



PRODUCCIÓN DE XILANASA POR *Aspergillus fumigatus* EN FERMENTACIÓN EN ESTADOS LÍQUIDO Y SÓLIDO

XYLANASE ENZYMES PRODUCTION BY *Aspergillus fumigatus* IN SOLID STATE FERMENTATION AND SUBMERGED FERMENTATION

C. Castañeda-Casasola¹, A. Arana-Cuenca¹, E. Favela-Torres², M.A. Anducho-Reyes¹, A.E. González³, A. Téllez-Jurado^{1*}

¹Laboratorio de Agrobiotecnología, Universidad Politécnica de Pachuca, Carretera Pachuca-Cd. Sahagún km 20, ExHacienda de Sta. Bárbara, C.P. 43830, Zempoala, Hidalgo, México.

²Planta Piloto de Fermentaciones Sólidas (PP4), Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco No. 186, Col Vicentina, C.P. 09340, Iztapalapa, CDMX, México.

³Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Nicolás Cabrera No.1, 28049, Madrid, España.

Received May 23, 2017; Accepted July 24, 2017

Abstract

The fermentation processes can be divided generally in Solid-State Fermentation (SSF) and Submerged Fermentation (SmF) it has differences in growth physiology and metabolism of microorganisms. Both systems have been studied for the enzymes production of industrial interest using microorganisms as *Aspergillus* sp. that xylanase produced with important industrial application. In this work the effect of culture conditions (SSF and SmF) and the type of inert support (polyurethane foam, perlite and volcanic stone) in the production of xylanase by a strain identified as *Aspergillus fumigatus* was evaluated. The enzyme activity produced with perlite (54.08 U/gdm) and PUF (17.42 U/gdm) was higher than produced in SmF (2.06 U/mL). Using volcanic stone prevented the production of xylanases. Additionally, the SSF using perlite productivity was 18 times major that obtained in SmF, also, PUF using productivity increased 9 times relative to the liquid culture. Thereby, comparison of the kinetic parameters led to the conclusion that the SSF using perlite as an inert support generates a better alternative for obtaining xylanolytic activity from *A. fumigatus*.

Keywords: *Aspergillus fumigatus*, xylanase, SSF, SmF, tezontle, PUF, agrolite.

Resumen

Los procesos de fermentación pueden ser divididos generalmente en Fermentación en Estado Sólido (FES) y Fermentación en Estado Líquido (FEL) presentando diferencias tanto metabólicas como fisiológicas en los microorganismos. Ambos sistemas han sido estudiados para la producción de enzimas utilizando microorganismos de interés industrial como *Aspergillus* sp. que produce xilanasas con importantes aplicaciones industriales. En este trabajo se evaluó el efecto de las condiciones de cultivo (FES y FEL) y el tipo de soporte inerte (espuma de poliuretano, agrolita y tezontle) en la producción de xilanasas por una cepa identificada como *Aspergillus fumigatus*. La actividad enzimática producida con agrolita (54.08 U/gms) y poliuretano (17.42 U/gms) fue mayor a la producida en FEL (2.06 U/mL). El uso de tezontle impidió la producción de xilanasas. Adicionalmente, la productividad en FES utilizando agrolita fue 18 veces mayor que la obtenida en FEL, asimismo, con el uso de PUF la productividad aumentó 9 veces en relación con el cultivo líquido. De esta manera, la comparación de los parámetros cinéticos permitió concluir que la FES utilizando agrolita como soporte inerte genera una mejor alternativa para la obtención de enzimas xilanólíticas utilizando *A. fumigatus*.

Palabras clave: *Aspergillus fumigatus*, xilanasas, FEL, FES, tezontle, PUF, agrolita.

1 Introducción

Desde el punto de vista biotecnológico, el término fermentación se define como un proceso en el que

los microorganismos producen biomasa y metabolitos a partir de sustancias orgánicas (Suárez y Nieto, 2013). Este proceso se puede llevar a cabo en dos sistemas: La Fermentación en Estado Sólido (FES) y la Fermentación en Estado Líquido (FEL). La FES se

* Corresponding author. E-mail: alito@upp.edu.mx
doi: 10.24275/uam/izt/dcbi/revmexingquim/2018v17n1/Castaneda
issn-e: 2395-8472

define como el cultivo de microorganismos adheridos a un soporte sólido o semisólido, en el cual el medio de cultivo se encuentra disperso en una capa fina y en contacto con una superficie con cantidades de agua libre bajas (Viniestra, 1997).

En la FEL el microorganismo crece sumergido en el medio de cultivo en presencia de un exceso de agua (Singhania y col., 2010) y con un nivel limitado de oxígeno que depende de la temperatura y de la altura sobre el nivel del mar. La concentración de oxígeno repercute en el crecimiento del microorganismo y en la producción de metabolitos de interés sobre todos, si el microorganismo es aerobio como es el caso de los hongos filamentosos. Se ha establecido que en la FES se aumenta la productividad, debido a que se mejora la transferencia de oxígeno, ya que la relación área/volumen del medio líquido generalmente es varios órdenes de magnitud menor y es aún menor en soportes porosos. De tal manera, que el transporte de oxígeno depende del tipo de cultivo y del soporte, infiriendo que el crecimiento y la productividad será mejor en la FES que para la FEL, además, la condición de crecimiento se asemeja al hábitat natural de los hongos filamentosos; sin embargo, el escalamiento del sistema fermentativo y el control de los parámetros del proceso es más difícil (Demir y col., 2011), ya que la reproducibilidad de los experimentos debida a la heterogeneidad de los sustratos empleados, los gradientes de temperatura, oxígeno y el pH no pueden ser controlados a gran escala (Hölker y col., 2004; Krishna, 2005).

Se han utilizado diversos soportes para la FES y estos pueden ser clasificados en dos grandes categorías: sustratos naturales (productos y subproductos agroindustriales), en los que los soportes empleados son insolubles en agua y actúan como fuente de nutrientes (Chundakkdu, 2005); y soportes inertes, en los que se impregna el medio de cultivo; estos tienen aplicaciones potenciales en estudios científicos y en la producción industrial de productos de alto valor agregado ya que permiten evaluar y controlar la formulación del medio de cultivo (Ooijkaas y col., 2000). Algunos materiales porosos, con alta capacidad de retención de agua y relación área/volumen elevada pueden ser utilizados (Pandey y col., 1999) para este tipo de procesos, tal es el caso de la espuma de poliuretano (PUF), la agrolita y tezontle. Los dos primeros, han sido ampliamente utilizados como soportes inertes para el crecimiento en sólido y no existen reportes del tezontle como soporte de la FES.

El PUF es un polímero sintético ideal para el

cultivo de microorganismos ya que forma cavidades que permiten la entrada de aire entre sus poros donde el microorganismo crece en un medio rico en oxígeno y no produce efectos secundarios sobre la inducción o secreción de las enzimas por ser no biodegradable. Por ello, ha sido ampliamente estudiado en la producción de enzimas como lipasas, lacasas, tanasas o xilanasas (Hernández y col., 2009; Rodríguez y col., 2011; Rodríguez, 2012; Álvarez y col., 2013; Villegas y col., 2016).

La agrolita, que es un material volcánico amorfo, está compuesto principalmente de sílice (más del 70 %), con 12-18 % de óxido de aluminio además de óxidos de potasio y pequeñas cantidades de hierro, magnesio, calcio, titanio y sodio. Como tiene un alto contenido de sílice es considerado como un soporte químicamente inerte (Mahkan y Vakhshouri, 2010; Osma y col., 2011). Esta condición permite mantener el agua sobre la superficie, no se deteriora, es rígida y no se comprime fácilmente, creando buena porosidad, características idóneas para los procesos de FES (Ivankovic y col., 2010; Akdemir y Nuri, 2012). La agrolita ha sido usada para la producción de enzimas como lipasas (Hernández y col., 2009), la degradación de hexadecano (Velasco y col., 2011), inmovilización de microorganismos (Ivankovic y col., 2010) e incluso preservación de cepas fúngicas (Eichlerova y Homolka, 2014).

