

Fermentación de residuos de café con *Aspergillus Niger* para la producción de celulasa

Fermentation of coffee residues with *Aspergillus Niger* for the production of cellulase

Edwar Luis Lizarraga Alvarez^{1*}, Deblyn Manuel Haro Dominguez^{2a} y Lidia Estefy Cordova Valles^{2b}

¹Centro Ecuaménico de Promoción y Acción Social Norte, Trujillo, Perú. Email: luised.1690@gmail.com

²Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo, Perú

^a Email: deblyn_96@hotmail.com

^b Email: estefycordovalles@gmail.com

* Autor de correspondencia

Resumen

Se realizó el estudio para la producción de celulasa a partir de *aspergillus niger*, con el objetivo de aprovechar los residuos de café (Broza) después de ser filtrado como sustrato, para el acondicionamiento de la fermentación en estado sólido (SSF) y fermentación sumergida (SmF). Se recolectó la broza y se secó en una estufa hasta peso constante (6 -8% de humedad), se realizó un lavado con agua desionizada y se agregó una solución al 3% (p / v) de NaOH 1,0 M diluido en etanol, la broza se colocó en la autoclave por 30 minutos a 121°C, se enjuagó con agua desionizada, la fracción sólida y se llevó a estufa por 40°C hasta peso constante. Seguidamente, se pasó por un tamiz N°70, se envasó en frascos con tapa hermética y se almacenó a temperatura ambiente. Para la SSF y SmF se usaron matraces Erlenmeyer de 250 ml, que contenían 10 g de broza y 15 ml de agua destilada, 10 g de broza y 100 ml de medio de fermentación respectivamente, se esterilizo la solución a 121°C durante 15 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se añadió 1 ml de inóculo y se incubó a 28°C en un agitador rotatorio a 250 rpm. Se logró producir en

SSF 92,500 FPU/ml y para SmF 78,7234 FPU/ml a 5.5 de pH. En consecuencia, estos resultados brindan una estrategia del aprovechamiento de la broza de café como sustrato para la producción de celulasa utilizando *Aspergillus niger*.

Palabras clave: celulasa, *Aspergillus niger*, broza de café

Abstract

The study was carried out for the production of cellulase from *Aspergillus niger*, with the objective of taking advantage of the coffee residues (Broza) after being filtered as a substrate, for the conditioning of the solid state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SmF). The chaff was collected and dried in an oven to constant weight (6-8% humidity), a washing was carried out with deionized water and a 3% (w / v) solution of NaOH 1.0 M diluted in ethanol, the chaff was placed in the autoclave for 30 minutes at 121 ° C, rinsed with deionized water, the solid fraction and taken to an oven at 40 ° C until constant weight. Subsequently, it was passed through a No. 70 sieve, packaged in bottles with a hermetic lid and stored at room temperature. For SSF and SmF, 250 ml Erlenmeyer flasks were used, containing 10 g of chaff and 15 ml of distilled water, 10 g of chaff and 100 ml of fermentation medium respectively, the solution was sterilized at 121°C for 15 minutes and allowed to cool to room temperature. 1 ml of inoculum was added and incubated at 28 ° C on a rotary shaker at 250 rpm. It was possible to produce 92,500 FPU / ml in SSF and 78.7234 FPU / ml for SmF at pH 5.5. Consequently, these results provide a strategy for the use of coffee chaff as a substrate for the production of cellulase using *Aspergillus niger*.

Keywords: cellulase, *Aspergillus niger*, coffee chaff

Introducción

Durante las últimas décadas, el agotamiento de los combustibles fósiles no renovables junto al aumento de la contaminación ambiental se ha convertido en un problema agudo que incluye la recolección y eliminación de los residuos biodegradables ; generando la necesidad de buscar fuentes alternativas de energía (Alvira *et al.*, 2010).

Uno de estas fuentes prometedoras son los residuos de café (CR) lo cual se genera a partir del proceso de tostado y es uno de los residuos más abundantes del mundo. Este residuo genera pérdidas económicas y problemas de gestión en su

eliminación, causando un peligro ambiental en el ecosistema (Leifa et al., 2000; Choi et al., 2012b, Leifa et al., 2000, Choi et al., 2012a).

La cantidad de residuo generada en forma de broza húmeda de café es considerablemente alta y por ello es necesario encontrar alternativas para su revalorización. Así mismo estos subproductos están siendo reutilizados como sustratos ideales para la fermentación microbiana, debido a la biomasa que posee componentes lignocelulósica rica en polímeros de celulasa y hemicelulasa entre 75-80%, los cuales pese a su dificultosa degradación, es posible mediante procesos químicos, físicos y/o biológicos desdoblarlos a azúcares monosacáridos constituyentes (Riaño *et al.*, 2010).

Por ende, el interés en el uso de biomasa lignocelulósica que presenten menos contaminantes y sea renovable para la producción de biocombustibles se ha incrementado debido a su abundancia, fácil disponibilidad y bajo costo (Ye *et al.*, 2016); por ello se está reutilizando residuos agrícolas, como la cascarilla o cisco de café ya que es prácticamente lignocelulosa; sin embargo, el principal impedimento para la utilización de la cascarilla de café es la falta de un desarrollo tecnológico que genere un alto rendimiento y un bajo costo para degradar la fracción recalcitrante de la biomasa lignocelulósica (Sugimoto *et al.*, 2008). Además biomasa lignocelulósica comprende de procesos de pre tratamiento de biomasa, hidrólisis enzimática y fermentación junto con procesos posteriores como la separación del producto (Mohapatra *et al.*, 2018).

