



**Secretaría de Educación Pública**



**TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO**  
**Instituto Tecnológico de Veracruz**

**“Producción de xilanasas a partir de hongos autóctonos  
usando residuos lignocelulósicos”**

**TESIS**

**Que para obtener el grado de:**

**Maestro en Ciencias en Ingeniería Bioquímica**

**Presenta:**

**IBQ. Hiram Ramírez Lagunes**

**Asesores:**

**Dra. María Guadalupe Aguilar Uscanga**

**Dra. Beatriz Torrestiana Sánchez**

**Dra. Sandra T. Del Moral Ventura**

**H. VERACRUZ, VER.**

**Octubre 2019**

**“Producción de xilanasas a partir de hongos autóctonos usando residuos lignocelulósicos”**

Por:

**IBQ. HIRAM RAMIREZ LAGUNES**

Tesis propuesta a la

**Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos**

del

**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE VERACRUZ**

Como requerimiento parcial para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias en Ingeniería Bioquímica**

**ASESORES:**

**Dra. María Guadalupe Aguilar Uscanga**

**Dra. Beatriz Torrestiana Sánchez**

**Dra. Sandra T. Del Moral Ventura**

# DEDICATORIA

# AGRADECIMIENTOS

## RESUMEN

Ramírez Lagunes, Hiram, Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Unidad de Investigación y Desarrollo de Alimentos del Instituto Tecnológico de Veracruz. Octubre, 2019. "Producción de xilanasas a partir de hongos autóctonos usando residuos lignocelulósicos". Asesores: Aguilar Uscanga, María Guadalupe, Torrestiana Sánchez, Beatriz y del Moral Ventura Sandra Trinidad.

Las xilanasas son enzimas hidrolíticas que catalizan la degradación del xilano presente en la hemicelulosa de la pared celular vegetal, rompiendo los enlaces glicosídicos  $\beta$ -(1-4). Estas enzimas tienen un gran potencial biotecnológico en diversos procesos industriales como en la industria de los alimentos, detergentes, pulpa y papel, y actualmente, en la producción de etanol de segunda generación (2G). En este proceso estas enzimas participan en la etapa de hidrólisis enzimática transformando la hemicelulosa a azúcares fermentables; sin embargo, esta etapa constituye la parte crítica del proceso, debido a los altos costos de las enzimas comerciales y la baja disponibilidad de éstas. Por todo esto el objetivo de este trabajo fue producir xilanasas a partir de hongos autóctonos usando residuos lignocelulósicos. Para ello se llevaron a cabo los siguientes objetivos específicos: 1) Realizar el aislamiento y selección de hongos productores de xilanasas, 2) Evaluar el efecto de residuos lignocelulósicos (bagazo de caña, bagazo de sorgo y rastrojo de maíz) como fuente de carbono, y la evaluación del efecto de fuentes de nitrógeno como: sulfato de amonio, urea y extracto de levadura sobre la producción de xilanasas y 3) Optimizar la producción de xilanasas en función de la concentración de la fuente de carbono, fuente de nitrógeno, y la velocidad de agitación. Se aislaron y seleccionaron 10 hongos con actividad xilanasa, obtenidos de bagazo de caña, bagazo de sorgo dulce y residuos maderables en deterioro. La cepa que presentó mayor actividad xilanasa (1.91UI/mL) fue la codificada como BCH2 e identificada como *Aspergillus tamarii*, la cual fue seleccionada para las siguientes pruebas experimentales. De la evaluación de la fuente de carbono, el bagazo de caña fue el material donde se observó la mayor actividad xilanasa (2.9 UI/mL), 1.5 veces más que con xilano de abedul, por lo tanto, se seleccionó como el mejor sustrato para llevar a cabo la evaluación de la fuente de nitrógeno y la optimización. De la evaluación de la fuente de nitrógeno, el sulfato de amonio fue la mejor fuente de nitrógeno ya que se obtuvo un mayor efecto sobre la producción de xilanasas que con extracto de levadura y urea, se observó que en presencia de sulfato de amonio se logró aumentar de 2.9 a 5.35 (UI/mL) la actividad xilanasa, lo que representó un incremento de 1.8 veces más que antes de suplementar el medio con este nutriente. El diseño de optimización permitió incrementar la actividad de xilanasas de 5.35 a 10.9 (UI/mL), lo que representa un incremento mayor al 100%.

## ABSTRACT

Ramirez Lagunes, Hiram. Máster of Science in Biochemical Engineering. Food Research and Development Unit of the Veracruz Institute of Technology. October, 2019. Production of xylanases from native fungi using lignocellulosic residues. Advisors: Aguilar Uscanga María Guadalupe, Torrestiana Sánchez Beatriz, and del Moral Ventura Sandra Trinidad.

Xylanases are hydrolytic enzymes that catalyze the degradation of xylan present in the hemicellulose of the plant cell wall, breaking the  $\beta$ -(1-4) glycosidic bonds. These enzymes have great biotechnological potential in various industrial processes such as in the food, detergent, pulp and paper industry, and currently, in the production of second generation ethanol (2G). In this process these enzymes participate in the enzymatic hydrolysis stage by transforming the hemicellulose into fermentable sugars; However, this stage constitutes the critical part of the process, due to the high costs of commercial enzymes and their low availability. For all this the objective of this work was to produce xylanases from native fungi using lignocellulosic residues. For this, the following specific objectives were carried out: 1) Perform the isolation and selection of xylanase-producing fungi, 2) Evaluate the effect of lignocellulosic residues (cane bagasse, sorghum bagasse and corn stubble) as a carbon source, and the evaluation of the effect of nitrogen sources such as: ammonium sulfate, urea and yeast extract on the production of xylanases and 3) Optimize the production of xylanases based on the concentration of the carbon source, nitrogen source, and the stirring rate. 10 fungi with xylanase activity, obtained from cane bagasse, sweet sorghum bagasse and deteriorating timber residues, were isolated and selected. The strain that presented the highest xylanase activity (1.91IU/mL) was the one coded as BCH2 and identified as *Aspergillus tamarii*, which was selected for the following experimental tests. From the evaluation of the carbon source, cane bagasse was the material where the highest xylanase activity (2.9 IU/mL) was observed, 1.5 times more than with birch xylan, therefore, it was selected as the best substrate for carry out the nitrogen source evaluation and optimization. From the evaluation of the nitrogen source, ammonium sulfate was the best source of nitrogen since a greater effect was obtained on the production of xylanases than with yeast and urea extract, it was observed that in the presence of ammonium sulfate it was achieved increase from 2.9 to 5.35 (IU/ml) the xylanase activity, which represented an increase of 1.8 times more than before supplementing the medium with this nutrient. The optimization design allowed to increase the activity of xylanases from 5.35 to 10.9 (IU/ml), which represents an increase greater than 100%.