Por su parte, el tezontle es una roca de origen volcánico, material que se distribuye ampliamente en el centro de México y es utilizado en la industria de la construcción (Gómez y col., 2009). Está constituido por silicatos de aluminio además de bióxido de hierro y su coloración varía de rojo a naranja, gris y negro. Se caracteriza por su alta porosidad y área superficial (Yañez y col., 2009). Este material ha sido ampliamente utilizado en el tratamiento de agua (Gómez y col., 2009) y por sus características químicas y físicas puede ser un buen candidato como soporte inerte para su uso en FES.

Se han realizado estudios donde se compara la productividad entre FEL y FES utilizando diferentes soportes inertes, como los describe Hernández y col. (2009) donde comparan la producción de lipasas utilizando PUF y agrolita encontrando mayor actividad (40 %) con el uso de agrolita. Por otra parte, Aguilar y col. (2002) demuestran que el uso de PUF aumenta 10 veces la producción de proteasas por *Aspergillus niger* crecido en PUF respecto a FEL. Por otra parte, se ha descrito el uso de agrolita y de PUF como soportes de la FES para la producción de diversas enzimas, sin embargo tiene gran importancia

la búsqueda de soportes novedosos que cumplan con las características de ser inertes, de bajo costo, de fácil disponibilidad, que sean viables económicamente, de bajo impacto ambiental y de bajos costos de proceso y de formulación (Ooijkaas y col., 2000).

Dentro de los procesos de FES, los microorganismos más utilizados son los hongos filamentosos, por sus propiedades fisiológicas, enzimáticas y bioquímicas, además por la adaptación a una gran variedad de soportes sólidos. Entre los más estudiados se encuentra el género *Aspergillus* ya que presenta diversas aplicaciones a nivel industrial asociadas con la producción de alimentos fermentados y obtención de metabolitos secundarios. De esta manera, se ha empleado en la formación de diferentes productos como ácido giberélico (Corona y col., 2005), ácido gálico (Mata-Gómez y col., 2015) y ácido caféico (Ramírez-Velasco y col., 2016) además de la producción de diferentes enzimas como pectinasas (Pereira y col., 2014; Barman y col., 2015; Khatri y col., 2015), invertasas (Veana y col., 2014), fitasas (Sapna y Singh, 2014; Buddhiwant y col., 2015) y otras enzimas hidrolíticas (Das y col., 2013; Gottschlk y col., 2013; Sharma y col., 2014; Camacho-Ruiz y col., 2016). Por lo anterior, es notorio que el género *Aspergillus* tiene una gran importancia a nivel biotecnológico, por su amplio manejo en la industria de la fermentación, hasta convertirse en una fuente principal para la producción de enzimas hidrolíticas como las xilanasas con importancia a nivel industrial (Wang y col., 2005). Estas enzimas participan sinérgicamente en la degradación total de la hemicelulosa para producir xilosa y/o arabinosa. Las más conocidas son las endo- β -D-xilanasas (rompen al azar los enlaces glicosídicos de la cadena principal de la molécula), la arabinofuranosidasa (hidroliza las cadenas laterales de arabinosa), mientras que las acetil-xilan-esterasas liberan grupos acetatos. La glucuronidasa remueve las cadenas laterales de ácido glucurónico a partir de unidades de xilosa. Las β -xilosidasas atacan oligosacáridos cortos, llevando a cabo la hidrólisis de los enlaces β -1,4-aril-xilopiranosido produciendo xilosa (Polizeli y col., 2005; Harris y Stone, 2009). Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de las condiciones de cultivo (FES y FEL) y el tipo de soporte inerte (PUF, agrolita y tezontle) en la actividad xilanolítica de *Aspergillus fumigatus*.

2 Materiales y métodos

2.1 Microorganismo

Se utilizó la cepa *Aspergillus fumigatus* donada por el Dr. Sergio Huerta Ochoa de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa (UAM-I).

2.2 Identificación de la cepa

2.2.1 Identificación morfológica

La morfología macroscópica (tamaño, color y textura de las colonias) se observó al crecer al microorganismo durante 7 días en diferentes medios para luego compararlos con lo descrito por Klich (2002). Los medios utilizados fueron:

Czapek constituido por: NaNO_3 , 2 g/L; KCl, 0.59 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.59 g/L; $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.01 g/L; KH_2PO_4 , 1 g/L y sacarosa, 30 g/L, pH 5 incubado a 25 °C y 35 °C.

MEA: Extracto de malta, 2 g/L; Peptona, 2 g/L; Glucosa, 20 g/L; Agar, 15 g/L a pH 4.7, incubado a 25 °C.

Para el estudio de la morfología microscópica se tomó una muestra de cultivo fresco (medio MEA), se mantuvo en etanol absoluto durante 24 h para posteriormente ser analizada bajo un microscopio electrónico (SEM) marca JEOL5600V, y observar el tamaño, forma y textura del microorganismo utilizando microscopía electrónica de barrido.

2.2.2 Identificación molecular

En primer lugar se creció el microorganismo en medio MEA durante 7 días a 28 °C para tomar el micelio y realizar la extracción de DNA utilizando el kit PowerSoil® DNA Isolation de MO-BIO. A continuación se amplificó la región ITS utilizando los cebadores ITS5 (5' AAGGATCATTA 3') e ITS4 (5' AACTCCAGTTTT 3') (White y col., 1990). Los productos de PCR obtenidos se purificaron con el kit JETquick® de GENOMED. En todos los casos, la integridad del ADN así como el tamaño de las bandas amplificadas se determinaron mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa 1 % que fueron revelados con bromuro de etidio (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y visualizados con luz ultravioleta (254 nm). Finalmente, los productos de PCR purificados fueron secuenciados en el Parque Científico de Madrid, España y el análisis de las secuencias se realizó utilizando el

programa Chromas V 1.43 (Brisbane, Australia) (<http://technelysium.com.au/>) y se determinó su grado de similitud con otras secuencias disponibles en la base de datos del GenBank (<http://www.nlm.nih.gov/>). Posteriormente se generó un árbol filogenético para conocer el género y la especie a la cual pertenece la cepa utilizada con ayuda de diversos programas como Clustal x 2.0. (Thompson y col., 1997) (www.clustal.org/download/current/); jModelTest (Posada, 2008) (<http://code.google.com/p/jmodeltest2/>); PhyML_3.0 (Guindon y col., 2010) (<http://www.atgcmontpellier.fr/phyml/>) y Dendroscope (Huson y col., 2007) (<http://ab.inf.unituebingen.de/software/dendroscope/>).

2.3 Fermentación

2.3.1 Preparación de inóculo

Se adicionaron 30 mL de Tween 0.05 % a matraces Erlenmeyer de 125 mL con 30 mL de medio PDA (agar de papa-dextrosa) previamente inoculados con 1 mL de suspensión de esporas de *A. fumigatus* incubados durante 7 días a 28 °C y se agitó con un agitador magnético para obtener una suspensión de esporas que fue utilizado como inóculo para los cultivos en FEL y FES. El conteo de las esporas en la suspensión se realizó microscópicamente con ayuda de una cámara de Neubauer.

2.3.2 Fermentación en estado líquido

Las FEL se relizaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL que contenían 75 mL de medio Pontecorvo modificado constituido por: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 6.12 g/L; Urea, 1.53 g/L; KH_2PO_4 , 1.52 g/L; KCl, 0.52 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.52 g/L; extracto de levadura, 0.5 g/L; metales traza, 1 mL ; elementos traza (en mg/mL); $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 100 g/L; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 50 g/L; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 50 g/L; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 250 g/L; FeCl_3 , 85 g/L; ZnSO_4 , 100 g/L; utilizando xilano de abedul al 0.2 % como fuente de carbono. Se inoculó con la suspensión de esporas obteniendo una concentración final de 2×10^7 esporas/mL y se incubaron a 28 °C a 150 rpm. Se tomaron muestras (2 mL) cada 12 h, por triplicado, durante 5 días para realizar la cuantificación de actividad xilanasa, proteína, pH y azúcares totales.

2.3.3 Fermentación en estado sólido

Durante el estudio de la FES se realizaron pruebas con tres soportes inertes: PUF, agrolita y tezontle. El PUF

se cortó en cubos de 1 cm³ y se lavó dos veces con agua caliente, se dejó escurrir y se secó en un horno a 60 °C durante 24 h. La agrolita y el tezontle fueron tamizados para obtener un tamaño de partícula entre el número de malla 16 y 20 (1.18-0.85 mm), una vez tamizados se lavaron dos veces con agua caliente y posteriormente, con agua destilada fría, se escurrieron para eliminar el exceso de agua y se secaron a 60 °C por 24 h.