La implementación de procesos de pre tratamiento de biomasa permiten producir eficientemente enzimas celulasa y hemicelulasa que resulta en la producción máxima de azúcares fermentables con compuestos inhibidores mínimos para producción eficiente de bioetanol (Jönsson *et al.*, 2013). La hidrólisis enzimática permite convertir carbohidratos poliméricos como celulosas y hemicelulosas en biomasa lignocelulósica en azúcares monoméricos se lleva a cabo por la enzima celulasas y hemicelulasas producidas por microorganismos. Las celulasas que son principalmente responsables de la conversión de celulosa son producidas por microorganismos que poseen la maquinaria enzimática necesaria para convertirla en biomasa en azúcares simples. De los muchos microorganismos que degradan la biomasa, los hongos juegan un papel importante en la agroindustria, los hongos filamentosos en su mayoría generan radicales hidroxilo que atacar la pared celular de la planta a través de poderosas reacciones de oxidación o producir altas actividades celulólicas (endoglucanasas, exoglucanasas o celobiohidrolasas y β -glucosidasas) enzimas (Yarbrough *et al.*, 2017). Aunque las preparaciones de celulasa de especies de *Trichoderma* son comercialmente disponibles, carecen de los niveles significativos de actividad de β -glucosidasa y,

por lo tanto, el sistema enzimático enfrenta la inhibición de la retroalimentación. Por otro lado, especies de *Aspergillus* reportados por diversos autores indican una buena presencia de actividad de celulasa y β -glucosidasa (Gusakov, 2011). Por lo tanto, diferentes microorganismos difieren en diversos componentes especiales para la producción de enzimas que pueden ser esenciales en la sacarificación de biomasa (Gusakov, 2011)..

Además, muchos autores se han centrado únicamente en la producción de enzimas celulasa de diversos microorganismos y han investigado su actividad celulolítica. Sin embargo, su la capacidad de sacarificación también necesita ser evaluada ya que la sacarificación enzimática no es únicamente depende de la actividad de la enzima pero también de varios parámetros : temperatura ,pH, presión, entre otros (Jönsson *et al.*, 2013).

Los medios más utilizados en las fermentaciones de celulasa generalmente contienen celulosa pura (Domingues *et al.*, 2000); el uso de sustratos lignocelulósicos crudos, sirve como una alternativa a la costosa celulosa pura, lo cual es cierto especialmente en el caso de la fermentación en estado sólido (SSF) que la hace ventajosa en comparación con la fermentación sumergida (SmF). Además, se informa que el rendimiento de celulasa es mayor en SSF en comparación con SmF (Mandal y Ghosh, 2018).

La fermentación en estado sólido (SSF) es una técnica viable para la producción de enzimas industriales y brinda una gran oportunidad para la conversión de residuos agrícolas de bajo costo (Pandey, 2003). Los residuos agroindustriales, como bagazo de caña de azúcar (SCB), paja de arroz (RS), salvado de trigo (WB) y harina de copra (CM) se han utilizado en la producción de enzimas (Karuna *et al.*, 2014).

Cunha *et al.*, (2012) emplearon SCB en fermentación secuencial de estado sólido y sumergida para la producción de celulasa por *A. niger* A12. (Kumar *et al.*, 2016) han descrito la producción de celulasa en SSF usando SCB no tratado por *Pandoraea sp.* ISTKB. Las celulasas y hemicelulasas encuentran aplicación en la hidrólisis de lignocelulosas con el objetivo de generar azúcares monoméricos fácilmente utilizables. Celluclast 1,5 L y Novozyme 188 que consisten en celulasas comerciales se usaron para hidrolizar RS (Karuna *et al.*, 2014) y SCB (Huang *et al.*, 2016) para generar glucosa y xilosa.

Por lo tanto, el presente estudio está dirigido a la producción de celulasa usando como sustrato broza de café, con pre tratamiento de NaOH para reducir el contenido de lignina; utilizando *Aspergillus niger* aislado para la producción de celulasa. Comparando la actividad enzimática en SSF y SmF durante 120 h.