# CONTENIDO

<b>RESUMEN .....</b>	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>iv</b>
<b>CONTENIDO.....</b>	<b>v</b>
<b>LISTA DE TABLAS .....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS Y NOMENCLATURA .....</b>	<b>xi</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>1. ANTECEDENTES .....</b>	<b>3</b>
1.1 Enzimas .....	3
1.2 Hidrolasas .....	4
1.3 Xilanasas.....	5
1.3.1 Tipos de xilanasas .....	6
1.3.1.1 Mecanismo de acción.....	6
1.3.2 Microorganismos productores de xilanasas y celulasas.....	7
1.3.3 Uso de xilanasas .....	10
1.3.3.1 Uso de xilanasas en la producción de bioetanol 2G .....	11
1.3.4 Comercialización de xilanasas .....	11
1.4 Factores que afectan la producción de xilanasas.....	12
1.4.1 Sustrato .....	12
1.4.2 Temperatura y pH.....	12
1.4.3 Sistema de fermentación .....	13
1.4.3.1 Fermentación sumergida (SMF).....	13
1.4.3.2 Fermentación en estado sólido (SSF).....	13
1.4.3.3 Comparación entre la SSF y la SMF .....	14
1.5 Residuos lignocelulósicos .....	16
1.5.1 Bagazo de caña.....	16
1.5.2 Bagazo de sorgo dulce .....	18
1.5.3 Residuos Maderables .....	20
1.6 Materiales lignocelulósicos .....	22

1.6.1 Celulosa .....	23
1.6.2 Hemicelulosa .....	23
1.6.3 Lignina .....	25
1.7 Pretratamientos de los residuos lignocelulósicos .....	26
1.7.1 Pretratamientos químicos .....	27
1.7.1.1 Hidrolisis acida .....	27
1.7.1.2 Hidrolisis alcalina .....	28
1.7.2. Pretratamientos biológicos. ....	28
1.7.2.1. Hidrólisis enzimática.....	29
1.8 Antecedentes bibliográficos .....	31
<b>2. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>35</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>36</b>
3.1 OBJETIVO GENERAL .....	36
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>37</b>
4.1 Recolección y toma de muestras de residuos lignocelulósicos .....	38
4.2 Aislamiento de cepas fúngicas productoras de xilanasas .....	38
4.2.1 Medio de conservación.....	39
4.2.2 Determinación cualitativa de la actividad xilanasa .....	40
4.2.3 Determinación cuantitativa de la actividad xilanasa .....	41
4.2.3.1 Activación de la cepa .....	41
4.2.3.2 Preparación del inóculo.....	41
4.2.3.3 Inoculación .....	42
4.2.3.3.1 Cuenta celular .....	42
4.2.3.4 Fermentación sumergida.....	44
4.2.3.4.1 Determinación de azúcares reductores .....	44
4.2.3.5 Obtención del extracto enzimático con actividad xilanasa .....	46
4.2.3.5.1 Método para medir la actividad xilanasa.....	47
4.3 Evaluación de la fuente de carbono sobre la producción de xilanasas .....	49
4.3.1 Pretratamiento Alcalino (Deslignificado) de los residuos lignocelulósicos .....	50
4.3.2 Hidrólisis alcalina del BS .....	50
4.3.3 Hidrólisis alcalina del RM.....	50
4.3.4 Hidrólisis alcalina del BC .....	50
4.3.4.1 Caracterización del material lignocelulósico .....	51



4.3.5 Reducción del tamaño de partícula .....	52
4.4 Evaluación de la fuente de nitrógeno sobre la producción de xilanasas. ....	53
4.5 Optimización de la producción de xilanasas .....	54
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>56</b>
5.1 Aislamiento de microorganismos .....	56
5.2 Propagación y mantenimiento de los microorganismos .....	57
5.3 Caracterización cinética de actividad enzimática .....	58
5.3.1 Selección primaria: Prueba cualitativa de actividad enzimática .....	58
5.3.2 Selección secundaria: Prueba cuantitativa de actividad xilanasasa por fermentación sumergida (SMF). .....	60
5.4 Evaluación de la fuente de carbono sobre la producción de xilanasas .....	62
5.5 Evaluación de la fuente de nitrógeno sobre la producción de xilanasas. ....	63
5.6 Determinación de las condiciones óptimas de la producción de xilanasas ..	64
5.7 Identificación molecular de los hongos aislados .....	68
5.7 Efecto de la capacidad de hidrólisis del extracto enzimático obtenido sobre la estructura o degradación del residuo.....	69
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>72</b>
<b>7. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>73</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>74</b>

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.1</b>	Clasificación enzimática en base a la IUBMB.....	3
<b>Tabla 1.2</b>	Principales microorganismos productores de xilanasas y celulasas.....	8
<b>Tabla 1.3</b>	Comparación entre el sistema de cultivo en fase sólida y el sistema en fase sumergida .....	15
<b>Tabla 1.4</b>	Estados productores de caña de azúcar en México.....	17
<b>Tabla 1.5</b>	Estados productores de sorgo dulce en México .....	19
<b>Tabla 1.6</b>	Estados productores de residuos maderables en México año 2012.....	21
<b>Tabla 1.7</b>	Producción de xilanasas utilizando diferentes fuentes de carbono.....	32
<b>Tabla 4.1</b>	Composición de medio para aislamiento.....	38
<b>Tabla 4.2</b>	Medio PDA para la conservación de la cepa.....	38
<b>Tabla 4.3</b>	Medio de prueba cualitativa de actividad xilanasa .....	39
<b>Tabla 4.4</b>	Medio de trazas de Mandels y Weber.....	40
<b>Tabla 4.5</b>	Materiales lignocelulósicos como fuente de carbono.....	47
<b>Tabla 4.6</b>	Fuentes de nitrógeno a evaluar .....	51
<b>Tabla 4.7</b>	Rango experimental y niveles de acuerdo con un Diseño Central Compuesto (DCC) .....	52
<b>Tabla 4.8</b>	Matriz de Diseño Central Compuesto para la optimización del proceso de producción de xilanasas con valores codificados y reales .....	53
<b>Tabla 5.1</b>	Total de microorganismos aislados en medio selectivo de Xilano .....	55
<b>Tabla 5.2</b>	Prueba cualitativa de actividad en medio de CMC y XI.....	57
<b>Tabla 5.3</b>	Evaluación del efecto de los residuos lignocelulósicos como fuente de carbono sobre la producción de xilanasas.....	60
<b>Tabla 5.4</b>	Diseño Central Compuesto para la producción de xilanasas...	63
<b>Tabla 5.5</b>	Identificación molecular de los aislados con actividad xilanasa.	66