Las FES se llevó a cabo tipo Raimbault (1981) inoculadas con una concentración final de 2×10^7 esporas/g materia seca (gms) en medio Pontecorvo a un 75 % de la máxima capacidad de retención de agua para cada soporte; agrolita (2.4 mL/g), PUF (12 mL/g) y tezontle (0.37 mL/g), cada columna fue empacada con 10 g de agrolita y tezontle y 2 g de PUF. Las cinéticas se realizaron a 28 °C durante 5 días, tomando muestra por triplicado cada 12 h.

La obtención de extracto enzimático varió dependiendo del soporte utilizado. En el caso de PUF éste fue exprimido para la obtención del extracto; en los cultivos realizados sobre tezontle y agrolita las columnas fueron desempacadas y el fermento fue adicionado a un vaso de precipitado, se adicionó 30 mL de agua estéril y se agitó a 150 rpm durante 20 min. Posteriormente, se filtro con papel Whatman del No. 1 y los extractos filtrados fueron sometidos a los análisis correspondientes. Se cuantificó actividad xilanólica, proteína, pH y azúcares totales de los extractos obtenidos, mismos que se reportaron por gramo de materia seca (gms).

2.4 Métodos analíticos

2.4.1 pH

El pH se midió con un potenciómetro (Testers Checker de pH Hanna®).

2.4.2 Azúcares consumidos

El consumo de sustrato se determinó mediante la cuantificación de azúcares totales por el método fenol-sulfúrico (Dubois y col., 1956). Se generó una curva estándar utilizando xilosa a una concentración de 400 mg/L.

2.4.3 Proteína extracelular

La proteína extracelular se cuantificó mediante el método de Bradford (1976). La curva estándar se realizó con BSA a una concentración de 1 µg/mL.

2.4.4 Actividad enzimática

La actividad xilanolítica se determinó a partir de la liberación de azúcares reductores (Miller y col., 1960). El extracto enzimático se incubó con xilano al 0.2 % durante 20 minutos a 40 °C. La curva estándar se realizó con xilosa a una concentración de 2 mg/mL. Una unidad de actividad se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μmol de xilosa por minuto bajo las condiciones ensayadas.

3 Resultados y discusión

3.1 Identificación de la cepa

La cepa *Aspergillus* sp. fue identificada molecularmente utilizando la secuencia Internal

Transcribed Spacer (ITS) como marcador molecular y morfológicamente por sus características macroscópicas y microscópicas.

La identificación molecular se basa en la comparación de una secuencia nucleotídica previamente amplificada del organismos de interés. Mediante el análisis de las secuencias de los fragmentos de ADN correspondientes a los ITS se realizó el análisis filogenético generando el dendrograma mostrado en la Figura 1. La relación filogenética agrupó las especies de acuerdo a sus distancias evolutivas con base en el análisis de la secuencia de ADN, de esta manera se pudo corroborar que la cepa en estudio (*AspITS1F*) pertenece a la especie *A. fumigatus*. Actualmente la secuencia nucleotídica se encuentra depositada en GenBank con número de acceso KT373971.

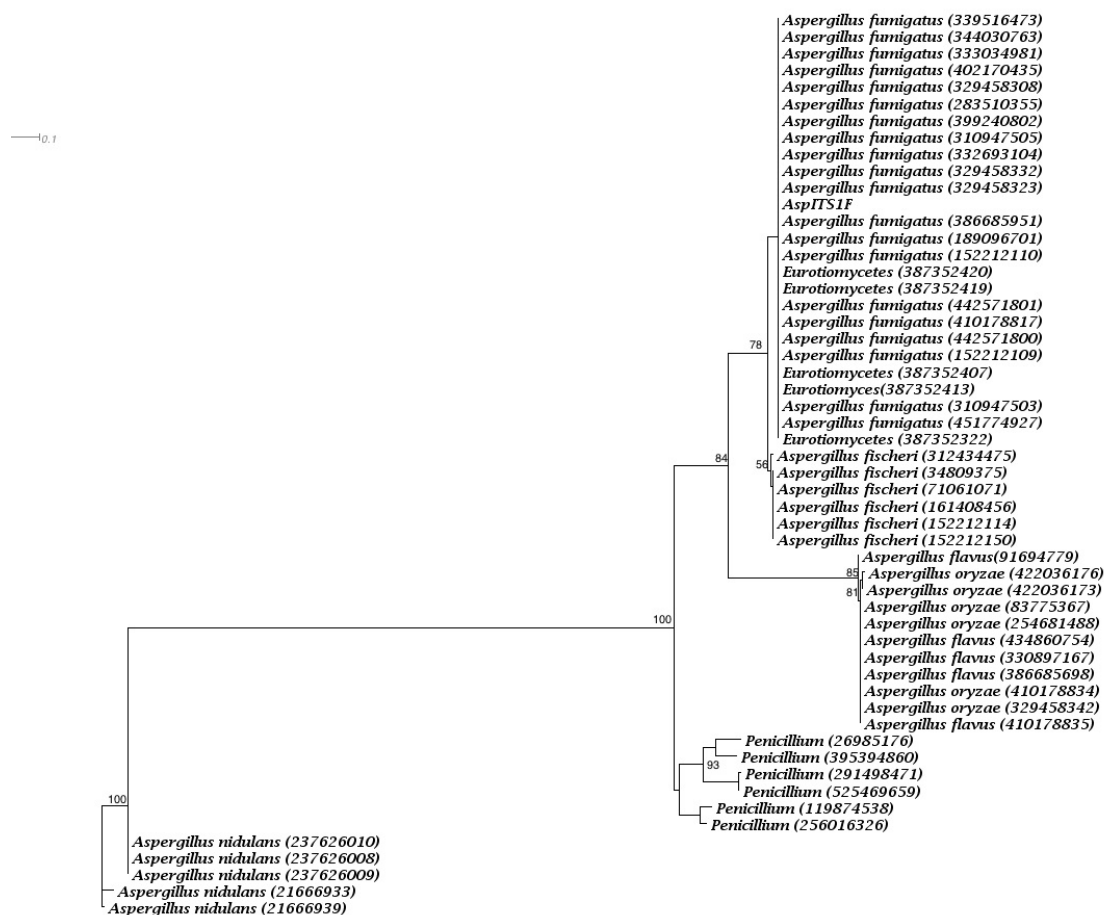


Fig. 1. Árbol filogenético obtenido del análisis de la secuencia Internal Transcribed Spacer (ITS) de *Aspergillus* sp.

