

Characteristics of enzymatic additives obtained from cultures *Aspergillus niger* ANM-1 in submerged and solid state

Lenis Matute¹, Annalisse Bertsch^{1*}, Isabel Díaz²

¹Laboratorio de Biotecnología Agroindustrial, Instituto de Química y Tecnología, Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. Apartado postal 4579. Maracay 2101A, Venezuela. *bertscha@gmail.com

²Facultad de Ingeniería, Universidad Central de Venezuela, Núcleo Cagua. Telf. 0243-5507304 - 5507303 - 2465360.

Abstract

The enzymatic additives obtained in fermentation processes are commonly incorporated in the diet of monogastric animals to improve feed conversion. The purpose of this study was to obtain two enzymatic additives for animal feed by solid state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SF) by *Aspergillus niger* ANM-1 in a culture medium based on wheat bran. It was evaluated the effect of medium supplementation with various carbon sources on cellulase or endo β -1, 4-glucanases (EC 3.2.1.4) activity induction. It was noted that both types of cultivation procedures increased enzymatic activity (30.05 IU/mL (SS) and 20.85 IU/mL (SSF)) in the mediums without supplementation ($P < 0.05$). There were no statistically significant differences in the effect of level of supplementation on the processes studied. The type of fermentation used was the most influential factor. The solid state process favored enzymatic activity of *A. niger* ANM-1 ($P < 0.01$). Two multi-enzymatic additives were obtained through scaling of the fermenting processes. The additive obtained by SSF presented the highest enzymatic activities, larger content of proteins (37.49%) and lower requirements in electric power.

Keywords: *Aspergillus niger*, Endo β -1, 4-glucanases, enzymatic additive.

Características de aditivos enzimáticos obtenidos a partir de cultivos de *Aspergillus niger* ANM-1 en estados sólido y sumergido

Resumen

Los aditivos enzimáticos obtenidos en procesos fermentativos son comúnmente incorporados en la dieta de animales monogástricos para mejorar la conversión alimenticia. Este trabajo tuvo como propósito la obtención de dos aditivos enzimáticos a través de fermentaciones en estado sólido (FES) y sumergido (FS), empleando *Aspergillus niger* ANM-1 en un medio de cultivo a base de afrechillo de trigo. Se evaluó el efecto de la suplementación del medio con varias fuentes de carbono en la inducción de la actividad enzimática de celulasa o β -1,4-endoglucanasa (EC 3.2.1.4). Se observó, que para ambos tipos de cultivo la mayor actividad enzimática (30,05 UI/mL (FS) y 20,85 UI/mL (FES)) se presentó cuando no se suplementó el medio ($P < 0,05$). No se encontraron diferencias significativas en el efecto del nivel de suplementación sobre los procesos estudiados, siendo el factor de mayor influencia, el tipo de fermentación empleado. El proceso en estado sólido favoreció la actividad enzimática de *A. niger* ANM-1 ($P < 0,01$). Al efectuar el escalamiento de los procesos a fermentadores *batch* se obtuvieron dos aditivos multienzimáticos, de los cuales, el obte-

nido por FES presentó las más elevadas actividades enzimáticas, mayor contenido de proteínas (37,49%) y requirió de un menor consumo de energía eléctrica.

Palabras clave: *Aspergillus niger*, β -1,4-endoglucanasa, aditivo enzimático.

Introducción

Los costos de los ingredientes usados para la alimentación animal inciden en los sistemas de producción, por lo que existe la necesidad de incorporar materias primas alternativas de bajo precio que no desmejoren la calidad de las dietas [1]. Por ello, la incorporación de aditivos enzimáticos en la dieta de animales monogástricos es una práctica cada vez más frecuente. Esta estrategia se lleva a cabo para complementar la actividad desarrollada por las enzimas propias del tracto intestinal de los animales [2-4]. En particular, los aditivos enzimáticos que contienen celulasas pueden ser incorporados directamente al alimento de aves y porcinos, actuando en la descomposición de los materiales fibrosos y mejorando la digestión de los mismos [2-4]. En la actualidad, el mercado mundial de las enzimas se ha estimado en US\$ 430 millones, con un crecimiento anual del 5,7%. En este contexto, las enzimas hidrolasas representan el 75% de las enzimas industriales, contribuyendo las celulasas con 8% de la demanda mundial, encontrándose su mayor aplicación como aditivo, en la alimentación animal [5]. La obtención de los aditivos enzimáticos es posible mediante procesos biotecnológicos en los que se ha reportado el uso de residuos o subproductos agroindustriales como sustrato fermentable, disminuyendo la carga contaminante al ambiente [3, 4, 6]. En tal sentido, se ha reportado la obtención de aditivos a partir de desechos ricos en almidón o de afrechillo de trigo, resultando en una mejora significativa en la conversión alimenticia y una reducción del costo de producción, al incorporarlo en la dieta de pollos de engorde y cerdos en etapa de iniciación [3, 4].