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.1</b>	Estructura del xilano presente en la hemicelulosa .....	5
<b>Figura 1.2</b>	Estructura del xilano y su interacción con xilanasas .....	7
<b>Figura 1.3</b>	Obtención de etanol de segunda generación.....	11
<b>Figura 1.4</b>	Bagazo de caña de azúcar posterior a la molienda .....	17
<b>Figura 1.5</b>	Bagazo de sorgo dulce posterior a la molienda .....	20
<b>Figura 1.6</b>	Residuos maderables en deterioro .....	20
<b>Figura 1.7</b>	Estructura del material lignocelulósico.....	22
<b>Figura 1.8</b>	Estructura de las fibras de celulosa .....	23
<b>Figura 1.9</b>	Estructura de los componentes de la hemicelulosa .....	24
<b>Figura 1.10</b>	Estructura de la lignina .....	26
<b>Figura 1.11</b>	Sitios de acción de las celulasas sobre la celulosa .....	30
<b>Figura 1.12</b>	Sitios de acción de las xilanasas sobre el xilano presente en la hemicelulosa .....	30
<b>Figura 4.1</b>	Metodología general para la producción de xilanasas a partir hongos autóctonos usando residuos lignocelulósicos .....	36
<b>Figura 4.2</b>	Cámara de Thoma .....	42
<b>Figura 4.3</b>	Centrífuga eppendorf modelo 5804 R .....	44
<b>Figura 4.4</b>	Thermo Spectronic Genesys 4001/4.....	45
<b>Figura 4.5</b>	Pretratamiento alcalino de los residuos lignocelulósicos .....	49
<b>Figura 4.6</b>	Bagazo de caña con un tamaño de partícula de 750µm .....	50
<b>Figura 4.7</b>	Fuentes de nitrógeno a evaluar .....	51
<b>Figura 5.1</b>	Crecimiento de diversas colonias fúngicas .....	54
<b>Figura 5.2</b>	Cepas fúngicas totalmente purificadas .....	55
<b>Figura 5.3</b>	Determinación cualitativa de la actividad enzimática .....	56
<b>Figura 5.4</b>	Halos de actividad enzimática en Carboximetilcelulosa (CMC) y Xilano (XIL).....	57
<b>Figura 5.5</b>	Curva patrón de xilosa .....	58
<b>Figura 5.6</b>	Halos de actividad y azúcares reductores generados en la cinética de fermentación con xilano .....	59

<b>Figura 5.7</b>	Cinética enzimática de actividad xilanasas .....	60
<b>Figura 5.8</b>	Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la producción de xilanasas .....	61
<b>Figura 5.9</b>	Gráfico de probabilidad normal .....	64
<b>Figura 5.10</b>	(a) Superficie de respuesta [S] vs Agitación y (b) Grafico de contornos de condiciones óptimas del proceso.....	65
<b>Figura 5.11</b>	(c) Superficie de respuesta [N] vs Agitación y (d) Grafico de contornos de condiciones de maximización del proceso .....	65
<b>Figura 5.12</b>	Micrografía del BC deslignificado (a) vista general y (b) vista aumentada con dimensiones .....	67
<b>Figura 5.13</b>	Micrografía del BC después de la acción enzimática .....	68

## LISTA DE ABREVIATURAS Y NOMENCLATURA

AOCS	American Oil Chemist' Society
Atm	Atmósfera
BC	Bagazo de caña
BS	Bagazo de sorgo
RM	Residuos de Madera
°C	Grados Celsius
cm	Centímetro
CMC	Carboximetilcelulosa
CONACYT	Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
DNS	Acido 3,5-dinitrosalicilato
esp/mL	Esporas/mililitro
FS	Fermentación sumergida
FES	Fermentación en estado sólido
g	Gramos
g/L	Gramos/Litro
h	Hora
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido sulfúrico
INIFAP	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias
IUBMB	International Union of Biochemistry and Molecular Biology
M	Molar
mg	Miligramo
mm	Milímetro
mM	Milimolar
mL	Mililitro
N	Fuente de nitrógeno
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio

nm	Nanómetros
NREL	Laboratorio Nacional de Energías Renovables
PDA	Papa/Dextrosa/Agar
p/v	Peso/volumen
RLS	Relación líquido-sólido
RM	Rastrojo de maíz
rpm	Revoluciones por minuto
SAGARPA	Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural
S	Fuente de carbono
SMF	Fermentación sumergida
SSF	Fermentación en estado sólido
UI	Unidades internacionales
t	Tiempo
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µM	Micromolar
µmol	Micromol
v/v	Volumen/volumen
XIL	Xilano

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad debido al interés mundial por aplicar los mecanismos de desarrollo limpio, han surgido nuevas alternativas de generación de energía, que pretenden lograr un desarrollo sostenible, una de estas es la producción de biocombustibles, entre los cuales se encuentra el etanol de segunda generación (2G). Para el proceso de producción de etanol 2G se utilizan como materia prima principalmente residuos lignocelulósicos agrícolas, agroindustriales y forestales. En dicho proceso una de las etapas principales es la hidrólisis enzimática, realizada principalmente por enzimas celulasas (E.C. 3.2.1.4) y xilanasas (E.C. 3.2.1.8), las cuales hidrolizan polisacáridos como celulosa y hemicelulosa para obtener azúcares fermentables.

Las xilanasas tienen importantes aplicaciones en diversas áreas como la industria alimentaria, por ejemplo, en los alimentos y bebidas, las xilanasas se utilizan para clarificar los jugos y vinos, y para extracción de café y aceites vegetales (Tan *et al.*, 1987; Wong *et al.*, 1988; Wong y Saddler, 1992; Subramaniyan y Prema, 2002), así como en la industria de la pulpa y el papel.