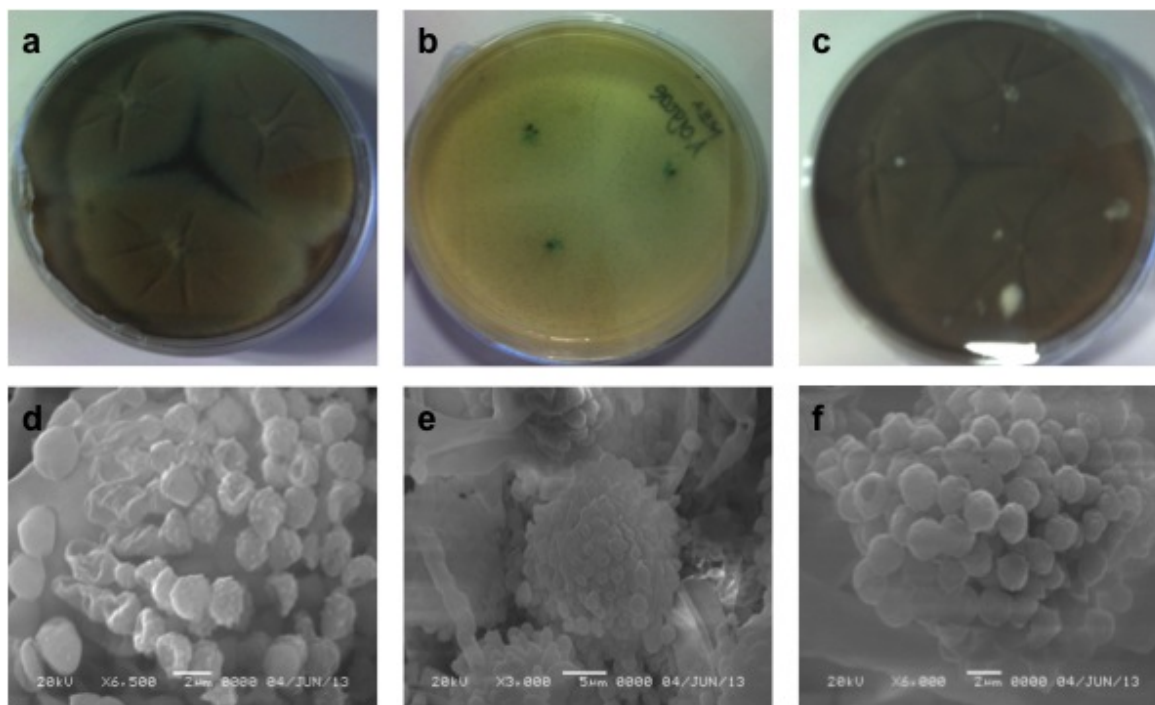


Fig. 2. Identificación morfológica de *Aspergillus* sp.; colonias en Czapek 25 °C (2a), MEA 25 °C (1b) y Czapek 35 °C (1c) y, cabezas conidiales (2a), vesículas (2b) y conidios (2c) (crecidas en medio Czapek) durante 7 días.

Para corroborar la especie del microorganismo, se creció *Aspergillus* sp. en dos diferentes medios de cultivo durante 7 días. En la Figura 2 (a, b y c) se muestran imágenes de colonias en agar Czapek (crecidas a 25 °C y 35 °C) las cuales presentaron características aterciopeladas de color verde oscuro a gris turquesa, alcanzando un diámetro de 3-5 cm en 7 días a 25 °C con reverso marrón rojizo. En MEA, el color de las colonias fueron verdes oscuras y reverso amarillo, con menor crecimiento al compararlo con el medio Czapek. En la Figura 2 (d, e y f) se presentan las fotografías electrónicas donde se observa la presencia de conidióforos cortos, con paredes lisas, con cabezas conidiales columnares y uniseriadas, filídes de $5-9 \times 2-3 \mu\text{m}$ y vesículas piriformes a subglobosas de $22-50 \mu\text{m}$ de diámetro. De acuerdo con las características macroscópicas presentes en los tres diferentes medios de cultivo y por la descripción microscópica observada y por lo reportado por Klich (2002), aunado a la identificación molecular, es muy probable que la cepa en estudio pertenezca a *A. fumigatus*. El desarrollo de herramientas en biología molecular ha jugado un papel fundamental en la identificación de microorganismos que, con la ayuda de su morfología, genera información suficiente para una clasificación confiable. En este trabajo se identificó a la cepa en estudio como *A. fumigatus*,

microorganismo saprofito con la capacidad de crecer en diversos sustratos, donde desempeña importantes funciones como degradadores de los componentes de la pared celular de las plantas. Es considerado un patógeno oportunista que puede causar infecciones invasivas en pacientes inmunocomprometidos (Amich y col., 2013), sin embargo es tan versátil como otros hongos modelo en la naturaleza. Se han demostrado que *A. fumigatus* tiene un gran potencial para la degradación de materia orgánica, por su capacidad en producir xilanasas, celulasas, glucanasas, quitinasas y proteasas (Nierman y col., 2005; Miao y col., 2015) por lo que su estudio ayuda a diseñar estrategias enzimáticas para la utilización de la biomasa vegetal. Recientemente se ha reportado que *A. fumigatus* tiene la capacidad de secretar altos niveles de enzimas xilanasas termoestables y alcalinizables (Bajaj y Abbass, 2011; Liu y col., 2012; Chang y col., 2017) por lo que le hace un microorganismo con gran potencial biotecnológico.

3.2 Fermentaciones

Se evaluó el desarrollo de la cepa *A. fumigatus* durante la FEL y FES, monitoreando la actividad xilanólítica, el consumo de la fuente de carbono, la concentración de proteína extracelular y el cambio de pH; para ello,

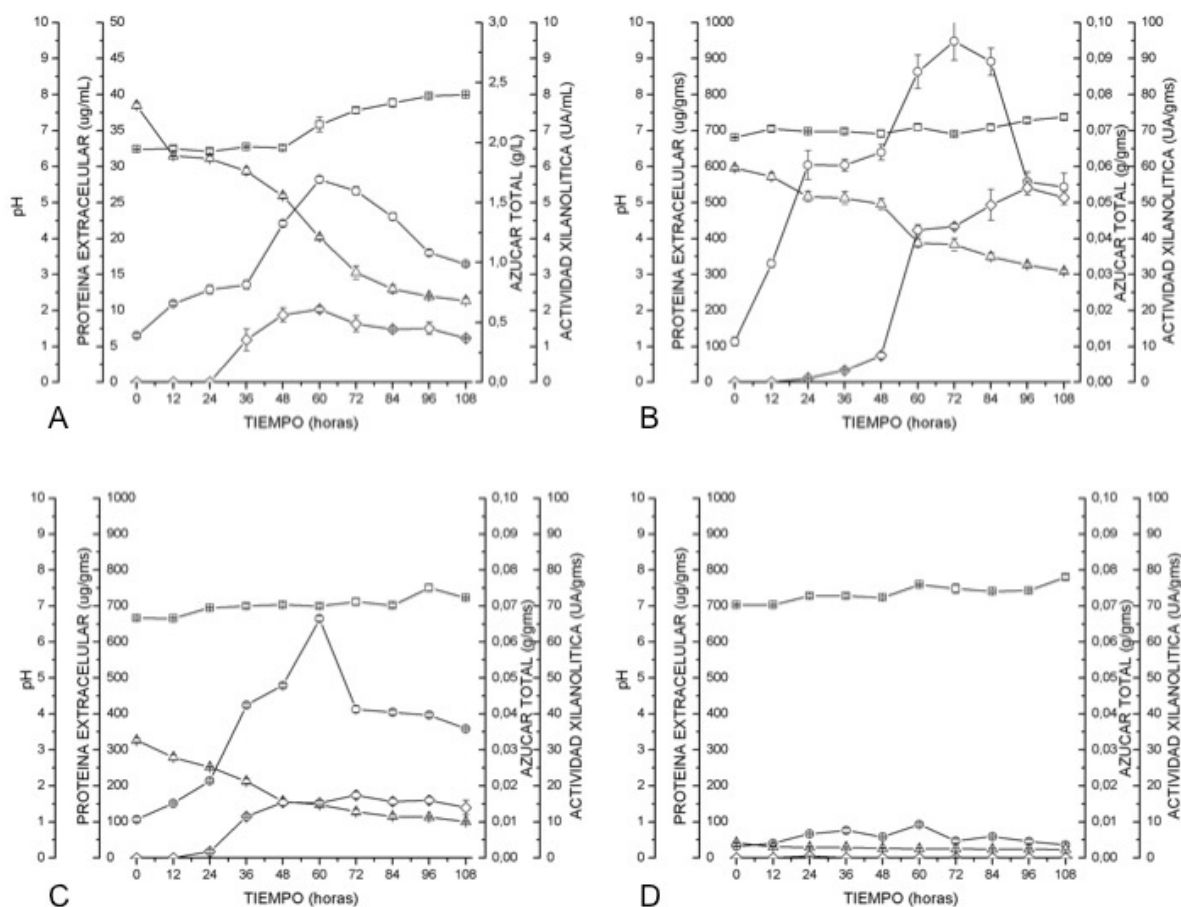


Fig. 3. Cultivo de *A. fumigatus* en FEL (A) y FES evaluando tres tipos de soportes inertes PUF (B), agrolita (C) y tezontle (D): pH (\square), proteína extracelular (\circ), azúcares totales (Δ) y actividad xilanolítica (\diamond).

se tomaron muestras cada 12 horas durante 5 días por triplicado.