Material y métodos

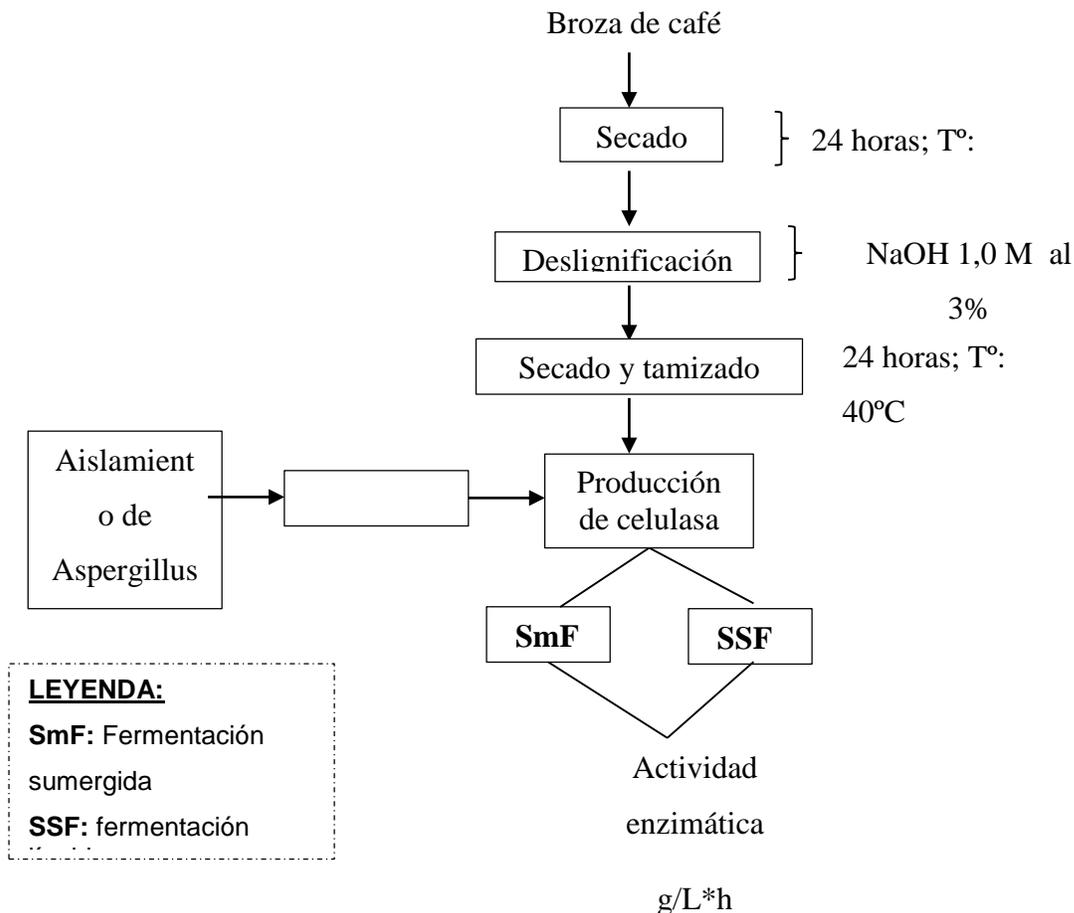
Material de estudio

Cultivo de *Aspergillus niger*, proporcionado por el Laboratorio de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Trujillo, Región La Libertad – Perú.

Broza de café, *Coffea Arabica* L., recolectados de la cafetería Starbucks (Sede: Real Plaza – Trujillo), durante el mes de noviembre de año 2017. Región La Libertad – Perú.

Figura 1

Esquema experimental



Acondicionamiento de la materia prima

Se recolectó 300 ± 15 g de broza de café en bolsas de polietileno. Realizando un análisis de humedad según el Método AOAC 1998, secando en una estufa (Memmert, BE-400, Alemania) a 40°C , hasta obtener un porcentaje de humedad constante entre 6 a 8% (González Dubón, 2015). Se lavó dos veces con agua desionizada y se agregó una solución al 3% (p / v) de NaOH 1,0 M diluido en etanol, para después ser llevado a la autoclave (marca Jsr, modelo JSAV – 40) por 30 minutos a 121°C , después del ciclo en la autoclave se enjuagó con agua desionizada hasta eliminar remanentes (Reales et al., 2016), la fracción sólida se llevó a estufa a 40°C hasta peso constante (Sánchez, 2016) con el fin de remover el agua. Seguidamente, se pasó por un tamiz N°70 (marca Fisher Scientific Company, abertura de malla $212 \mu\text{m}$), envasados en frascos de plástico (capacidad 1.5 kg) con cierre de tapa hermética y almacenados a temperatura ambiente ($25 \pm 1^{\circ}\text{C}$).

Aislamiento, selección e identificación del cultivo

El cultivo de *Aspergillus niger* se mantuvo en medio de agar papa dextrosa. Las colonias individuales se recogieron usando una aguja de inoculación y se inocularon en el medio Mandels y Reese (Mandels and Reese, 1957), que contenía sal sódica de carboximetilcelulosa (CMC-Na; en g / L: KH_2PO_4 (sigma), 2,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (sigma), 1,4; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (sigma), 0.3; CaCl_2 (sigma), 0.3; extracto de levadura (sigma), 0.4; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (sigma), 0.005; MnSO_4 (sigma), 0.0016; ZnCl_2 (sigma), 0.0017; CoCl_2 (sigma), 0.002; CMC-Na (sigma), 5.0; y agar (sigma), 15.0; pH 5.0). Después se incubaron las placas a 28°C durante 48 h, luego se tiñeron con 1% (p / v) de solución Congo-rojo (Merck) durante 15 min y se decoloraron con NaCl 1 M (sigma) durante 15 min (Teather y Wood, 1982). Las zonas de degradación eran visibles alrededor de las bacterias, lo que demuestra que las cepas podrían hidrolizar la CMC.

Preparación del inóculo

El inóculo se preparó cultivando el microorganismo en un matraz Erlenmeyer de 250 ml con 100 ml de caldo Czapek-Dox (Muiru et al., 2008) que contenía g/l de sacarosa, 30; nitrato de sodio (sigma), 3; K_2HPO_4 (sigma), 1; MgSO_4 (sigma), 0.5; KCl (sigma), 0,5; FeSO_4 (sigma), trazas; agar (sigma), 15. El medio se incubó a 28°C durante 3 días en un agitador (200 rpm) antes de ser utilizado para el proceso de fermentación, obteniendo una concentración final de 0.5 g esporas/ml inóculo.

Producción de celulasa

La fermentación sumergida (SmF)

La fermentación sumergida se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 250 ml que contenían 100 ml de medio de fermentación. La composición del medio contenía los siguientes g / l de agua destilada: Ácido L-glutámico (sigma), 0,3; NH₄NO₂ (sigma), 1,4; K₂HPO₄ (sigma), 2,0; CaCl₂ (sigma), 2,0; MgSO₄ (sigma), 0,3; peptona de proteasa (sigma), 7,5; FeSO₄ (sigma), 5,0; MnSO₄ (sigma), 1,6; ZnSO₄ (sigma), 1,4; Tween 80 (sigma), 20% (v / v); broza de café, 30. El medio se esterilizó mediante autoclave a 121 ° C durante 15 min. Cada matraz se inoculó con 1 ml del mencionado inóculo. El cultivo se incubó a 28 ° C en un agitador rotatorio (SCIOLOGEX SK-L180-Pro) a 250 rpm, monitoreando la producción de celulasas, cada día, desde el día uno hasta el día 5 (Mrudula y Murugammal,2011).

Fermentación en estado sólido (SSF)

La fermentación en estado sólido se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 250 ml que contenían 10 g de broza de café y 15 ml de agua destilada (agente humectante). Los matraces se esterilizaron a 121°C durante 15 minutos y se enfriaron a temperatura ambiente; luego, se añadió aproximadamente 1 ml de inóculo, se mezcló bien y se incubó a 28°C en un agitador rotatorio (SCIOLOGEX SK-L180-Pro) a 250 rpm, monitoreando la producción de celulasas, cada día, desde el día uno hasta el día 5 (Bansal et al., 2012).