La producción de las xilanasas es realizada principalmente por hongos filamentosos, tales como los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, y *Trichoderma*, puesto que se ha reportado que expresan altos niveles de xilanasas en medios de fermentación en comparación con otros microorganismos (Chávez *et al.* 2006; de Vries y Visser 2001). Debido a que las xilanasas tienen un gran potencial biotecnológico para diversos procesos industriales (Akpınar *et al.* 2009; Beg *et al.* 2000; Camacho and Aguilar 2003; Twomey *et al.* 2003), se producen actualmente a nivel industrial en algunos países, los cuales mantienen el control de su producción y distribución (Beg *et al.* 2001); creando monopolios que mantienen muy restringida su disponibilidad y elevando los costos de las mismas lo que conlleva a la mitigación de proyectos detonantes como lo es el etanol de segunda generación en países como México y otros que no cuentan con tecnología propia para producir estas enzimas. Una alternativa a esta problemática es la búsqueda y

el desarrollo de nuevos procesos para la obtención xilanasas. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue producir xilanasas a partir de hongos autóctonos mediante la utilización de residuos lignocelulósicos.



# 1. ANTECEDENTES

## 1.1 Enzimas

De manera general las enzimas se definen como moléculas de naturaleza proteica, cuya principal función es catalizar las reacciones biológicas, que son producidas por todo ser vivo, además de permanecer sin cambios después de la reacción y no afectan la posición de equilibrio de una reacción reversible. Su efecto, es disminuir la energía de activación necesaria para que se lleve a cabo la reacción, por lo tanto, las enzimas incrementan la velocidad a la cual el equilibrio es alcanzado (Teal y Wymer, 1994). Debido a que estos biocatalizadores adquirieron gran importancia en la industria por sus múltiples aplicaciones, se comenzaron a desarrollar procesos biotecnológicos, en los cuales se utilizaban grandes cantidades de estas enzimas y así mejoraban sus rendimientos y productividades. A partir de 1955 la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB) crea la Comisión Internacional de Enzimas con el fin de resolver los problemas de nombramiento de enzimas y así se creó la clasificación enzimática de acuerdo con la reacción que catalizan, como se observa en la Tabla 1.1.

**Tabla 1.1. Clasificación enzimática en base a la IUBMB.**

No. CLASE	CLASE DE ENZIMA	REACCIÓN
1	Oxidorreductasas	“Catalizan reacciones de óxido-reducción”
2	Transferasas	Transfieren un grupo de una molécula a otra.
3	Hidrolasas	“Catalizan la hidrólisis de varios enlaces”.
4	Liasas	“Rompen enlaces C-C, C-O, C-N y otros enlaces por eliminación, dejando dobles enlaces o anillos, o de manera contraria, adicionan grupos a dobles enlaces”
5	Isomerasas	“Catalizan cambios estructurales o geométricos dentro de una misma molécula”
6	Ligasas	” Catalizan la unión de dos moléculas con la hidrólisis acoplada de un enlace difosfato en ATP o trifosfato similar”

(Fuente: IUBMB)

Gracias a esta clasificación se puede seleccionar el tipo de enzima de interés, cabe destacar que estas moléculas se han empleado desde mediados del siglo XX, en principio para la preservación de alimentos y bebidas, sin embargo en la actualidad tienen relevancia en campos como la fabricación de textiles, fármacos, productos de limpieza y cada vez con mayor importancia en la industria biotecnológica debido a su uso en sistemas biológicos para el desarrollo y la obtención de diversos productos.

Las enzimas que tienen una mayor producción y comercialización a nivel industrial corresponden al grupo de las hidrolasas (Headon y Walsh, 1994; Bhat, 2000; Gurung, *et al.*, 2013).

## 1.2 Hidrolasas

Las enzimas que pertenecen a este grupo catalizan la hidrólisis de diversos enlaces, lo cual les confiere su especificidad y eficiencia (IUBMB, s.f.).

De acuerdo con (Kaur y Verma, 2014; Pandey, *et al.*, 2017) las enzimas hidrolasas con mayor uso en la industria son:

- **Amilasas:** Enzimas que catalizan la hidrólisis de moléculas de almidón o glucógeno, liberando diversos productos incluyendo dextrinas y pequeños polímeros de glucosa. Se dividen en tres grupos:  $\alpha$ -amilasa (3.2.1.1),  $\beta$ -amilasa (3.2.1.2) y glucoamilasa (3.2.1.3), cada una con un mecanismo de acción diferente.
- **Pectinasas:** Enzimas que hidrolizan los enlaces pécticos que se encuentran en la pared celular de las plantas (3.2.1.15).
- **Lipasas:** Enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces éster por medio de una tríada catalítica, triacilglicerol lipasa (3.1.1.3), fosfolipasa (3.1.1.4) y lisofosfolipasa (3.1.1.4).
- **Proteasas:** Enzimas que catalizan enlaces peptídicos e intervienen en la función de la proteína (3.4).

- **Celulasas:** Enzimas que catalizan la hidrólisis de celulosa en monómeros de glucosa, consisten en tres enzimas, la endo-1,4- $\beta$ -glucanasa (3.2.1.4), exoglucanasa (3.2.1.91) y  $\beta$ -glucosidasa (3.2.1.21).
- **Xilanasas:** Enzimas que hidrolizan xilano (presente en la hemicelulosa de las plantas) en azúcares monoméricos, incluyen a las enzimas endo-1,4- $\beta$ -xilanasas (3.2.1.8) y  $\beta$ -xilosidasas (3.2.1.37).

### 1.3 Xilanasas

El xilano es el principal carbohidrato encontrado en la fracción hemicelulósica de los tejidos vegetales y constituye la tercera parte de todo el carbono orgánico renovable sobre la tierra.

El xilano representa alrededor del 30 % del peso seco de la pared celular vegetal y está constituido por una cadena principal de  $\beta$ -(1-4)-xilopiranosas (xilosa); este polisacárido tiene residuos de  $\alpha$ -L-arabinofuranosa (L-arabinosa) y de ácido glucurónico en posición C(O)-2 y C(O)-3 sobre la estructura del xilano, aunque también puede estar sustituido con glucosa o galactosa y estar esterificados con ácidos ferúlicos, diferúlicos y p-cumáricos en posición C(O)-5 de la arabinosa (Figura 1.1).