El mecanismo de síntesis de las celulasas o β -1,4-endoglucanasas (EC 3.2.1.4) de origen microbiano, es un fenómeno complejo que depende de muchos factores, considerándose la inducción y la represión catabólica los más importantes en la regulación de este proceso. En consecuencia, varios trabajos se han llevado a cabo para estudiar el efecto del uso de diferentes fuentes de carbono en la producción de celulasas como: paja

de arroz, celulosa, glucosa, carboximetilcelulosa, almidón de residuos de papas, almidón soluble de papas, afrechillo de trigo, entre otros [5, 7-11]. De igual forma, se han empleado diversos microorganismos tales como: *Aspergillus fumigatus*, *Trichoderma reesei* y/o *Aspergillus niger*, en procesos fermentativos para la obtención de estas enzimas [3, 8, 11, 12]. Estos estudios se enfocan en general en la etapa de fermentación y existe muy poca información acerca de las propiedades enzimáticas del producto final o aditivo. Es por ello, que este trabajo tiene como propósito la obtención y caracterización de dos aditivos enzimáticos empleando *Aspergillus niger* ANM-1 en un medio de cultivo a base de afrechillo de trigo para evaluar el efecto del tipo de fermentación (sólido (FES) y sumergido (FS)) y de la suplementación del medio con varias fuentes de carbono para la inducción de la actividad enzimática de celulasas o β -1,4-endoglucanasas.

Parte experimental

Microorganismo

Se utilizó el aislado de *Aspergillus niger* ANM-1, obtenido de granos de maíz, perteneciente al cepario del Laboratorio de Microbiología del Instituto de Química y Tecnología de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela [13]. La cepa fue conservada a 4°C y propagada en cuñas de agar papa dextrosa (PDA).

Medio de cultivo y condiciones del proceso fermentativo en matraces

Se empleó como sustrato un medio a base de afrechillo de trigo. Asimismo, se utilizaron cinco fuentes de carbono suplementarias a distintos niveles de sustitución (5%, 10% o 15%). Estas fuentes suplementarias de carbono fueron escogidas para la prueba, por su disponibilidad y por la capacidad reportada como fuentes inductoras de celulasas: residuos de pasta húmeda, residuos de papas (ambos residuos fueron provistos por industrias locales), almidón soluble (Sigma S 9765),

carboximetilcelulosa (CMC, Sigma C 4146) y celulosa microcristalina (Macherey-Nagel 81529). En el proceso de FES, se ajustó la humedad del proceso a 85% usando una solución salina compuesta por: CaCO_3 , 0,5 g/L; $\text{MgSO}_4 + 7\text{H}_2\text{O}$, 5 g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 g/L; KH_2PO_4 , 2 g/L y extracto de levadura, 2 g/L a pH 4,27 (Hanna 8417 Instruments®, México). Mientras que en el proceso de FS, se utilizó una concentración de 50 g de sustrato/L de solución salina. El proceso fermentativo fue llevado a cabo por triplicado para cada tratamiento, en matraces de 500 mL de capacidad, esterilizados a 121°C durante 15 minutos. Se inoculó el sustrato, a temperatura ambiente, empleando una suspensión al 10% de esporas de *A. niger* ANM-1 obtenida mediante el raspado de la superficie de una cuña de PDA con colonias en crecimiento, adicionando agua destilada estéril y filtrando el producto resultante para eliminar restos de micelio y conidióforos. Los matraces inoculados se introdujeron en una cámara de fermentación a 37 °C durante 7 días, para la FES. En tanto que la FS fue llevada a cabo durante un lapso de 64 horas, a 37 °C y con agitación a 300 rpm.