Evaluación comparativa de los sistemas SmF y SSF para la producción de enzimas

La actividad de la celulasa [(filtro paperasa (FPase)] se analizó por triplicado de acuerdo con el método descrito por Ghose ,(1987) Una unidad de actividad enzimática (FPase) se define como la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de azúcares reductores por minuto con glucosa como estándar, en la condición de ensayo descrita anteriormente. Los valores de actividad enzimática se expresaron como U/ml para SmF y U/g de broza de café para SSF. El rendimiento de enzima producido en SmF se comparó con el rendimiento obtenido en SSF.

Análisis estadístico

Se realizó un ANOVA (Análisis de varianza) de un factor, basado en un nivel de confianza del 95 % con un valor-p de significancia de p<0.05 cada 24 horas en producción de enzimas para ambos tratamientos, para evaluar las diferencias significativas entre fermentaciones. Estos análisis se realizaron usando el programa SPSS (Statistical Programme for Social Sciences, SPPS Corporation, IL, USA) versión 22.0 para Windows.

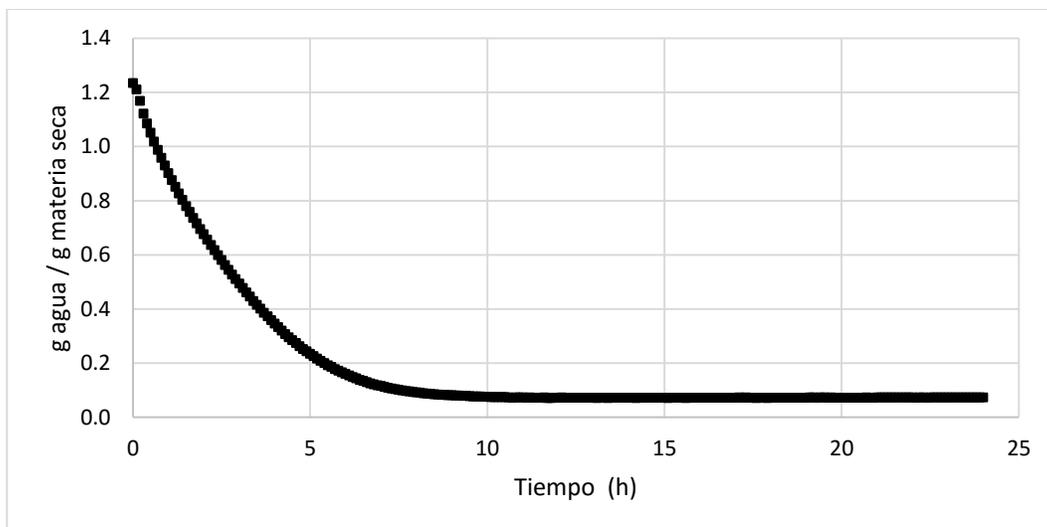
Resultados y discusión

Los residuos agroindustriales y del arte culinario, lo encontramos en grandes cantidades y a bajo costo, que alguna vez se consideraron sin valor ahora se muestran y se utilizan como uno de los componentes importantes en la obtención de altos niveles de producción de celulasa en medio sólido, disminuyendo así el costo en la producción de enzimas (Karmakar y Ray, 2010).

La broza de café recolectada fue llevada a la sede de Universidad Nacional de Trujillo (Ubicación Trujillo). Al llegar al laboratorio, se le realizó una prueba de contenido de humedad, a partir de la cual se determinó que este era de 58,76 % en base húmeda (bh) para ello se usó el determinador halógeno de humedad (A&D Company, modelo MX-50). Después de agregar la solución estéril de NaOH 1.0M al 3% (p/v) en 100 g de café se obtuvo broza de café libre de lignina al 28.81%. El secado se realizó en una estufa Memmert (Modelo: UF55PLUS). Hasta obtener una humedad constante entre 6 – 7 % (base húmeda) a 40°C durante 24 horas según lo reportado en (Cerde et al 2017). Como se observa en la figura 2, se muestra los resultados obtenidos de la pérdida de agua por cada gramo de materia seca en el proceso de secado, hasta obtener humedad constante (6.81% en base húmeda).

Figura 2

Curva de secado a 40°C ($p < 0.05$)



La curva de secado realizada comprende mayormente el periodo de velocidad constante, donde la velocidad de secado es constante y toma una forma lineal. Posterior a esta velocidad constante se llega a la humedad crítica donde la velocidad de deshidratación decrece (Fellows, 1994). Al tener una sola parte de la curva, esta no se comporta igual que la curva completa y toma la forma de una cinética de pseudo orden 1 (Labuza, 1982).

Por otro lado, a partir de la gráfica de la figura 2, se pudo obtener la velocidad de secado constante con un valor de $1.89 * 10^{-1} \frac{g \text{ agua}}{g \text{ materia seca} * h}$ similar a la reportada por (González Dubón, 2015). La configuración del *Aspergillus* afectada por diversos factores que incluyen las propiedades intrínsecas de la cepa, el tipo de inóculo y la concentración, la velocidad de agitación, y otros (El-Enshasy, et al., 2006).

En la figura 3, la concentración en el tiempo de la fermentación sólida y la fermentación líquida en el tiempo, como se puede apreciar presenta un ajuste de $R^2=0.9734$ para la fase líquida y un ajuste de $R^2= 0.9933$ para la fermentación sólida. En este proyecto la SSF la producción fue mayor a la fermentación sumergida, es probable que la toma de muestra realizada cada día tenga efecto en la biomasa que podría retrasar la estabilización del sistema, que comparado con (Kuhad, et al., 2016). La fermentación en estado sólido (SSF) ofrece ventajas importantes sobre la fermentación sumergida común como lo es la reducción de la energía reducida, alto rendimiento y una disminución de efectos inhibidores en el proceso de la producción enzimática.