3.2.1 Fermentación en estado líquido

Durante la evaluación del cultivo de *A. fumigatus* con xilano de abedul como fuente de carbono (Figura 3A) la actividad xilanolítica aumentó en función del tiempo de fermentación, alcanzando la mayor actividad (2.01 U/mL) a las 60 h, mientras que la proteína extracelular alcanzó su máxima concentración a la misma hora (28.17 $\mu\text{g/mL}$). El pH del medio se mantuvo entre 6 y 7; resultados similares se han observado en la producción de celulasas por *A. terreus* y *A. niger* en donde el pH de producción fue de 6 (Mrudula y Murugammal, 2011).

3.2.2 Fermentación en estado sólido

En la Figura 3B se presentan los resultados de la cinética de producción de xilanasas por FES utilizando agrolita como soporte inerte. La producción máxima de xilanasas (54.08 u/gms) se obtuvo a las 98 h de cultivo. Gamarra y col. (2010) reportaron una mayor actividad celulolítica en *Aspergillus niger* al usar agrolita como soporte inerte en comparación con la FEL adjudicando que el crecimiento unido a hongos en agrolita puede favorecer una mejor producción de enzimas. Por otro lado, se ha descrito que la producción de xilanasas por *A. niger* presenta mayores actividades (Villena y Gutiérrez, 2012), así como mayor productividad durante FES (Shah y Madamwar, 2005). Actualmente, diferentes estudios demuestran que *A. fumigatus* tiene capacidad de producir enzimas hidrolíticas por FES a partir de residuos agroindustriales. Souza y col. (2012)

demonstraron que *A. fumigatus* produce actividad xilanolítica durante la FES (219.5 U/g) en los primeros 8 días de la fermentación, mientras que Moretti y col. (2012) reportaron que *A. fumigatus* produce xilanasas, β -glucosidasa y carboximetilcelulasas por FES a partir de diferentes materiales lignocelulósicos como sustratos.

Con el uso de PUF como soporte inerte se observó que la mayor actividad xilanolítica (17.43 U/gms) ocurre a las 72 h de cultivo, después de este tiempo, se observó una ligera disminución de la actividad enzimática (Figura 3C); esto puede ser debido al agotamiento de la fuente del carbono o al incremento de pH en el medio de cultivo (> 7). Estudios recientes han demostrado las ventajas del uso de PUF como soporte además de ser muy atractivo para la producción de enzimas de origen fúngico (Hu y col., 2011; Rodríguez y col., 2011; Rodríguez, 2012; Sharma y Satyanarayana, 2012).

Por otro lado, al usar tezontle como soporte inerte (Figura 3D) no se detectó actividad xilanolítica en los extractos enzimáticos y la concentración de proteína extracelular fue despreciable. Es posible, que los iones presentes en el sustrato como Fe, Mn, Ca y Mg reaccionen con el medio o que tengan un efecto inhibitorio (Yañez y col., 2009) tal y como lo reportan Wang y col. (2013) y Álvarez y col. (2013) quienes indican que este tipo de iones pueden inhibir la actividad celulolítica como en el caso de *Penicillium decumbens*, particularmente la presencia de Cu^{2+} y Fe^{3+} y la actividad xilanolítica de *Sporisorium reilianum*, particularmente la presencia de Cu^{2+} , Ca^{2+} y K^+ , respectivamente.

3.2.3 Comparación entre FEL y FES

Para comparar la actividad enzimática producida por *A. fumigatus* en los diferentes sistemas de fermentación se calcularon parámetros como actividad específica (UA/ μg de proteína), productividad (UA/mL h o UA/gms h), rendimiento de enzima a partir de sustrato ($Y_{E/S}$) y rendimiento de proteína a partir de sustrato ($Y_{P/S}$) durante la FEL y la FES (agrolita, tezontle y PUF).

En general, todos los parámetros fueron superiores en FES respecto a FEL. La máxima actividad enzimática se obtuvo a diferentes tiempos siendo 27 veces superior en FES con agrolita (a las 96 h) y 9 veces con PUF (a las 96 h) respecto a la FEL (a las 60 h). El tiempo en que se produjo un máximo de proteína extracelular no coincide con el tiempo de producción máxima de actividad enzimática aunque el

comportamiento fue similar ya que utilizando como soporte agrolita, se obtuvo 33 veces más proteína extracelular (a las 72 h), 24 veces más proteína utilizando PUF como soporte (a las 60 h) con respecto a la FEL (a las 60 h). Del mismo modo, la máxima actividad específica se observó utilizando FES con agrolita como soporte aunque las variaciones no son tan importantes.

La comparación de ambos tipos de cultivo (Tabla 1) reveló que la productividad de xilanasas fue mayor en FES con agrolita como soporte (18 veces) y con PUF fue de 8 veces más comparada con la detectada en FEL. Estas diferencias de productividad entre FES y FEL han sido reportadas anteriormente por diversos grupos. Lekha y Lonsane (1994) reportaron que la productividad de tanasas es 5 veces mayor en FES que en FEL utilizando como soporte de la FES, bagazo de caña de azúcar. Acuña y col. (1996) reportaron que la FES resultó ser entre 6 y 51 veces más productiva que la FEL dependiendo del tipo de enzima cuantificada utilizando también bagazo de caña de azúcar como soporte de la FES. Por otro lado, Ashokkumar y Gunasekaran (2002) demostraron que la productividad de β -fructofuranosidasa por *A. niger* fue 3 veces mayor en FES (154.2 U/Lh) que en FEL (48.3 UA/Lh) utilizando bagazo de caña de azúcar como soporte. Asimismo, Mrudula y Murugamma (2011) reportaron que la producción de celulasas por *A. niger* durante FES utilizando como soporte fibra de coco, fue 14.6 veces mayor que la obtenida en FEL. Shobana y Maheswari (2013) describieron la producción de celulasas por *A. fumigatus* comparando la FEL y FES encontrado que la FEL fue más eficiente que la FES (3 a 1) utilizando diversos residuos lignocelulósicos como soporte para esta última. Al utilizar soportes que a su vez, pueden ser utilizados simultáneamente como sustrato con es el caso de la FES, es muy probable que la actividad enzimática extracelular sea producto tanto del consumo de sustrato del medio adicionado como del propio soporte, esto hace que no sea posible relacionar con precisión la producción de enzimas durante la FES, por lo tanto, el uso de soportes inertes permite relacionar con mayor precisión la producción de enzimas con la FEL por su baja interferencia en procesos metabólicos y se puede inferir el impacto del medio de crecimiento en diversos procesos fermentativos (Ooijkaas y col., 2000). Los resultados obtenidos indicaron que es posible mejorar la producción de enzimas pero bajo condiciones de crecimiento en sólido utilizando soportes que no interfieran en la producción o actividad enzimática.

Tabla 1. Actividad enzimática, proteína extracelular, pH y rendimientos producto/substrato de *Aspergillus fumigatus* crecidos en sistemas FES Y FEL y xilano de abedul como fuente de carbono.

Tipo de fermentación	Medio	Máxima actividad enzimática	Máxima concentración de proteína extracelular	Actividad específica	Productividad	($Y_{E/S}$)	($Y_{P/S}$)
FEL	Pontecorvo modificado	2.03 UA/mL	28.19 mg/mL	0.087 UA/mg	0.039 UA/mL h	758.74	0.006
FES	Agrolita	54.08 UA/gms	948.38 mg/gms	0.097 UA/mg	0.707 UA/gms h	1784.56	14.9
	PUF	17.42 UA/gms	664.60 mg/gms	0.042 UA/mg	0.321 UA/gms h	618.62	11.2

En cuanto a los rendimientos ($Y_{E/S}$ y $Y_{P/S}$) obtenidos durante la FEL y FES (sobre PUF, agrolita y tezontle) en función de la concentración de xilano de abedul y azúcar consumido y del contenido de proteína extracelular en el medio. La FES utilizando agrolita como soporte presentó el mayor rendimiento enzima/sustrato producido por parte de *A. fumigatus* en xilano de abedul con valor de 1784.56 (UA/g) y un rendimiento proteína/sustrato de 14.9 en el mismo soporte. De esta manera se puede anticipar, de manera indirecta, que el sistema más económico corresponde al uso de agrolita como soporte de FES.