Actividad β -1,4-endoglucanasa

Se determinó la actividad de la enzima celulasa (β -1,4-endoglucanasa) utilizando el método espectrofotométrico reportado por Olmos [14], en el que a 1 mL de una solución de carboximetilcelulosa al 1% en *buffer* citrato-fosfato 0,05 M a pH 4,8 se le adicionó 1 mL de extracto enzimático y se incubó, control y testigo (sin caldo enzimático), durante 30 min a 50°C. La reacción fue detenida con 1 mL de ácido 3,5-dinitro-salicílico [15]. Luego de enfriar se incorporaron 8 mL de agua destilada y se midió la absorbancia de los azúcares reductores liberados a una longitud de onda de 575 nm. La actividad celulolítica se expresó en Unidades Internacionales (UI/mL), las cuales se definen como la cantidad de enzima que es capaz de liberar 1 μmol de glucosa por minuto por cada mililitro de extracto enzimático.

Obtención del aditivo enzimático

Posteriormente se efectuó el escalamiento en un fermentador de bandejas para la FES y en un fermentador Microferm New Brunswick Scientific, EUA, con 7 L de capacidad para el proceso en

sumergido, a 37°C, agitación a 300 rpm y aireación de 2vvm, empleando el sustrato que presentó la más elevada actividad celulolítica. Además, se monitoreó la variación en el pH, la concentración de azúcares en el medio y la actividad de la β -1,4-endoglucanasa, en los sustratos fermentados [14-16].

Los sustratos fermentados fueron recolectados y sometidos a deshidratación en un secador de bandeja Proctor Schwartz (Philadelphia-EUA) a 50°C, hasta que alcanzaron peso constante. Por último, el material deshidratado fue molido para producir el aditivo enzimático, el cual fue analizado bromatológicamente para conocer su composición en: humedad, proteína bruta, cenizas, grasa bruta y fibra bruta [17]. Asimismo, se determinaron las actividades de las enzimas α -amilasa, glucoamilasa, β -1,4-endoglucanasa [14], fitasa [18] y xilanasa [19] en los aditivos obtenidos. Adicionalmente, se midió el consumo de energía eléctrica en cada uno de los procesos de fermentación [20].

Análisis estadístico y diseño experimental

Se utilizó un diseño anidado en el que se evaluó el efecto sobre la actividad celulolítica del uso de diferentes fuentes suplementarias de carbono (residuos de pasta húmeda, residuos de papas, almidón, CMC y celulosa), a distintos niveles de sustitución (5%, 10% y 15%) en el medio de cultivo a base de afrechillo de trigo, así como del método fermentativo (Fermentación sumergida (FS) o sólida (FES)) empleado en la obtención del aditivo enzimático. Los resultados fueron analizados mediante un ANAVAR y se compararon las medias de los tratamientos (0%, 5%, 10% y 15% de sustitución) usando la prueba de comparación de medias de mínimas diferencias significativas de Fisher a un nivel de confianza del 95%, utilizando los programas de computación SYSTAT 7.0 y MATLAB.

Resultados y discusión

Efecto de diferentes fuentes suplementarias de carbono sobre la actividad de la β -1,4-endoglucanasa

Las pruebas estadísticas (Tabla 1) señalan que la actividad de la β -1,4-endoglucanasa fue influenciada de manera altamente significativa

($P < 0,01$) por el tipo de fermentación empleada y la fuente de carbono suplementada, mientras que los niveles de suplementación empleados no ejercieron influencia alguna sobre la actividad de esta enzima. En general, la prueba de Fisher demostró que la actividad de la enzima β -1,4-endoglucanasa fue 35,33% superior en la FES, con respecto a la FS (Figura 1a).

En el proceso en sumergido, la prueba de Fisher demostró la existencia de 2 grupos homogéneos, en donde el tratamiento con afrechillo de trigo sin suplementación se diferenció significativamente ($P < 0,05$) de los demás tratamientos estudiados (Figura 1b). Con respecto a la FES, se observaron 3 grupos homogéneos, diferenciándose significativamente ($P < 0,05$) el tratamiento en el que se empleó afrechillo de trigo sin suplementación y el tratamiento suplementado con almidón, del resto de los tratamientos estudiados (Figura 1c). En la experiencia se observó, que aún cuando la CMC y la celulosa son conocidos como inductores en la generación de enzimas celulasas