Pero, a nivel industrial su empleo parece verse obstruida por cuestiones tecnológicas, dentro de ellas podemos mencionar, problemas de transferencia de calor, planteamiento del reactor o costos de esterilización (Mitchell, et al., 2006); (Pessoa, et al., 2016). Por otro lado, la fermentación sumergida otorga grandes ventajas, ya que, permite el escalamiento y el modelamiento, disminuye la viscosidad del medio en incluso se puede reutilizar para un proceso continuo, se evita el crecimiento en las paredes del biorreactor y facilita el procesamiento de salida (Znidarsic y Pavko, 2001).

A partir de la figura 3, calculamos los valores de FPU/ml (unidades de papel filtro) para la fermentación sólida determinando un valor de 92,500 FPU/ml (mililitro de solución de enzima original sin diluir), mientras que para fermentación líquida se obtuvo un valor de 78,7234 FPU/ml (mililitro de solución de enzima original sin diluir). De acuerdo con los estudios realizados por (Cerdeira, et al., 2017) quien desarrolló la operación de lote secuencial para la producción del inóculo especializado (9 ± 1 FPU/ ml) estos datos obtenidos son mucho mayores a los reportados por el autor lo que demuestra que se puede realizar una FSS óptima en

la producción de celulasa usando una mezcla inóculo sin comprometer la productividad.

Figura 3

Producción de celulasa en el tiempo, en estado sólido y líquido, a partir de Aspergillus niger, utilizando como sustrato broza de café

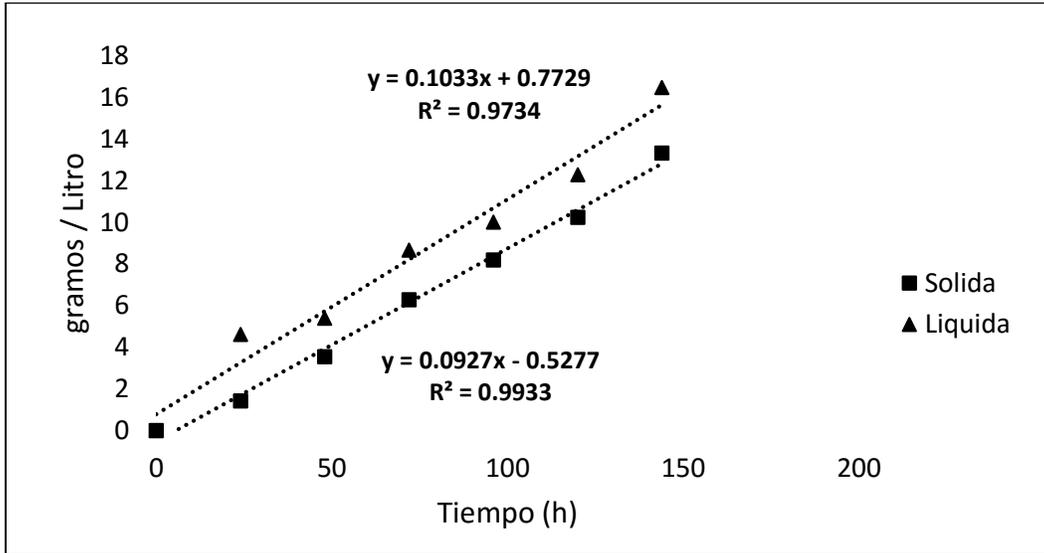
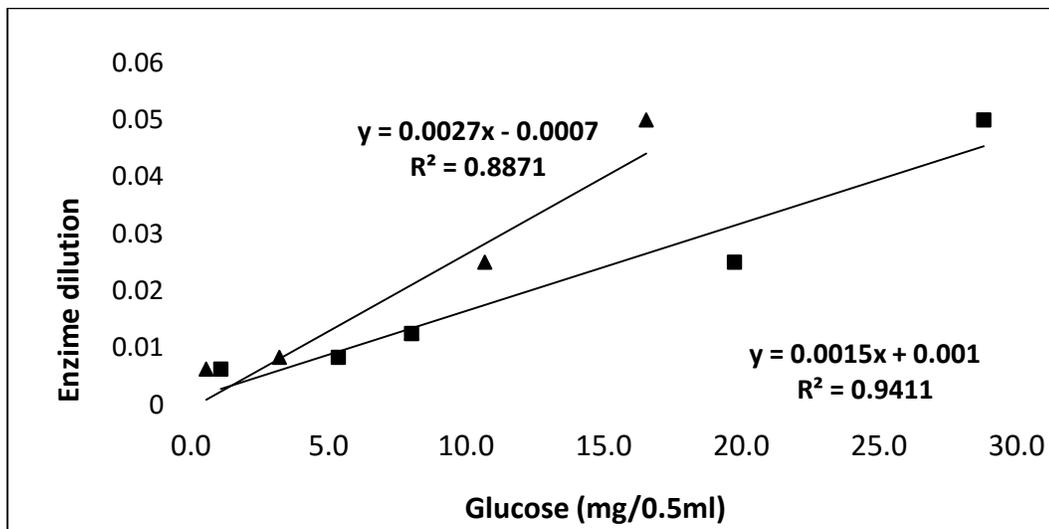


Figura 4

Curva de determinación de la concentración de enzima expresado en gramos de glucosa liberada frente a la concentración de la enzima.

