientos alternativos:

líquidos lónicosrecicladados y hongos de pudrición blanca. Memoria (Ingeniero Civil en Biotecnología). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, 2011. 76 h.

Rodríguez, S. E. (2006). caracterización molecular de lacasas de pleurotuseryngii: expresión heteróloga de estas enzimas y aplicaciones en la degradación de contaminantes aromáticos. *Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.*

Barreto, S. M. (2008). Actividad enzimática, degradación de residuos sólidos orgánicos y generación de biomasa útil del macromiceto *Grifola Frondosa*. Universidad Nacional de Colombia. Sede Manizales. Maestría en Ingeniería- Ingeniería Química.

Arboleda Valencia, J. W., Valencia Jiménez, A., Gonçalves de Siqueira, F., Dussan Medina, K., Restrepo Franco, G. M., Filho, E. X. F., & Grossi-de-Sa, M. F. (2011). Holocellulase activity from *Schizophyllum commune* grown on bamboo: a comparison with different substrates. *Currentmicrobiology*, 63(6), 581-587.

Rojas Verde, M. G. (2010). *Producción de enzimas lignolíticas por hongos de pudrición blanca aislados en Nuevo León* (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).

Sun, Y., & Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource technology*, 83(1), 1-11.

Tolan, J. S., & Foody, B. (1999). Cellulase from submerged fermentation. In *Recent progress in bioconversion of lignocellulosics* (pp. 41-67). Springer Berlin Heidelberg.