[10, 21], no se evidenció este efecto. En este sentido, otros autores señalan que un bajo nivel de celulasas en el medio de cultivo, puede ser atribuido a la represión en la síntesis de estas enzimas, debido a la acumulación de subproductos en el medio, como la celobiosa a causa de la degradación de los sustratos celulósicos [11, 22, 23]. Por otra parte, la adición de otras fuentes de carbono más fácilmente metabolizables por el microorganismo, tales como los sustratos amiláceos, podrían haber favorecido la síntesis de enzimas amilolíticas, afectando la producción de β -1,4-endoglucanasa [7, 10, 23]. No obstante, este comportamiento no se corresponde a lo observado en el tratamiento suplementado con almidón (Figura 1c). La actividad de las celulasas obtenidas en la FES podría estar interrelacionada con la inducción de actividades de amilasas y xilanasas debido a la complejidad del sustrato a degradar (afrechillo). Durante este proceso se liberan azúcares como la xilosa y maltosa (por estar suplementado con almidón), reportados como inductores de la actividad de xi-

Tabla 1
Resultado del ANAVAR para la actividad de la β -1,4-endoglucanasa

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Cuadrados medios	F	P
Tipo de fermentación	296,67	1	296,67	6,56	0,034
Fuente de carbono suplementada	362,04	8	45,25	5,64	0,001
Nivel de suplementación	160,58	20	8,03		
Total	819,28	29			

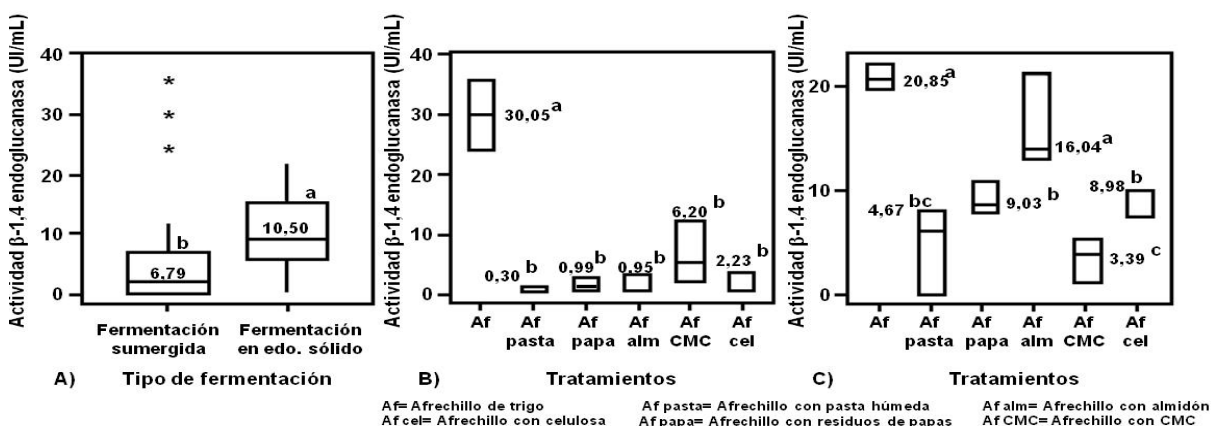


Figura 1. Diagrama de caja para la actividad β -1,4-endoglucanasa de acuerdo al tipo de fermentación (A) y en los tratamientos estudiados en FS (B) y en FES (C). Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$) según la prueba de Fisher.

lanasas [24]. Estudios han revelado que la actividad de las hemicelulasas (xilanasas) y celulasas se encuentra bajo el control del mismo regulador transcripcional *XlnR* en *A.niger* [25].

En ambos procesos, el sustrato con afrechillo de trigo como única fuente de carbono fue el más adecuado para inducir la síntesis de celulasas [10]. Al respecto, se ha afirmado que la composición proximal del afrechillo de trigo parece favorecer la inducción de la síntesis de diversas enzimas, por lo que éste es usado en la producción de celulasas, amilasas y xilanasas [10, 26].

Proceso fermentativo

Sobre la base de los resultados obtenidos en los procesos fermentativos, se efectuó el escalamiento a fermentadores *batch*. La FS se realizó durante 30 horas, comenzando con un pH de 4,82 el cual disminuyó hasta 3,76 al final del proceso. Este efecto podría deberse a la acumulación de ácidos orgánicos en el cultivo como consecuencia de la actividad del hongo al degradar el sustrato [27]. En cuanto al contenido de azúcares en el medio se determinaron concentraciones entre 14 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$ y 35 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$, en las primeras 20 horas de fermentación, alcanzándose la máxima concentración en azúcares a las 26 horas del proceso con 3.038 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$ (Figura 2a).