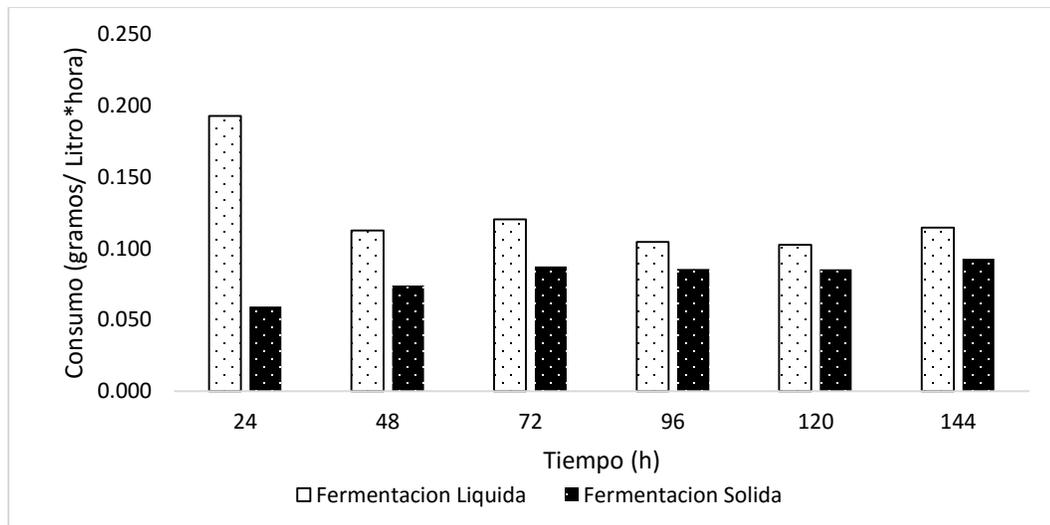


El método del papel filtro genera grandes preocupaciones sobre reproductibilidad y la precisión principalmente en cultivos con poca producción de β -glucosidasa, la falta de determinación de la actividad en la producción de celulasa estandarizada hace difícil proporcionar una comparación adecuada con los resultados obtenidos en estudios realizados (Coward-Kelly, et al., 2003). Los resultados de este trabajo son similares a los estudios reportados por Behera & Ray (2016), entre 1 y 25 FPU/ml para pequeños biorreactores en condiciones estériles y mesófitas.

Las enzimas comerciales como la celulasa derivan de los hongos *Trichoderma* y *Aspergillus* (Zhang P, et al., 2006). Pero, la cantidad obtenida de estos microorganismos es aun motivo de muchas investigaciones, ya que existen muchos componentes implicados, dentro de ellos mencionamos a medio de cultivo, que es uno de los principales componentes para el crecimiento óptimo de la enzima. De otro lado la producción en la biotecnología tiende a ser muy costosa sino se controla una buena estrategia que minimice los costos en la producción enzimática, el aprovechamiento de residuos agroindustriales (broza de café) se presenta como un sustituyente promisorio, de bajo costo y de alto rendimiento productivo (Alcarraz, 2010).

Figura 5

Consumo desde el tiempo cero hasta el tiempo 144 horas de la fermentación sólida y líquida.

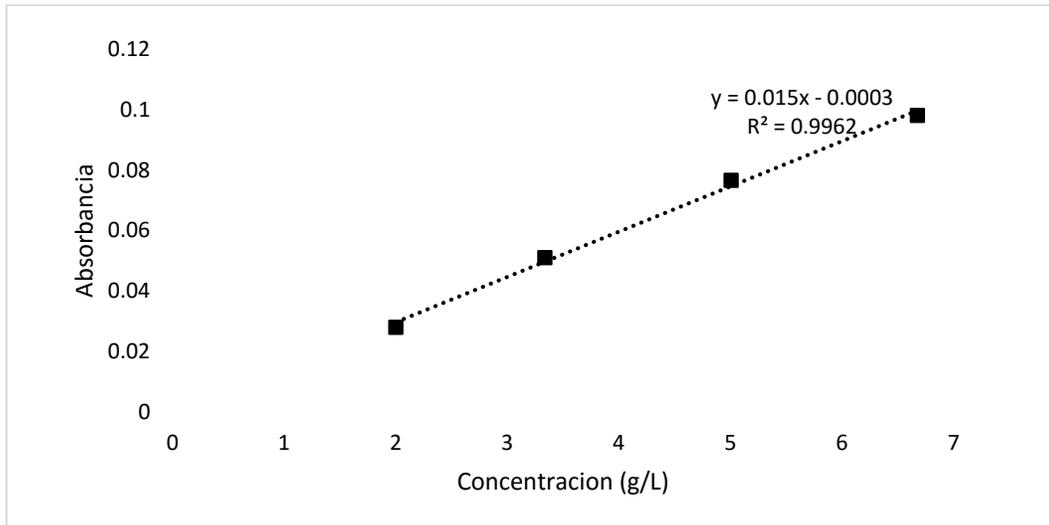


En la figura 5, se muestra el comportamiento de del consumo de sustrato en el tiempo, notamos que al inicio la fermentación sumergida obtuvo mayor consumo que la fermentación sólida y en los días siguientes se fue equilibrando, pero siempre hubo mayor consumo en la fase sumergida, esto es consecuencia de la mayor cantidad de nutrientes que presenta la fase sumergida, en donde la probabilidad de adaptación del *Aspergillus niger* se supone que fue más rápida.

Paredes *et al.*, (2010) realizaron investigaciones sobre la actividad enzimática de la celulasa (UI/g de residuo seco) obtenidas de la SSF utilizando como sustrato los residuos de banano (pseudotallo, hojas y raquis) inoculando los hongos *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius* y *Lentinula edodes* por un periodo de tiempo de 24 días de incubación, determinando que la máxima actividad enzimática de celulasas lo produjo el hongo *Lentinula edodes* en pseudotallo con valores de 8,14 UI/g de residuo seco; así mismo estableció que la temperatura optima era 50°C y pH optimo es 5,3 de la enzima. En este trabajo se realizó a una temperatura de 28° C y a un pH de 5.5 y utilizando como medio al residuo de café (broza) previamente deslignificado con una solución de hidróxido de sodio al 3% disuelto en etanol.

Figura 6

Curva de calibración ensayo de celulosa.