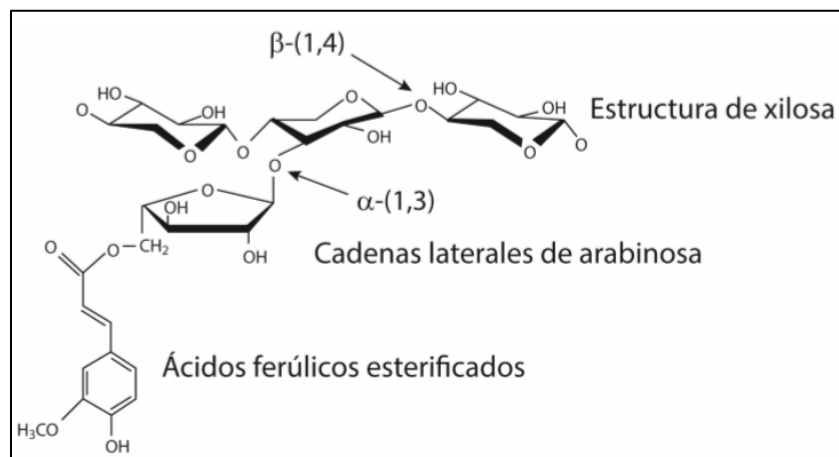


Figura 1.1 Estructura del xilano presente en la hemicelulosa (Cooper, 2013)

La xilanasa ( $\beta$ -1,4 xilano hidrolasa), componente mayoritario de un complejo sistema enzimático, actúa en la naturaleza despolimerizando las moléculas de xilano en unidades de pentosas monoméricas, que son usadas por bacterias y hongos como principal fuente de carbono (Lago y Hernández, 2000).

### **1.3.1 Tipos de xilanasas**

Las endoxilanasas o xilanasas (endo- $\beta$ -1,4-xilanasas) son las enzimas que actúan sobre la cadena principal del xilano hidrolizando los enlaces internos  $\beta$  (1-4) entre moléculas de xilosa, dando lugar a una mezcla de xilooligosacáridos de diferentes tamaños. También pueden hidrolizar xilooligómeros, siendo más efectiva cuando es mayor el grado de polimerización de éstos. Sin embargo, no hidrolizan xilobiosa, lo que permite distinguir las claramente de las  $\beta$ -xilosidasas (Lago y Hernández, 2000).

#### **1.3.1.1 Mecanismo de acción**

Para la hidrólisis del Xilano presente en la hemicelulosa, se requiere de la acción concertada de las xilanasas, particularmente, endo- $\beta$ -1,4-xilanasas que causan un decremento en el grado de polimerización del sustrato (xilano),  $\beta$ -xilosidasas que hidrolizan xilooligosacáridos a xilosa y varias enzimas accesorias como la  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa,  $\alpha$ -glucosidasa, acetilesterasas, ácidos ferulicoesterasa y ácido p-cumarínicoesterasa que son necesarios para la hidrólisis de varios sustituyentes del xilano.

La Figura 1.2 muestra la interacción enzimática de las xilanasas con la estructura del xilano.

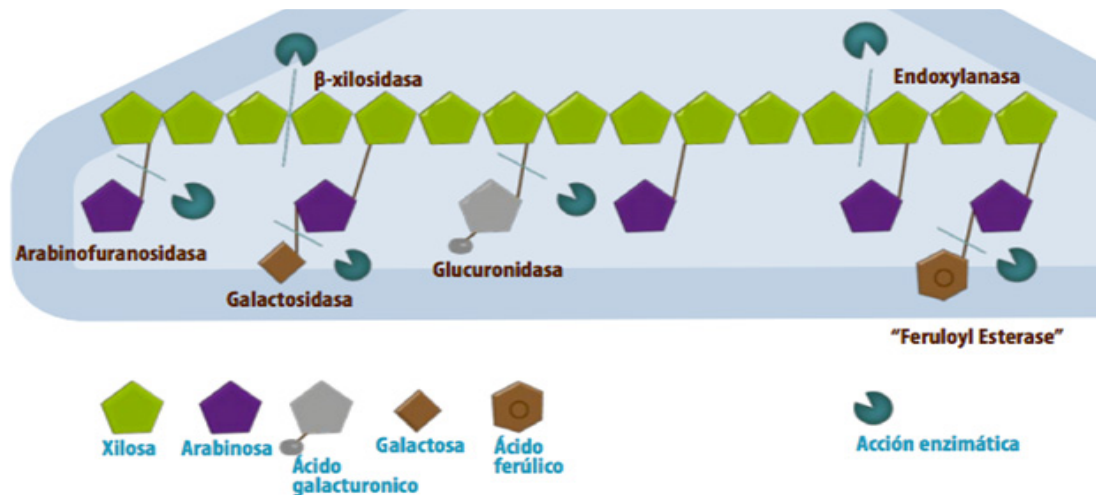


Figura 1.2. Estructura del xilano y su interacción con xilanasas (Brink y Vries, 2011)

La  $\alpha$ -arabinofuranosidasa y la  $\alpha$ -glucuronidasa remueven la arabinosa y el 4-metil ácido glucurónico, respectivamente, de la cadena principal de xilano. Las esterasas hidrolizan las uniones éster entre las unidades de xilosa y el ácido acético (acetilxilanoesterasas) o entre residuos de arabinosa de la cadena y ácidos fenólicos (ácido ferúlico esterasas) y ácido p-cumarínico (ácido p-cumarínico esterasas), que remueven los sustituyentes en la cadena del heteroxilano (Rahman *et al.*, 2003). Y la  $\beta$ -xilosidasa hidroliza a los xilooligosacáridos a xilosa.

### 1.3.2 Microorganismos productores de xilanasas y celulasas

Las xilanasas se producen en la naturaleza principalmente por hongos, bacterias, y actinomicetos. En la Tabla 1.2, se enlistan algunos microorganismos productores de xilanasas y celulasas.