En cuanto a la FES, esta fue llevada a cabo durante 7 días y registró un valor promedio de pH de 5,8. En el sustrato inoculado se determinó que el pH al inicio de la fermentación fue de 5,6, alcanzando un valor de 6,15 al final de la misma, probablemente a causa de la liberación de grupos

aminos que resulta en un incremento del pH al transcurrir un mayor tiempo de fermentación con respecto a la FS [8, 9]. La concentración de azúcares al día cero (0) fue de 13,5 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$, la disponibilidad de éstos desde el inicio del proceso quizás se deba a que en la FES el microorganismo crece en una matriz sólida lo que le permite fácil acceso a las partículas que lo componen [28]. En este proceso se registró el contenido de azúcar más alto (57,28% de incremento) al tercer día de incubación, 31,6 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$ (Figura 2b).

En cuanto a la actividad enzimática, la Figura 3 muestra como al séptimo día del proceso fermentativo en sólido se obtuvo la mayor actividad β -1,4-endoglucanasa (34,42 UI/mL), mientras que en la FS se determinó que 7,04 UI/mL fue la más elevada actividad de esta enzima (30 horas). Adicionalmente, se observó en los días finales de incubación, que a medida que disminuyó el contenido de azúcares en el sustrato, a causa del consumo de los mismos por parte del hongo, se incrementó la actividad de la β -1,4-endoglucanasa en ambos procesos [11].

Caracterización de los aditivos enzimáticos

A partir del procesamiento del caldo de cultivo se obtuvieron dos aditivos deshidratados cuyos rendimientos fueron de 2,7% y 65% para FES y FS, respectivamente. El análisis estadístico de la composición proximal efectuado a estos aditivos mostró que son significativamente diferentes en su composición excepto en el contenido de fibra (Tabla 2), lo cual sugiere que el tipo de fermen-

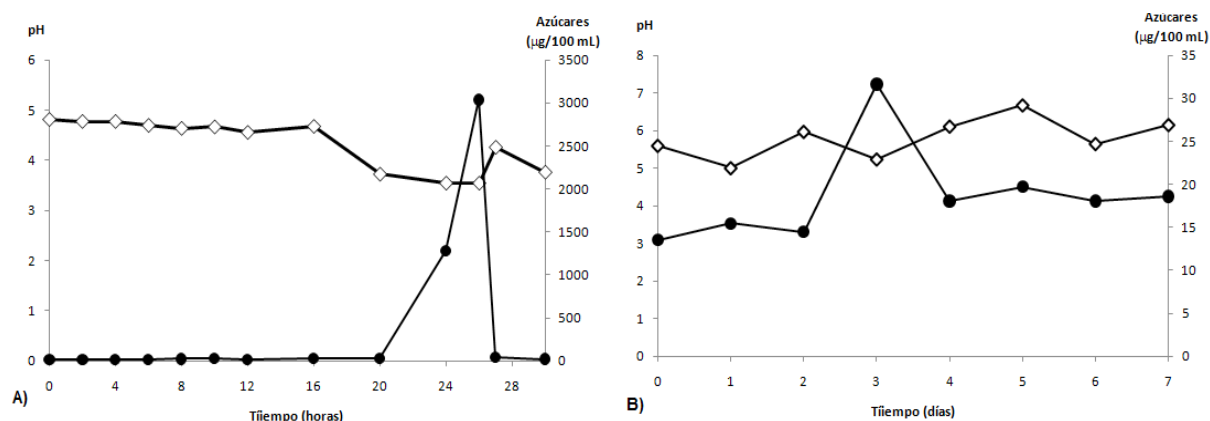


Figura 2. Variación del pH (\diamond) y la concentración de azúcares (\bullet) durante la FS (A) y la FES (B).

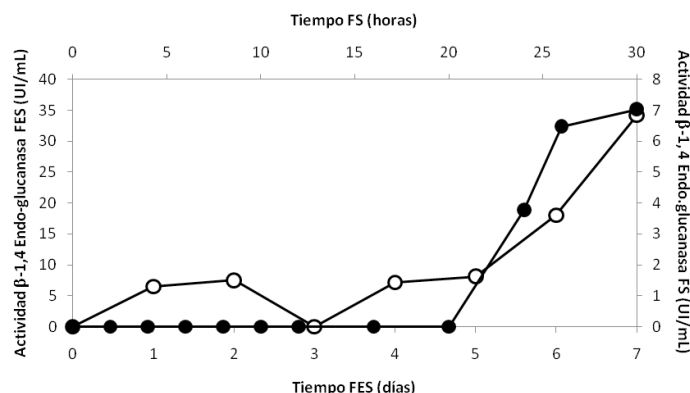


Figura 3. Cinética para la actividad β-1,4-endoglucanasa durante la FES (○) y la FS (●).