Antes de analizar la figura 6, se menciona mencionar que el coeficiente de correlación de ($R= 0.9962$), siendo la absorbancia directamente proporcional a la concentración debido al aumento del color

En estudios realizados, utilizando como medio de carbono al tallo de clavel molido al 3,64% en base seca, 0,5 g/L de sulfato de amonio y a un pH igual a 5, presentó las óptimas condiciones de cultivo en la obtención de celulasa, con actividades enzimáticas de 269U/L en carboximetilcelulosa utilizando una cepa nativa de *Trichoderma sp.* en sistema de matraz (Suesca, 2012).

Conclusiones

Los residuos agroindustriales se presentan como fuentes importantes para el uso como sustratos para la fermentación y producción de enzimas como la celulasa por *Aspergillus niger* bajo fermentación en estado sólido y sumergida, con vistas a desarrollar un sistema de producción de bajo costo.

El medio sólido (broza de café) sin ninguna adición de nutrientes exógenos se pudo producir cantidades óptimas de celulasa, simplemente humedeciendo el medio con agua destilada y manteniendo el pH en 5.5

Se logró producir en fermentación sólida 92,500 FPU/ml (mililitro de solución de enzima original sin diluir), mientras que para fomentación líquida 78,7234 FPU/ml (mililitro de solución de enzima original sin diluir) hasta los 6 días de incubación con agitación a una velocidad de 120rpm y un Ph de 5.5 a temperatura ambiente (25°C), usando broza de café como sustrato.

Contribución de autoría

ELLA, formulación y coordinador del artículo. DMHD, participación en la parte teórico - práctico. LECV, participación en el parte teórico – práctico.

Conflictos de interés

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses con respecto a la publicación de este artículo.

Referencias bibliográficas

- Alcarraz Curi, M., Flores Paucarima, A., & Godoy Alcarraz, J. de D. (2010). Producción de celulasas por inmovilización celular para el tratamiento de efluentes industriales lignocelulósicos. *Revista Del Instituto De investigación De La Facultad De Minas, Metalurgia y Ciencias Geográficas*, 13(26), 97–102. <https://doi.org/10.15381/iigeo.v13i26.507>
- Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M. and Negro, M. J. (2010). Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review, *Bioresource Technology*, 101(13), 4851-4861. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.093>.
- Bansal, N., Tewari, R., Soni, R. and Soni, S. K. (2012). Production of cellulases from *Aspergillus niger* NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues, *Waste Management*, 32(7), 1341-1346. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2012.03.006>
- Behera, S. and Ray, R. (2016). Solid state fermentation for production of microbial cellulases: recent advances and improvement strategies, *Int. J. Biol. Macromol*, 86, 656–669. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.10.090>
- Beyene, A., Yemane, D., Addis, T., Assayie, A., & Triest, L. (2014). Experimental evaluation of anaerobic digestion for coffee wastewater treatment and its biomethane recovery potential. *Int. J. Environ. Sci. Technol*, 11 (7), 1881-1886. <https://doi.org/10.1007/s13762-013-0339-4>.
- Cerda, A., Gea, T., Vargas-García, M., & Sánchez, A. (2017). Towards a competitive solid state fermentation: cellulases production from coffee husk by sequential batch operation and role of microbial diversity. *Sci. Total Environ*, 589, 56-65. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.184>
- Choi, I., Wi, S., Kim, S., & Bae, H. (2012). Conversion of coffee residue waste into bioethanol with using popping pretreatment. *Bioresour. Technol*, 125, 132-137. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.080>
- Coward-Kelly, G., Aiello-Mazzari, C., Kim, S., Granda, C., & Holtzapple, M. (2003). Suggested improvements to the standard filter paper assay used to measure cellulase activity. *Biotechnol. Bioeng*, 82, 745-749. <https://doi.org/10.1002/bit.10620>.
- Cunha, F. M., Esperança, M. N., Zangirolami, T. C., Badino, A. C. and Farinas, C. S. (2012). Sequential solid-state and submerged cultivation of *Aspergillus*

- niger on sugarcane bagasse for the production of cellulase, *Bioresource Technology*, 112, pp. 270-274. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.082>
- Domingues, F. C., Queiroz, J. A., Cabral, J. M. S. and Fonseca, L. P. (2000). The influence of culture conditions on mycelial structure and cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30. *Enzyme and Microbial Technology*, 26(5-6), 394-401. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(99\)00166-0](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(99)00166-0)
- El-Enshasy, H., Kleine, J., & Rinas, U. (2006). Agitation effects on morphology and protein productive fractions of filamentous- amentous and pelleted growth forms of recombinant *Aspergillus niger*. *Process Biochemistry*, 41: 2103-2112. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.05.024>
- Fellows, P. (1994). *Tecnología del procesamiento de los alimentos: principios y practicas*.
- Ghose, T. K. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*.
- González Dubón, M. J. (2015). *Estudio de empaque de broza de cafe deshidratada y broza de cafe escaldada y deshidratada. [Tesis de Ingeniero, Universidad de Costa Rica]*. <https://hdl.handle.net/10669/73200>
- Gusakov, A. V. (2011). Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production. *Trends in Biotechnology*, 29(9), 419-425. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.04.004>.
- Huang, Q., Yan, Q., Fu, J., Lv, X., Xiong, C., Lin, J. and Liu, Z. (2016). Comparative study of different alcoholate pretreatments for enhanced enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, 211, 464-471. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.067>.
- Jönsson, L. J., Alriksson, B. and Nilvebrant, N.O. (2013). Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnology for Biofuels*, 6(1), 16. <https://bit.ly/3umot6r>.
- Hubbell, C., & Ragauskas, A. (2010). Effect of acid-chlorite delignification on cellulose degree of polymerization. *Bioresour. Technol.*, 19, 101, 7410-7415. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.04.029>.
- Karmakar, M., & Ray, R. (2010). Extra cellular endoglucanase production by *Rhizopus oryzae* in solid and liquid state fermentation of agro waste. *Asian J. Biotechnol*, 2, 27-36. <https://dx.doi.org/10.3923/ajbkr.2010.27.36>.