Diversos reportes han demostrado que la FES tiene varias ventajas sobre la FEL; por ejemplo, el bajo contenido de humedad facilita la extracción del producto y reduce el riesgo de contaminación (Pandey y col., 2008), además, no se observa represión catabólica o inhibición por productos finales (Acuña y col., 1996; Montiel y col., 2002; Viniestra y Favela, 2006) lo que permite el empleo de mayores concentraciones de sustrato (Gautam y col., 2002) y la obtención de productos más concentrados (Pandey y col., 2008). Mientras, que el uso de la FEL simplifica la generación de productos, los sustratos son solubles en el medio, los parámetros como la temperatura, aireación, temperatura y pH son fácilmente controlables en comparación con la FES. Debido a lo anterior, este trabajo permitió evaluar el comportamiento de la fermentación con el uso de diferentes tipos de soportes (agrolita, PUF y tezontle) utilizando un medio de cultivo químicamente definido. Demostrando que el tezontle, aunque cumple con las características de alta porosidad y área superficial (Yañez y col., 2009) posiblemente no sea un material inerte, de manera que los iones presentes en su composición reaccionen con el medio de cultivo, inhibiendo la actividad enzimática y el crecimiento celular. Por otro lado, la ausencia de actividad enzimática puede deberse a la presencia de iones inhibidores de la actividad catalítica por lo que hace

falta diseñar un tratamiento al soporte que elimine la mayor cantidad de elementos inhibitorios.

Se observó que la producción enzimática varía en los distintos sistemas de fermentación obteniendo información importante para mejorar la producción enzimática. Los resultados de este trabajo y los reportados en la literatura son muy consistentes en demostrar que en FES se obtienen mayores productividades de α -amilasas (Ertan y col., 2004), pectinasas (Acuña y col., 1996; Díaz y col., 2001; Ferreira y col., 2010), peptidasas (da Silva y col., 2013), celulasas (Singhania y col., 2010; Mrudula y Murugammal, 2011; Li y col., 2013), xilanasas (Suprabha y col., 2008), tanasas (Aguilar y col., 2001), fitasas (Sapna y Sing, 2014) y proteasas (Aguilar y col., 2002; De Azeredo y col., 2006).

Un parámetro relevante en todo proceso fermentativo es el rendimiento enzima/sustrato ($Y_{E/S}$), que da información sobre la cantidad de sustrato empleado en la síntesis enzimática y de manera indirecta la economía del sistema. Mientras que el rendimiento proteína/sustrato ($Y_{P/S}$) permite conocer el comportamiento del microorganismo cuando se emplean concentraciones elevadas de fuente de carbono, dando como resultado la represión catabólica, acumulación de productos intermedios o el incompleto consumo de la fuente de carbono (Najafpour, 2007). De esta manera, se puede afirmar que la FES, utilizando agrolita como soporte inerte, es un cultivo que permite la producción de enzimas xilanólíticas permitiendo una alta productividad en el proceso, favoreciendo el proceso económicamente (Osma y col., 2011). Asimismo, el uso de agrolita puede resultar en un avance significativo en el estudio de *A. fumigatus* en FES, ya que es un medio limpio y de fácil preparación en el laboratorio, que permite la producción de enzimas xilanólíticas. Además, de ofrecer múltiples beneficios en la fermentación como mejorar la productividad del proceso FES, que puede resultar de beneficio de la transferencia de calor y

el oxígeno en matriz sólida; proporcionar apoyo en superficie para la adsorción de los hongos; los hongos adsorbido sobre agrolita da una posibilidad para ser reutilizado en ciclos sucesivos de la fermentación (Singh y Singh, 2006).

Conclusiones

Al comparar los resultados obtenidos del la FEL y FES fue evidente que el crecimiento en sólido permite tener un mayor aumento en la producción de las enzimas extracelulares estudiadas.

La agrolita mostró las mejores características como soporte para la FES bajo las condiciones ensayadas. Con este soporte se observó un aumento de hasta 27 veces en la actividad enzimática con respecto a la FEL. El tezontle no mostró cualidades positivas para ser utilizado como soporte para la FES, es muy probable que el tezontle libere iones que pueden interferir en la expresión de la enzima o que puedan ser inhibitorias de la actividad catalítica de la xilanasasa.

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado gracias al financiamiento del proyecto con clave CB-2011-16935 y a la beca otorgada para cursar la Maestría en Biotecnología de la Universidad Politécnica de Pachuca incluida en el Padrón Nacional de Posgrado de CONACyT con el registro 423464.

Referencias

- Acuña, M.E., Gutiérrez, M., Viniegra, G., Favela, E. (1996). Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 43, 808-814.
- Aguilar, C.N., Augur, C., Favela, E., Viniegra, G. (2001). Fermentation: influence of glucose and tannic acid. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 26, 296-302.
- Aguilar, C.N., Favela, E., Viniegra, G., Augur, C. (2002). Culture conditions dictate protease and tannase production in submerged and solid-state cultures of *Aspergillus niger* Aa-20. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 102, 407-14.
- Akdemir, A., Nuri, O. (2012). Utilization of natural zeolite and perlite as landfill liners for *in situ* leachate treatment in landfills. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 9, 1581-1592.
- Álvarez, J., Hernández, E.M., Arana, A., Díaz, G., Mercado, Y. (2013). Purification and characterization of Xylanase SRXL1 from *Sporisorium reilianum* grown in submerged and solid-state fermentation. *BioResource* 8, 5309-5318.
- Álvarez-Cervantes J., Sánchez C., Díaz R., Díaz-Godínez G. (2016). Caracterización de la producción de lacasas, celulasas y xilanasas de *Pleurotus ostreatus* cultivado en fermentación sólida utilizando un soporte inerte. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 15, 323-331.
- Amich, J., Schafferer, L., Haas, H., Krappmann, S. (2013). Regulation of sulphur assimilation is essential for virulence and affects iron homeostasis of the human-pathogenic mould *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathog* 9, e1003573. doi:10.1371/journal.ppat.1003573
- Ashokkumar, B., Gunasekaran, P. (2002). B-fructofuranosidase production by 2-deoxyglucose resistant mutants of *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Indian Journal of Experimental Biology* 40, 1032-1037.
- Bajaj, B.K., Abbass, M. (2011). Studies on an alkali-thermostable xylanase from *Aspergillus fumigatus* MA28. *Biotechnology* 1, 161-171.
- Barman, S., Sit, N., Badwaik, L.S., Deka, S.C. (2015). Pectinase production by *Aspergillus niger* using banana (*Musa balbisiana*) peel as substrate and its effect on clarification of banana juice. *Journal of Food Science and Technology* 52, 3579-89.
- Bradford, M.A. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Chemistry* 72, 248-254.
- Buddhiwant, P., Bhavsar, K., Kumar, V.R., Khire, J.M. (2016). Phytase production by solid-state fermentation of groundnut oil cake by