Tabla 2
Composición bromatológica y actividad enzimática de los aditivos

	Aditivo enzimático FES	Aditivo enzimático FS	Afrechillo de trigo
Humedad (%)	6,30±0,05**	5,85±0,05**	9,61±0,32
Proteína cruda (%) ^{bs}	37,49±0,77*	29,16±1,14*	19,02±0,68
Extracto etéreo (%) ^{bs}	1,47±0,30*	6,81±0,31*	3,28±0,37
Cenizas totales (%) ^{bs}	11,98±0,46*	3,15±0,09*	5,53±0,37
Fibra cruda (%) ^{bs}	17,90±1,55	21,15±1,18	10,57±0,49
β-1,4-endoglucanasa (UI/g)	535,62±36,78	376,79±47,08	-
α-Amilasa (UA/g)	1.431,90±20,65**	572,36±45,93**	-
Glucoamilasa (UI/g)	3.442±199,44	1.421,60±150,80	-
Xilanas (BXU/g)	419,81±48,82*	135,90±3,02*	-
Fitasa (UI/mL)	5.764,80±16,97*	1.195,00±18,03*	-

^{bs}= valores expresados en base seca. UI = Unidades Internacionales. UA= Unidades Amilolíticas. BXU = Unidades de Xilanas (corresponden a 1 nmol de xilosa en 1 segundo bajo las condiciones del análisis).

* = Indica que existen diferencias estadísticas altamente significativas (P>0,01).

** = Indica que existen diferencias estadísticamente significativas (P>0,05).

tación empleada influye en las características del producto final.

Por otra parte, el contenido de proteína cruda en los aditivos enzimáticos son superiores en 97,1% en la FES y en 53,31% para FS, con respecto al afrechillo de trigo. Algunos investigadores afirman que este incremento es atribuible al crecimiento del hongo en el medio de cultivo, ya que la estructura celular de este moho presenta un alto contenido de proteínas [29, 30]. Así mismo, es importante resaltar que el contenido proteico en el aditivo obtenido por FES es superior en 26,16% al compararlo con el otro producto fermentado. Además, se observa que el contenido en fibra

cruda en los aditivos supera en 41% (FES) y en 50% (FS) con respecto al afrechillo de trigo. Este resultado coincide con lo reportado en otros trabajos, en donde se obtuvo un mayor contenido de fibra en el sustrato fermentado con respecto a la materia prima empleada en la fermentación [31, 32]. La razón de este incremento puede deberse a que en la pared celular de hongos y bacterias existen polisacáridos análogos a la celulosa, tal como la quitina, el cual es el segundo polisacárido en abundancia en la naturaleza y está conformado por unidades de N-acetil-glucosamina con enlaces β-1,4-glicosídicos, lo cual podría haber influido en los valores de las fracciones de fibra reportadas

en este trabajo, tomando en cuenta el aporte de biomasa fúngica en el producto [33, 34].

Tal como se señaló previamente, en el proceso fermentativo se lleva a cabo la inducción de diversas enzimas por *A. niger* lo cual se confirma en las diferentes actividades obtenidas en los aditivos tales como: α -amilasa, glucoamilasa, xilanasa, fitasa y β -1,4-endoglucanasa, las cuales le confieren a los aditivos las características de un producto multienzimático. Al respecto, se ha señalado que utilizar aditivos que contengan estas enzimas ofrece mejores resultados ya que podría ocurrir un efecto sinérgico entre estas y esto contribuiría a disminuir los requerimientos de mantenimiento y a reducir los efectos de los compuestos anti-nutricionales en la dieta de pollos y cerdos [1, 3]. Asimismo, se observó en los resultados que el producto de la FES presenta actividad α -amilasa (61%), xilanasa (68%) y fitasa (80%), significativamente superiores a las del aditivo obtenido por FS. Con respecto a la actividad β -1,4-endoglucanasa, aunque no hay diferencias significativas ($P > 0,05$), la actividad enzimática en el producto elaborado en la FES supera en 30% a la del producto obtenido por FS. La medición del consumo de energía eléctrica durante el procesamiento de los aditivos evidenció un gasto energético 44% menor empleando la FES, lo que sugiere que el aditivo obtenido por FES presentaría mayores ventajas desde el punto de vista de la calidad del producto y su contribución con el uso eficiente de la energía.