**Tabla 1.2 Principales microorganismos productores de xilanasas y celulasas.**

Tipo de microorganismo	Característica	Nombre
Hongos	Aeróbicos	<i>Trichoderma viride</i> , <i>Trichoderma reesei</i> , <i>Penicillium pinophilum</i> , <i>Sporotrichum pulverulentum</i> , <i>Fusarium solani</i> , <i>Talaromyces emersonii</i> y <i>Trichoderma Konin</i> <i>Aspergillus sp</i>
	Aeróbicos termofílicos	<i>Sporotrichum thermophile</i> , <i>Thermoascus aurantiacus</i> y <i>Humicola insolens</i>
	Anaerobios mesofílicos	<i>Neocallimastix frontalis</i> , <i>Piromonas communis</i> , <i>Sphaeromonas communis</i>
Bacterias	Aeróbicas mesofílicas y termofílicas	<i>Cellulomonas sp.</i> , <i>Cellvibrio sp.</i> , <i>Microbispora bispora</i> y <i>Thermomonospora sp.</i>
	Anaeróbicas mesofílicas y termofílicas	<i>Acetivibrio cellulolyticus</i> , <i>Bacteroides succinogenes</i> , <i>Ruminococcus albus</i> , <i>Ruminococcus flavefaciens</i> y <i>Clostridium thermocellum</i>

(Fuente: Riaño et al., 2010)

Las xilanasas producidas a partir de hongos son las más estudiadas debido a que los procesos de purificación son más sencillos y menos costosos, la actividad de las xilanasas fúngicas es mayor que las xilanasas bacterianas y pueden utilizar sustratos residuales, como, materiales lignocelulósicos, disminuyendo el costo total del proceso (Panchapakesan y Shankar, 2016).

A partir de los hongos aeróbicos, tales como: *Trichoderma viride*, *Trichoderma reesei*, *Penicillium pinophilum*, *Sporotrichum pulverulentum*, *Fusarium solani*, *Talaromyces emersonii* y *Trichoderma koningii*, se han obtenido los complejos celulolíticos y xilanolíticos más utilizados en la mayoría de los estudios, debido a que presentan un sistema enzimático completo de celulasas y xilanasas capaces de degradar parcial o totalmente la celulosa y la hemicelulosa respectivamente (Ovando-Chacón y Waliszewski, 2005; Chávez *et al.* 2006; de Vries y Visser 2001).

La mayoría de las celulasas que se producen a nivel industrial se producen a partir de hongos del género *Trichoderma* y en particular la especie *reesei* que es una especie modificada genéticamente con el objetivo de obtener altos rendimientos y productividad. Sin embargo, este género presenta la desventaja de producir limitadas cantidades de  $\beta$ -glucosidasa lo que disminuye la actividad celulasa total.

Mientras tanto, se ha reportado que el género *Aspergillus* es capaz de producir los tres tipos de celulasas en altas cantidades que son necesarios para llevar a cabo su acción sinérgica, además es tolerante a niveles moderados de glucosa lo que disminuye el efecto de una inhibición por producto (Akinyele y Olaniyi, 2013; Panchapakesan y Shankar, 2016). Por ello se han realizado investigaciones utilizando *Trichoderma* y *Aspergillus* en co-cultivos y así obtener extractos enzimáticos con mayor actividad (Haq, *et al.*, 2006; Ahamed y Vermette, 2008).

Es por ello por lo que uno de los aspectos más importantes en la producción de estas enzimas es el microorganismo a utilizar, ya que la síntesis de estas enzimas estará controlada por este y por ello, dichos microorganismos deben de tener características específicas como una alta tolerancia a concentraciones de glucosa y xilosa para no presentar una represión catabólica (Rani, *et al.*, 2016), disminuyendo el rendimiento y la productividad de celulasas y xilanasas.

Se ha reportado que el género *Aspergillus* es capaz de producir las tres celulasas en altas cantidades para llevar a cabo su acción sinérgica y es tolerante a niveles moderados de glucosa (Akinyele y Olaniyi, 2013; Panchapakesan y Shankar, 2016). Por ello se han realizado investigaciones utilizando *Trichoderma* y *Aspergillus* en co-cultivos y así obtener extractos enzimáticos con mayor actividad (Haq, et al., 2006; Ahamed y Vermette, 2008)

### **1.3.3 Uso de xilanasas**

Las xilanasas se comenzaron a utilizar a principios de los años 80, en principio en la alimentación animal y posteriormente su uso se extendió a la industria alimentaria (Vázquez, 2013).

A continuación, se describen algunos de los usos más importantes de estas enzimas:

- **Alimentos:** mejora la extracción y clarificación de jugos de frutas y verduras. También mejora la textura y calidad de los productos de panadería, entre otros usos.
- **Comida para ganado:** mejora la calidad nutricional de los alimentos utilizados para el ganado y su digestión, reduciendo costos de alimentación.
- **Industria de pulpa y papel:** se utilizan en la eliminación de la tinta y agua, así como aditivo en el proceso de blanqueamiento.
- **Biocombustibles:** se utiliza en la transformación de materiales o residuos lignocelulósicos en azúcares fermentables para la producción de etanol de segunda generación como biocombustible, cuyo proceso aún sigue en investigación para su mejoramiento y optimización.



### 1.3.3.1 Uso de xilanasas en la producción de bioetanol 2G

En la producción de bioetanol de 2ª generación se utiliza biomasa lignocelulósica, la cual está formada principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina. En este proceso, la celulosa y hemicelulosa se hidrolizan en la etapa de hidrolisis enzimática por enzimas como celulasas y xilanasas para obtener glucosa y xilosa respectivamente como se muestra en la Figura 1.3, posteriormente los azúcares obtenidos de esta etapa son fermentados para obtener etanol como producto final.

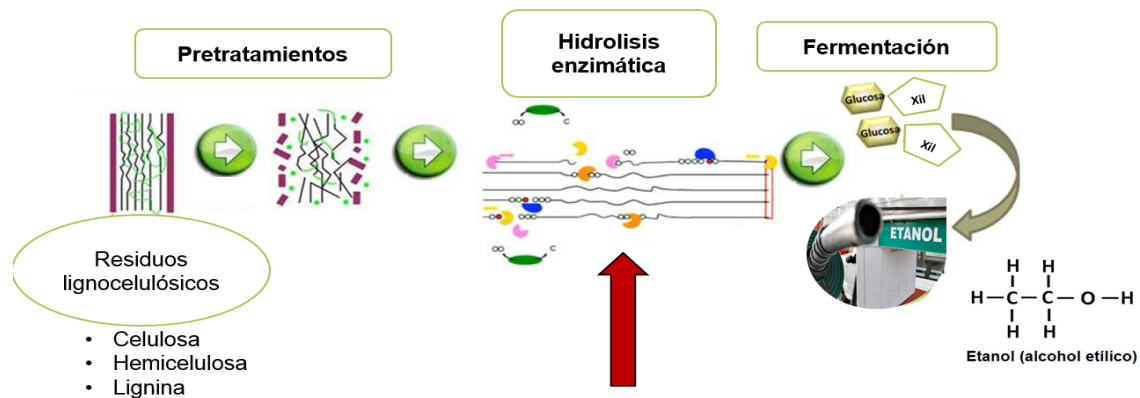


Figura 1.3 Obtención de etanol de segunda generación (Dufour, 2014)

La hidrólisis enzimática constituye la etapa crítica para la factibilidad económica y financiera del proceso de producción de etanol de 2ª generación, debido a los altos costos de las enzimas comerciales, y su limitada disponibilidad.