- Aspergillus niger*: A bioprocess optimization study for animal feedstock applications. *Prep Biochemistry Biotechnology* 6, 531-538.
- Camacho-Ruiz, M.A., Camacho-Ruiz, R.M., Armendariz, M., Ramírez-Velasco, L., Asaff-Torres, A., Levasseur, A., Mateos-Díaz, J.C., Rodríguez, J.A. (2016). Corn bran as potential substrate for high production of feruloyl and acetylxyylan esterases by solid state fermentation. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 15, 11-21.
- Chang, X., Xu, B., Bai, Y., Luo, H., Ma, R., Shi, P., Yao, B. (2017). Role of N-linked glycosylation in the enzymatic properties of a thermophilic GH 10 xylanase from *Aspergillus fumigatus* expressed in *Pichia pastoris*. *PLoS ONE* 12, e0171111
- Chundakkdu, K. (2005). Solid-state fermentation system-an overview. *Critical Reviews in Biotechnology* 25, 1-30.
- Corona, A., Sáez, D., Agosin, E. (2005). Effect of water activity on gibberellic acid production by *Gibberella fujikuroi* under solid-state fermentation conditions. *Process Biochemistry* 40, 2655-2658.
- Da Silva, R.R., de Freitas-Cabral, T.P., Rodrigues, A., Cabral, H. (2013). Production and partial characterization of serine and metallo peptidases secreted by *Aspergillus fumigatus* Fresenius in submerged and solid state fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology* 44, 235-243.
- Das, A., Paul, T., Halder, S.K., Jana, A., Maity, C., Das, M.P.K., Pati, B.R., Mondal, K.C. (2013). Production of cellulolytic enzymes by *Aspergillus fumigatus* ABK9 in wheat bran-rice straw mixed substrate and use of cocktail enzymes for deinking of waste office paper pulp. *Bioresource Technology* 128, 290-6.
- De Azeredo, L.A., De Lima, M.B., Coelho, R.R., Freire, D.M. (2006). Thermophilic protease production by *Streptomyces* sp. 594 in submerged and solid-state fermentations using feather meal. *Journal of Applied Microbiology* 100, 641-647.
- Demir, A., Aytar, P., Gedikli, S., Çabuk, A., Arisoy, M. (2011). Laccase production with submerged and solid state fermentation: Benefit and cost analysis. *Journal of Biological Chemistry* 39, 305-313.
- Deshmukh, R. A., Jagtap, S., Mandal, M. K., Mandal, S. K. (2016). Purification, biochemical characterization and structural modelling of alkali-stable β -1,4-xylan xylanohydrolase from *Aspergillus fumigatus* R1 isolated from soil. *BMC Biotechnology* 16, 11
- Diaz, G., Soriano, J., Augur, C., Viniegra, G. (2001). Exopectinases produced by *Aspergillus niger* in solid-state and submerged fermentation: a comparative study. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 26, 271-275.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28, 350-356.
- Eichlerova, I., Homolka, L. (2014). Preservation of basidiomycete strains on perlite using different protocols. *Mycoscience* 55, 1-10.
- Ertan, I.F., Balkan, B., Yarkin, Z. (2014). Determination of the effects of initial glucose on the production of α -amylase from *Penicillium* sp. under solid-state and submerged fermentation. *Biotechnology and Biotechnological Equipment* 28, 96-101.
- Ferreira, V., Da Silva, R., Silva, D., Gomes, E. (2010). Production of pectate lyase by *Penicillium viridicatum* RFC3 in solid-state and submerged fermentation. *International Journal and Microbiology*, 276590.
- Gamarra, N., Villena, G., Gutiérrez, M. (2010). Cellulase production by *Aspergillus niger* in biofilm, solid-state, and submerged fermentations. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87, 545-51.
- Gautam, P., Sabu, A., Pandey, A., Szakacs, G., Soccol, C.R. (2002). Microbial production of extra-cellular phytase using polystyrene as inert solid support. *Bioresource Technology* 83, 229-233.
- Gómez, A., Romano, F.J., Leyva, L., Juárez, C., Ruiz, N., Galíndez, J. (2009). Biodegradation of 2,4,6-trichlorophenol in a packed-bed biofilm reactor equipped with an internal net draft tube riser

- for aeration and liquid circulation. *Journal of Hazardous Materials* 161, 1140-1149.
- Gottschalk, L.M., De Sousa, R., Teixeira, R.S., Da Silva, E.P. (2013). Efficient production of lignocellulolytic enzymes xylanase, β -xylosidase, ferulic acid esterase and β -glucosidase by the mutant strain *Aspergillus awamori* 2B 361 U2/1. *Brazilian Journal of Microbiology* 44, 569-76.
- Guindon, S., Dufayard, J.F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., Gascuel, O. (2010). Likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology* 59, 307-21.
- Harris, P.J., Stone, B.A. (2009). Chemistry and molecular organization of plant cell walls. In Himmel ME (eds). *Biomass Recalcitrance: Deconstructing the Plant Cell Wall for Bioenergy*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, United Kingdom. 61-93.
- Hernández, B., Córdova, J., Bárzana, E., Favela, E. (2009). Effects of organic solvents on activity and stability of lipases produced by thermo tolerant fungi in solid-state fermentation. *Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic* 61, 136-142.
- Hölker, U., Höfer, M. Lenz, J. (2004). Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64, 175-186.
- Hu, T., Zhou, Y., Daic, L., Wang, Y., Liu, D., Zhang, J., Liu, H. (2011). Enhanced cellulase production by solid-state fermentation with polyurethane foam as inert supports. *Procedia Engineering* 18, 335-340.
- Huson, D.H., Richter, D.C., Rausch, C., DeZulian, T., Franz, M., Rupp, R. (2007). Dendroscope: An interactive viewer for large phylogenetic trees. *BMC Bioinformatics* 8, 1-6. doi:10.1186/1471-2105-8-460.
- Ivankovic, T., Hrenovic, J., Sekovanic, L. (2010). Influence of the degree of perlite expansion on immobilization of *Acinetobacter junii*. *Biochemical Engineering Journal* 51, 117-123.
- Khatri, B.P., Bhattarai, T., Shrestha, S., Maharjan, J. (2015). Alkaline thermostable pectinase enzyme from *Aspergillus niger* strain MCAS2 isolated from manaslu conservation area, Gorkha, Nepal. *Springerplus* 9, 488.
- Klich, M.A. (2002). *Identification of Common Aspergillus species. Central Bureau Voor-Schimmel Cultures*. The Netherlands.
- Krishna C., (2005). Solid state fermentation systems-an overview. *Critical Reviews in Biotechnology* 25, 1-30.
- Lekha, P.K., Lonsane, B.K. (1994). Comparative titres, location and properties of tannin acyl hydrolase produced by *Aspergillus niger* PKL 104 in solid-state, liquid surface and submerged fermentations. *Process Biochemistry* 29, 497-500.
- Li, Y., Peng, X., Chen, H. (2013). Comparative characterization of proteins secreted by *Neurospora sitophila* in solid-state and submerged fermentation. *Journal of Bioscience Bioengineering* 116, 493-498.
- Liu, D., Zhang, R., Yang, X., Zhang, Z., Song, S., Miao, Y., Shen, Q. (2012). Characterization of a thermostable β -glucosidase from *Aspergillus fumigatus* Z5, and its functional expression in *Pichia pastoris* X33. *Microbial Cell Factories* 11, 25.
- Liu, D., Li, J., Zhao, S., Zhang, R., Wang, M., Miao, Y., Shen, Y., Shen, Q. (2013). Secretome diversity and quantitative analysis of cellulolytic *Aspergillus fumigatus* Z5 in the presence of different carbon sources. *Biotechnology for Biofuels* 6, 149.
- Mahkam, M., Vakhshouri, L. (2010). Colon-specific drug delivery behavior of pH-responsive PMAA/perlite composite. *International Journal of Science* 11, 1546-1556.
- Mata-Gómez, M., Mussatto, S.I., Rodríguez, R., Teixeira, J.A., Martinez, J.L., Hernández, A., Aguilar, C.N. (2015). Gallic acid production with mouldy polyurethane particles obtained from solid state culture of *Aspergillus niger* GH1. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 176, 1131-1140. DOI 10.1007/s12010-015-1634-y.
- Miao, Y., Liu, D., Li, G., Li, P., Xu, Y., Shen, Q., Zhang, R. (2015). Genome-wide transcriptomic analysis of a superior biomass-degrading