Conclusiones

La escogencia en los procesos biotecnológicos del tipo de fermentación (FS y FES) a emplear resultó el principal factor de importancia sobre la inducción de la actividad de la β -1,4-endoglucanasa durante el cultivo de *A. niger* ANM-1, así como en las propiedades fisicoquímicas y enzimáticas de los aditivos obtenidos en este trabajo. Finalmente, la FES ofrece una alternativa amigable con el ambiente para la obtención de productos destinados a la alimentación animal y contribuiría con el uso eficiente de la energía eléctrica.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo económico al CDCH/UCV mediante el proyecto PG-01-7557-

2009/1 y a la TSU Hazel Román por su colaboración técnica.

Referencias bibliográficas

1. Palomo, A. Tendencias en alimentación porcina. I Congreso de la Asociación Nacional de Veterinarios de Porcinos. Zaragoza, España. (2008).
2. Angelovičová, M., Mendel, J., Angelovič, M. y Kačániová, M. Effect of enzyme addition to wheat based diets in broilers. Trakya Univer. J. Sci., Vol 6, No 1 (2005) 29-33.
3. Bertsch, A., Domínguez, G., Basilio, V. de, Mazzani, C., Luzón, O. y Testi, H. "Caracterización de aditivos enzimáticos obtenidos por monocultivo (*Aspergillus niger*) y cocultivo (*Aspergillus niger* - *Saccharomyces cerevisiae*) y su efecto sobre el comportamiento productivo de pollos de engorde". Rev. Fac. Cs. Vet. UCV, Vol 51, No 1 (2010) 27-35.
4. Diaz, K. Evaluación nutricional de un aditivo enzimático obtenido por fermentación microbiana de afrechillo de trigo para la alimentación de cerdos. Trabajo de Grado. Fac. Agron. Universidad Central de Venezuela. (2010).
5. Politzer, K. y Bon, E. Enzimas industriais e especiais. Prospecção no Mercado Internacional de Enzimas Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, Brasil. (2006). 580 p.
6. Lagunas, I., García, B., Castaño, E., Regalado, C. y Ávila, E. Producción de enzimas hemi-celulíticas por fermentación sólida y su aplicación en alimento balanceado para pollo de engorda. Vet. Méx., Vol 37, No 1 (2006) 1-13.
7. Gautam, S., Bundela, P., Pandey, A., Awasthi, M. and Sarsaiya, S. Effect of different carbon sources on production of cellulases by *Aspergillus Niger*. J. Appl. Sci. Environ. Sanit., Vol. 5, No 3 (2010) 295-300.
8. Colina, A., Ferrer, A. y Urribarrí, L. Producción de celulasa por *Trichoderma reesei* Rut C-30 en diferentes substratos celulósicos. Rev. Téc. Ing. Univ. Zulia, Vol. 32, No 2 (2009) 152-159.
9. Berradre, M., Mejías, M., Ferrer, J., Chandler, C., Páez, G., Mármol, Z., Ramones, E. y V. Fernández. Fermentación en estado sólido del de-