### 1.3.4 Comercialización de xilanasas

Las empresas líderes que se dedican a la producción y distribución de celulasas y xilanasas son: Novozyme y DuPont, estas son compañías transnacionales que controlan el mercado de dichas enzimas, así mismo estos grandes monopolios mantienen una baja disponibilidad y además presentan sus formulados enzimáticos (Cellic CTec3, Cellic HTec3, OPTIMASH® y Accellerase®) a elevados costos. El costo de estas enzimas oscila alrededor de los \$ 2, 500.00 por producto, con un contenido de 50 ml de formulado enzimático (Novozyme, s.f.).

## **1.4 Factores que afectan la producción de xilanasas**

La producción de xilanasas está determinada por diversos factores tales como: el tipo de microorganismo que se utiliza, las condiciones fisicoquímicas (temperatura, pH y agitación), el medio de cultivo (sintético o complejo), el sustrato y el sistema de fermentación en el que se llevará a cabo (sólida o sumergida). Estos factores incidirán directamente en un alto o bajo rendimiento y productividad de estas enzimas.

### **1.4.1 Sustrato**

El sustrato es un factor importante ya que afecta la inducción de la producción de las enzimas durante la producción. La selección del sustrato debe realizarse de acuerdo con el tipo de microorganismo que se utilice y al tipo de enzima que se busque obtener, para el caso de las celulasas y xilanasas se pueden seleccionar sustratos que contengan porcentajes altos en celulosa y hemicelulosa según lo reportado por (Rodríguez y Sanromán, 2005; Rosales, 2002). Este aspecto debe ser evaluado para obtener un mayor porcentaje de conversión, es decir el mayor rendimiento de enzima por unidad de sustrato.

### **1.4.2 Temperatura y pH**

La temperatura y el pH son los parámetros físicos más importantes que influyen sobre el desarrollo de los hongos. De acuerdo con Juhász, *et al.* (2005), Sohail, *et al.* (2009), Matkar, *et al.* (2013), Akinyele y Olaniyi (2013) y Faheina, *et al.* (2015), la temperatura óptima para la producción de xilanasas se encuentra en un rango de 30°C a 50°C dependiendo del microorganismo, mientras que el rango de pH óptimo oscila entre 4 y 6. La temperatura influye en el metabolismo del microorganismo. El pH, que es la medida de acidez o alcalinidad que tiene una solución, en diversos estudios es el factor que más influye en la producción de enzimas, lo que podría deberse a que la morfología del microorganismo está influenciada por este factor.

### **1.4.3 Sistema de fermentación**

La fermentación es la técnica de la conversión biológica de sustratos complejos en compuestos simples por diversos microorganismos. Ha sido ampliamente utilizada para la producción de celulasas y xilanasas a través de hongos filamentosos. Con los años, las técnicas de fermentación han ganado gran importancia debido a sus ventajas económicas y ambientales. Existen dos sistemas de fermentación ampliamente estudiados que han surgido como resultado de este rápido desarrollo: la fermentación sumergida (SMF) y la fermentación en estado sólido (SSF) por sus siglas en inglés (Sadhu y Kanti, 2013).

#### **1.4.3.1 Fermentación sumergida (SMF)**

SMF utiliza sustratos líquidos de flujo libre, como la melaza y caldos. Los compuestos bioactivos se secretan en el caldo de fermentación. Los sustratos se utilizan con bastante rapidez; por lo tanto, necesitan ser reemplazados constantemente/suplementado con nutrientes. Esta técnica de fermentación es el más adecuado para los microorganismos tales como las bacterias que requieren un alto contenido de humedad. Una ventaja adicional de esta técnica es que la purificación de los productos es más fácil. SMF se utiliza principalmente en la extracción de metabolitos secundarios que deben ser utilizados en forma líquida. Algunos sustratos comunes utilizados en la fermentación sumergida son azúcares solubles, la melaza, los medios líquidos, jugos de frutas y vegetales (Subramaniyam y Vimala, 2012).

#### **1.4.3.2 Fermentación en estado sólido (SSF)**

SSF utiliza sustratos sólidos, como el salvado, el bagazo, y pasta de papel. La principal ventaja del uso de estos sustratos es que los materiales de desecho ricos en nutrientes pueden ser fácilmente reciclados como sustratos.

En esta técnica de fermentación, los sustratos se utilizan muy lentamente y de manera constante, por lo que el mismo sustrato se puede utilizar durante períodos

largos de fermentación. Por lo tanto, esta técnica apoya la liberación controlada de nutrientes, SSF es más adecuada para las técnicas de fermentación que implican los hongos y los microorganismos que requieren menos contenido de humedad. Sin embargo, no se puede utilizar en los procesos de fermentación que implican organismos que requieren alta  $a_w$  (Actividad de agua) (Subramaniyam y Vimala, 2012). Este tipo de fermentaciones se emplean no solo para obtención de extractos enzimáticos si no que a su vez se emplea con éxito en la producción de antibióticos, micotoxinas, surfactantes, ácidos orgánicos, compuestos aromáticos y pesticidas, entre otros.

Los sustratos utilizados en este tipo de fermentación son muy variados, destacándose los cereales tales como trigo, centeno, arroz, maíz y subproductos agroindustriales como lo son los residuos lignocelulósicos provenientes de diversas etapas de los procesos industriales. También se usan desechos de la agroindustria, los cuales son considerados los mejores sustratos para SSF ya que además de agregarle valor le proporcionan los nutrientes necesarios para el crecimiento del microorganismo (Costa *et al.*, 2010).

#### **1.4.3.3 Comparación entre la SSF y la SMF**

La fermentación SSF presenta ventajas teóricas sobre el cultivo de fermentación líquida, sin embargo, es difícil controlar algunos factores muy importantes como la temperatura, el pH, no obstante, existe buena transferencia de masa, ya que se ha reportado en estudios a nivel biorreactor tipo plato, la aireación muestra un efecto muy importante sobre la producción de las enzimas (Fernández, 2012).

El método de cultivo en estado sólido (SSF), implica el crecimiento de microorganismos en materiales sólidos en ausencia de líquidos libres. La SSF implica relativamente poco líquido cuando se compara con SMF (Tabla 1.3) (Sadhu y Kanti, 2013).