- strain of *Aspergillus fumigatus* revealed active lignocellulose- degrading genes. *BMC Genomics* 16, 459.
- Miller, G., Blum, R., Glennon, W., Burton, L. (1960). Measurements of carboxymethyl cellulase activity. *Analytical Biochemistry* 2, 127-132.
- Montiel, A.M., Fernández, F.J., Viniegra, G., Loera, O. (2002). Invertase production on solid-state fermentation by *Aspergillus niger* strains improved by parasexual recombination. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 102, 63-70.
- Moretti, M.S., Bocchini, D.A., Da Silva, R., Rodrigues, A., Sette, D., Gomes, E. (2012). Selection of thermophilic and thermotolerant fungi for the production of cellulases and xylanases under solid-state fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology* 43, 1062-1071.
- Mrudula, S., Murugammal, R. (2011). Production of cellulase by *Aspergillus niger* under submerged and solid state fermentation using coir waste as a substrate. *Brazilian Journal of Microbiology* 42, 1119-1127.
- Najafpour, G.D. (2007). *Biochemical Engineering and Biotechnology*. Elsevier. The Netherlands.
- Nierman WC, Pain A, Anderson MJ, Wortman JR, Kim HS, Arroyo J, Berriman M, Abe K, Archer DB, Bermejo C, Bennett J, Bowyer P, Chen D, Collins M, Coulsen R, Davies R, Dyer PS, Farman M, Fedorova N, Fedorova N, Feldblyum TV, Fischer R, Fosker N, Fraser A, García JL, García MJ, Goble A, Goldman GH, Gomi K, Griffith-Jones S, Gwilliam R, Haas B, Haas H, Harris D, Horiuchi H, Huang J, Humphray S, Jiménez J, Keller N, Khouri H, Kitamoto K, Kobayashi T, Konzack S, Kulkarni R, Kumagai T, Lafon A, Latgé JP, Li W, Lord A, Lu C, Majoros WH, May GS, Miller BL, Mohamoud Y, Molina M, Monod M, Mouyna I, Mulligan S, Murphy L, O'Neil S, Paulsen I, Peñalva MA, Perteu M, Price C, Pritchard BL, Quail MA, Rabbinowitsch E, Rawlins N, Rajandream MA, Reichard U, Renauld H, Robson GD, Rodriguez de Córdoba S, Rodríguez-Peña JM, Ronning CM, Rutter S, Salzberg SL, Sanchez M, Sánchez-Ferrero JC, Saunders D, Seeger K, Squares R, Squares S, Takeuchi M, Tekaiia F, Turner G, Vazquez de Aldana CR, Weidman J, White O, Woodward J, Yu JH, Fraser C, Galagan JE, Asai K, Machida M, Hall N, Barrell B, Denning DW. (2005). Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature* 438, 22-29. doi:10.1038/nature04332.
- Ooijskaas, L.P., Weber, F.J., Buitelaar, R.M., Tramper, J., Rinzema, A. (2000). Defined media and inerte supports: their potential as solid-state fermentation production Systems. *Trends Biotechnology* 18, 356-360.
- Osma, J.F., Toca, J.K., Rodríguez, S. (2011). Cost analysis in laccase production. *Journal Environmental Management* 92, 2907-2912.
- Pandey, A., Selvakumar, P., Soccol, C.R., Nigam, P. (1999). Solid-state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current Science* 77, 149-162.
- Pandey, A., Soccol, C.R., Larroche, C. (2008). Current Developments in Solid-state Fermentation. In: Pandey A, Laroche C, Soccol CR (Eds). *General Considerations about Solid-state Fermentation Processes*. Springer.
- Pereira, E.O., Kolotilin, I., Conley, A.J., Menassa, R. (2014). Production and characterization of in planta transiently produced polygalacturanase from *Aspergillus niger* and its fusions with hydrophobin or ELP tags. *BMC Biotechnology* 14, 59.
- Polizeli, M.L., Rizzatti, A.C.S., Monti, R., Terenzi, H., Jorge, J.A., Amorin, D.S. (2005). Xylanases from fungi: Properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 67, 577-591.
- Posada, D.J. (2008). jModel Test: phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol* 25, 1253-6.
- Raimbault, M. (1981). *Fermentation en Milieu Solide: Croissance de Champignons Filamenteux sur Substrats Amylacés*. ORSTOM. Paris.
- Ramírez-Velasco, L., Armendáriz-Ruiz, M.A., Arrizon, J., Rodríguez-González, J.A., Mateos-Díaz, J.C. (2016). Liberation of caffeic acid from coffee pulp using an extract with chlorgenate esterase activity of *Aspergillus ochraceus* produced by solid-state fermentation.

Revista Mexicana de Ingeniería Química 15, 503-512.

Advances in Pharmacy Biology and Chemistry 2, 595-599.

- Rodríguez, L.V., Contreras, J.C., Rodríguez, R., Prado, L.A., Aguilar, C.N. (2011). Optimization of tannase production by *Aspergillus niger* in solid-state packed-bed bioreactor. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 21, 960-967.
- Rodríguez, S. (2012). A promising inert support for laccase production and decolouration of textile wastewater by the white-rot fungus *Trametes pubescens*. *Journal of Hazardous Materials* 233, 158-162.
- Sapna, Singh, B. (2014). Phytase production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation and its applicability in dephytinization of wheat bran. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 173, 1885-95.
- Shah, A., Madamwar, D. (2005). Xylanase production under solid-state fermentation and its characterization by an isolated strain of *Aspergillus foetidus* in India. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 21, 233-243.
- Sharma, A., Satyanarayana, T. (2012). Production of acid-stable and high-maltose-forming α -amylase of *Bacillus acidicola* by solid-state fermentation and immobilized cells and its applicability in baking. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 168, 1025-34.
- Sharma, R., Kocher, G.S., Bhogal, R.S., Oberoi, H.S. (2014). Cellulolytic and xylanolytic enzymes from thermophilic *Aspergillus terreus* RWY. *Journal of Basic Microbiology* 54, 1367-77.
- Singh, O.V., Singh, R.P. (2006). Bioconversion of grape must into modulated gluconic acid production by *Aspergillus niger* ORS-4.410. *Journal of Applied Microbiology* 100, 1114-22.
- Singhania, R.R., Sukumaran, R.K., Patel, A.K., Larroche, C., Pandey, A. (2010). Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme and Microbial Technology* 46, 541-549.
- Shobana, P., Maheswari, U. (2013). Production of cellulose from *Aspergillus fumigatus* under submerged and solid state fermentation using agricultural waste. *International Journal of*
- Souza, D.T., Bispo, A.S., Bon, E.P., Coelho, R.R., Nascimento, R.P. (2012). Production of thermophilic endo- β -1,4-xylanases by *Aspergillus fumigatus* FBSPE-05 using agro-industrial by products. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 166, 1575-85.
- Suárez, C., Nieto, I.J. (2013). Cultivo biotecnológico de macrohongos comestibles: una alternativa en la obtención de nutraceuticos. *Revista Iberoamericana de Micología* 30, 1-8.
- Suprabha, G.N., Sindhu, R., Shankar S. (2008). Fungal xylanase production under solid state and submerged fermentation conditions. *African Journal of Microbiology Research* 2, 082-086.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G. (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25, 4876-4882.
- Veana, F., Martínez, J.L., Aguilar, C.N., Rodriguez, R., Michelena, G. (2014). Utilization of molasses and sugar cane bagasse for production of fungal invertase in solid state fermentation using *Aspergillus niger* GH1. *Brazilian Journal of Microbiology* 45, 373-7
- Velasco, N., González, I., Damian, P., Gutiérrez, M. (2011). Enhanced hexadecane degradation and low biomass production by *Aspergillus niger* exposed to an electric current in a model system. *Bioresource Technology* 102, 1509-1515.
- Villegas, E., Téllez-Téllez, M., Rodríguez, A., Carreón-Palacios, A.E., Acosta Urdapilleta, M.L., Kumar-Gupta, V., Díaz-Godínez, G. (2016). Laccase activity of *Pycnoporus cinnabarinus* grown in different culture systems. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 15, 703-710.
- Villena, G., Gutiérrez, M. (2012). Kinetic analysis of *Aspergillus niger* cellulase and xylanase production in biofilm and submerged fermentation. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research* 2, 805-814.

- Viniegra, G. (1997). Solid state fermentation: definition, characteristics, limitations and monitoring. In Roussos, S., Lonsane B.K., Raimbault M. Viniegra-González, G. (Eds). *Advances in Solid-State Fermentation*, Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, Chapter 2. 5-22.
- Viniegra-González, G., Favela-Torres, E. (2006). Why solid-state fermentation seems to be resistant to catabolite repression? *Food Technology and Biotechnology* 44, 397-406.
- Wang, M., Mua, Z., Wang, J., Houa, S., Hana, L., Donga, Y., Xiao, L., Xia, R., Fang, X. (2013). The identification of and relief from Fe³⁺ inhibition for both cellulose and cellulase in cellulose saccharification catalyzed by cellulases from *Penicillium decumbens*. *Bioresource Technology* 133, 507-512.
- Wang, R., Law, R.C.S., Webb, C. (2005). Protease production and conidiation by *Aspergillus oryzae* in flour fermentation. *Process Biochemistry* 40, 217-227.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J.W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications*. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (Eds). Academic Press. New York. 315-322.
- Yañez, G., Sanchez, E., Jiménez, G.A., Penninckx, M., Ortiz, M.L. (2009). Removal of two organophosphate pesticides by a bacterial consortium immobilized in alginate or tezonle. *Journal of Hazardous Materials* 168, 1554-1561.