- Kuhad, R., Deswal, D., Sharma, S., Bhattacharya, A., Jain, K., & Kaur, A. (2016). Revisiting cellulase production and redefining current strategies based on major challenges. *Renew. Sust. Energ. Rev.*, 55, 249–272. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.10.132>.
- Karuna, N., Zhang, L., Walton, J. H., Couturier, M., Oztop, M. H., Master, E. R., McCarthy, M. J. and Jeoh, T. (2014). The impact of alkali pretreatment and post-pretreatment conditioning on the surface properties of rice straw affecting cellulose accessibility to cellulases. *Bioresource Technology*, 167, 232-240. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.05.122>.
- Kumar, M., Singhal, A. and Thakur, I. S. (2016). Comparison of submerged and solid state pretreatment of sugarcane bagasse by *Pandora sp.* ISTKB: Enzymatic and structural analysis. *Bioresource Technology*, 203, 18-25. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.12.034>.
- Kuhad, R., Deswal, D., Sharma, S., Bhattacharya, A., Jain, K. and Kaur, A. (2016). Revisiting cellulase production and redefining current strategies based on major challenges. *Renew. Sust. Energ. Rev.*, 55, 249-272. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.10.132>.
- Labuza, T. (1982) *Shelf-life dating of foods*. Food & nutrition press.
- Leifa, F., Pandey, A. and Soccol, C. (2000). Solid state cultivation - An efficient method to use toxic agro-industrial residues. *Journal of Basic Microbiology*, 40(3), 187-197. <https://bit.ly/3kIBO5S>.
- Mandal, M. and Ghosh, U. (2018). Value Addition to Horticultural Solid Waste by Applying It in Biosynthesis of Industrially Important Enzyme: Cellulase. En Ghosh, S.K. (ed.) *Utilization and Management of Bioresources: Proceedings of 6th IconSWM 2016*. Singapore: Springer Singapore, 279-289.
- Mandels, M. and Reese, E. T. (1957). Induction of cellulase in *trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals. *Journal of Bacteriology*, 73(2), 269-278. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC289787/>.
- Mitchell, D., Berovič, M. and Krieger, N. (2006). Solid-state fermentation bioreactor fundamentals: introduction and overview. In: Mitchell, D., Berovič, M., Krieger, N. (Eds.), *Solid-State State Fermentation Bioreactors: Fundamentals of Design and Operation.*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 1-12. <https://www.springer.com/gp/book/9783540312857>.
- Mohapatra, S., Padhy, S., Das Mohapatra, P. K. and Thatoi, H. N. (2018). Enhanced reducing sugar production by saccharification of lignocellulosic biomass,

- Pennisetum species through cellulase from a newly isolated *Aspergillus fumigatus*. *Bioresource Technology*, 253, 262-272. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.023>.
- Mrudula, S. and 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. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3768773/>.
- Muiru, E. M. y. D. M. (2008). Identificación de aislados de Actinomicetos seleccionados y caracterización de sus metabolitos antibióticos. 8, 1021-1026.
- P, Z., M, H. and J., M. (2006). Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnology advances*, 24, 452-481. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.03.003>.
- Pandey, A. (2003). Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2), 81-84. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00121-3](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00121-3).
- Paredes, D., Álvarez, M., Silva, M. and Ordonez, 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 – RTE*, 23, 1: 8. <https://bit.ly/2Y2iAzE>.
- Pessoa, D., Finkler, A., Machado, A. L., & Mitchell, D. (2016). Fluid dynamics simulation of a pilot-scale solid-state fermentation bioreactor. *Chem. Eng. Trans*, 49, 49–54. <https://doi.org/10.3303/CET1649009>.
- Reales, J., Castaño, H., & Zapata, J. (2016). Evaluación de tres métodos de pretratamiento químico sobre la deslignificación de tallos de yuca. *Información Tecnológica*, 27(3), 11-22. <https://bit.ly/39DFKyD>.
- Riaño, A. M., I, S. A., J.A, G. M., Hernández, M., & Barrero, C. R. (2010). Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos. *TUMBAGA*, 1(5), 61-91. <https://bit.ly/2ZzNFet>.
- Sánchez Chinchilla, Á. E. (2016). *Cinética de secado de la broza de café*. [Tesis de Ingeniero, Universidad de Costa Rica]. <https://bit.ly/3m1KTpN>.
- Suesca, A. (2012). *Producción de enzimas celulolíticas a partir de cultivos de Trichoderma sp. con biomasa lignocelulósica*. [Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá]. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/10652>.

- Sugimoto, T., Magara, K., & H. (2008). Pretreatment for Ethanol Production Using Lignocellulosic Materials. *Forestry and Forest Products Research Institute*, 12-18.
- Teather, R. M., & Wood, P. J. (1982). Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Applied and Environmental*, 43(4), 777-780. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC241917/>.
- Yarbrough, J. M., Zhang, R., Mittal, A., Vander Wall, T., Bomble, Y. J., Decker, S. R., Himmel, M. E. and Ciesielski, P. N. (2017). Multifunctional Cellulolytic Enzymes Outperform Processive Fungal Cellulases for Coproduction of Nanocellulose and Biofuels. *ACS Nano*, 11(3), 3101-3109. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b00086>.
- Ye, W., Zhang, W., Liu, T., Tan, G., Li, H. and Huang, Z. (2016). Improvement of Ethanol Production in *Saccharomyces cerevisiae* by High-Efficient Disruption of the ADH2 Gene Using a Novel Recombinant TALEN Vector', *Frontiers in Microbiology*, 7, 1067. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01067>
- Zhang P, Himmel M, & J., M. (2006). Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnology advances*, 24, 452-481. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.03.003>.
- Znidarsic, P., & Pavko, A. (2001). The morphology of filamentous fungi in submerged cultivations as a bioprocess parameter. *Food Technology and Biotechnology*, 39:237-252. <https://bit.ly/3EVUmlr>.