- secho generado en la industria vinícola. Rev. Fac. Agron. (LUZ), Vol 26, (2009) 398-422.
10. Fadel, M. Production physiology of cellulases and β -glucosidase enzymes of *Aspergillus niger* grown under solid state fermentation conditions. J. Biol. Sci., Vol.1, No 5 (2000) 401-411.
 11. Sherief, A., El-Tanash, A. and Atia, N. Cellulase production by *Aspergillus fumigates* grown on mixed substrate of rice straw and wheat bran. Res. J. Micr., (2010) 199-211.
 12. Papagianni, M., Nokes, S. and Filer, K. Submerged and solid-state phytase fermentation by *Aspergillus niger*: effects of agitation and medium viscosity on phytase production, fungal morphology and inoculum performance. Food Technol. Biotech., Vol. 39, No 4 (2001) 319-326.
 13. Mujica, M. Bioconversión de los residuos del procesamiento de pasta alimenticia en etanol por *Aspergillus niger* y *Saccharomyces cerevisiae*. Trabajo de Grado. Fac. Agron. Universidad Central de Venezuela. (2006).
 14. Olmos, A. Reportes de biotecnología. Biotecnología n° 5. México. (1987).
 15. Miller, G. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analyt. Chem. 31 (1959) 426-429.
 16. Comisión Venezolana de Normas Industriales. Norma 1315. Alimentos: Determinación del pH (Acidez iónica). Ministerio de Fomento. Fondonorma. Venezuela. (1979).
 17. Comisión Venezolana de Normas Industriales. Norma 1881. Alimento completo para aves. Ministerio de Fomento. Fondonorma. Venezuela. (1983).
 18. Bitar, K. and Reinhold, H. Phytase and alkaline phosphatase activities in intestinal mucosa of rat, chicken, calf and man. Biochim. Biophys. Acta 268 (1972) 442-452.
 19. Bailey, M., Biely, P. and Poutanen, K. Interlaboratory testing methods for assay of xylanase activity. J. Biotech., Vol 23 (1991) 257-270.
 20. Gómez, E. y Núñez, F. Plantas Industriales. Fac. Ing. Universidad de Carabobo. Venezuela. (2001).
 21. Abou-Taleb, K., Mashhoor, W., Nasr, S., Sharaf, M. and Abdel-Azeem, H. Nutritional and environmental factors affecting cellulose production by two strains of cellulolytic bacilli. Aust. J. Basic and Appl. Sci., Vol 3, No 3 (2009) 2429-2436.
 22. Milala, M., Shugaba, A., Guidado, A., Ene, A. and Wafar, J. Studies of the use of agricultural wastes for cellulase enzyme production by *Aspergillus niger*. Res. J. Agric. and Biol. Sci., Vol 1, No 4 (2005) 325-328.
 23. Hattakka, A. "Biological pretreatment of lignocellulose". Appl. Microbiol. Biotechnol., Vol. 18, (1983) 350-357.
 24. Martínez-Anaya, C., Balcázar-López, E., Dantán-González, E. y Folch-Mallol, J. Celulasas fúngicas: Aspectos biológicos y aplicaciones en la industria energética. Rev. Latinoam. Microbiol. Vol 50, No 3 (2008) 119-131.
 25. De Sousa, W., de Gouvea, P., Savoldi, M., Malavazi, I., de Souza, L., Goldman, M., de Castro J., Goldman, G. 2011. Transcriptome analysis of *Aspergillus niger* grown on sugarcane bagasse. Biotechnol. Biof. Vol 4, No 40 (2011) 1-16.
 26. Ikram-ul-Haq, Shahzadi, K., Hameed, U., Javed, M. and Qadeer, M. Consortia of *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride* and Biosynthesis of gluco-amylase. J. Appl. Sci. Res., Vol 2, No 9 (2006) 553-558.
 27. Sae-Lee, N. The production de fungal mannanase, cellulose and xylanase using palm kernel meal as a substrate. Walailak J. Sci. & Technol., Vol 4, No 1 (2007) 67-82.
 28. Manpreet, S., Sawraj, S., Sachin, D., Pankaj, S. and Banerjee, U. Influence of process parameters on the production of metabolites in solid-state fermentation. Malays. J. Microbiol., Vol 1, No 2 (2005) 1-9.
 29. Oshoma, C. y Ikenebormeh, M. Production of *Aspergillus niger* biomass from rice bran. Pakistan J. Nutr., Vol 4, No 1 (2005) 32-36.
 30. Pontón, J. La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. Rev. Iberoam. Micol., Vol 25 (2008) 78-82.
 31. Alvarez, M., Larrea, P. y Paredes, M. Fermentación sólida del banano de rechazo utilizando *Aspergillus niger* para alimento animal. Universidad Técnica de Ambato. Ecuador. (2006) 22 p.

32. Oseni, O. y Ekperigin, M. Studies on biochemical changes in maize wastes fermented with *Aspergillus niger*. *Biokemistri*. Vol 19, No 2 (2007) 75-79.
33. Peter, M. Chitin and chitosan in fungi. In: Steinbüchel, A. *Biopolymers*. Vol 6 (2002) 123-132.
34. Calvo, M. y Castro M. Fibra cruda y quitina en el crustáceo langostilla (*Pleuroncodes platanipes*, Stimpson): similitudes y diferencias. Universidad Autónoma de Baja California. *Ciencias Marinas*. Vol 21, No 2 (1995) 179-186.

Recibido el 5 de Septiembre de 2012

En forma revisada el 25 de Noviembre de 2013