**Tabla 1.3 Comparación entre el sistema de cultivo en fase sólida y el sistema en fase sumergida.**

<b>Factor</b>	<b>SMF</b>	<b>SSF</b>
<b>Sustrato</b>	Sólido soluble	Polímero insoluble: Materiales lignocelulósicos, almidón, celulosa, pectina, lignina.
<b>Agua</b>	Consumo de agua	Limitado consumo de agua, baja actividad de agua.
<b>Calefacción metabólica</b>	Fácil control de temperatura	Baja capacidad de transferencia de calor
<b>Control pH</b>	Fácil control de pH	Sustrato sólido amortiguado
<b>Escalado</b>	Equipos industriales disponibles	Requiere de nuevo diseño de ingeniería
<b>Consideraciones de energía</b>	Considerable consumo de energía	Poco consumo energético
<b>Agitación mecánica</b>	Buena homogenización	Preferible condiciones estáticas
<b>Aeración</b>	Limitada solubilidad del oxígeno	Fácil aireación y gran superficie de intercambio de aire.

**Fuente: Umsza-Guez *et al.*, 2011**

Las celulasas y xilanasas se producen usando el método tradicional, fermentación sumergida (SMF), en el que el cultivo de microorganismos se produce en una solución acuosa que contiene nutrientes.

## **1.5 Residuos lignocelulósicos**

Dentro de los residuos lignocelulósicos de mayor importancia, uso y aplicación a nivel industrial se tienen los que son provenientes de la industria azucarera, así como el sorgo dulce, los residuos maderables entre otros.

Los cultivos agrícolas posteriormente de ser utilizados en su debido proceso industrial generan gran cantidad de residuos, que pueden ser una fuente potencial de aprovechamiento por su composición química y estructural. Entre los residuos lignocelulósicos más importante se tienen los siguientes:

### **1.5.1 Bagazo de caña**

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L) es una gramínea tropical, de tallo macizo de 2 a 5 m de altura, de 5 a 6 cm de diámetro, cilíndrico, dividido en nudos y entrenudos alargado y sin ramificaciones, es esta parte de la caña se acumula un jugo rico en sacarosa, de este jugo al ser extraído y cristalizado se obtiene el azúcar (SAGARPA, 2017). La sacarosa es sintetizada por la caña gracias a la energía captada del sol durante la fotosíntesis.

La caña de azúcar proporciona alrededor del 70% de la demanda internacional de azúcar, y el resto se obtiene de la remolacha. El azúcar se obtiene del jugo fresco y dulce de la caña, y sus hojas y restos de tallos, se utilizan como forraje para el ganado acompañado con otros aditivos.

Otros productos como la melaza se emplean para la fabricación de bebidas alcohólicas como el ron. Las fibras de bagazo que resultan de la molienda se utilizan para la fabricación de papel y madera prensada (COVECA, 2008).

En México la industria azucarera representa altas producciones y relevancia económica y social, los estados con mayor producción se muestran en la Tabla 1.4

**Tabla 1.4 Estados productores de caña de azúcar en México.**

Estados	Producción (%)
Veracruz	37
San Luis Potosí	11
Jalisco	11
Oaxaca	6
Chiapas	6

Fuente: SIAP, 2014

En el mercado internacional México es uno de los principales exportadores con destinos a Estados Unidos y Puerto Rico, durante el periodo 2016-2017, México exportó 1.11 millones de toneladas de azúcar, cabe mencionar que el 67.6% de esta cantidad fue destinada a los países mencionados (SAGARPA, 2017).

El bagazo de caña de azúcar (Figura 1.4) (BC) es un material lignocelulósico abundante y de bajo costo que se obtiene como residuo del proceso de extracción del jugo de la caña de azúcar (Ferrara *et al.*, 2002; Takahashi *et al.*, 2000). Este corresponde generalmente al 25% del peso total y contiene entre 60-80% de carbohidratos.



**Figura 1.4 Bagazo de caña de azúcar posterior a la molienda**

Se ha reportado que una tonelada de caña de azúcar genera entre 280 a 300 Kg de bagazo (Sun *et al.*, 2004). Por lo que la fermentación de los carbohidratos de este material podría incrementar significativamente la productividad de etanol en la industrial alcoholera, así como la sostenibilidad del proceso, sin embargo, el bagazo se desecha como residuo agrícola o es quemado para el suministro de energía en las calderas de las fábricas de azúcar y etanol.

El bagazo fresco y húmedo apilado a la intemperie produce un residuo de jugo que es susceptible de ser fermentado por levaduras, la temperatura favorece el crecimiento de muchas especies de hongos, principalmente actinomicetos termofílicos y mesofílicos (Basanta *et al.*, 2007).

Se estima que para el 2030, la producción nacional de caña de azúcar será de 83.53 millones de toneladas (SAGARPA, 2017).

De acuerdo con el reporte de la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER), en el 2018, Veracruz, es el estado que sigue ocupando el primer lugar con la tercera parte de la producción nacional de caña de azúcar: más de 21 millones de toneladas de los casi 57 millones que produce el país al año.

### **1.5.2 Bagazo de sorgo dulce**

El sorgo o zahína (*Sorghum spp*) es un género botánico, originario del este de África, perteneciente a la familia de las gramíneas, del que existen unas 20 especies. Se adapta bien al crecimiento en áreas áridas o semiáridas cálidas. Tolera el calor, la sal, y las inundaciones. Se trata como planta anual, aunque es hierba perenne y en los trópicos puede cosecharse varias veces al año; tiene una altura aproximada de 1 a 3 m en dependencia de la subespecie. El sorgo dulce es un cultivo con un tallo rico en azúcares fermentables (16-23 °Brix), por lo que es comparable con la caña de azúcar (Bueno *et al.*, 2009).



Los estados con mayor producción en el estado de México se muestran en la Tabla 1.5. Las diferentes subespecies cultivadas usualmente se dividen en cuatro grupos, según sus diferentes usos: sorgo grano (alimentación animal y forraje), sorgo forrajero (para pastoreo y henificar), sorgo dulce (etanol, jarabes del sorgo, alimento animal) y sorgo escoba (para la confección de escobas y cepillos). Otra clasificación los divide por tipos: grano, dual (grano y forraje) y tallo dulce (combustible, alimento animal y forraje).

**Tabla 1.5 Estados productores de sorgo dulce en México**

Estados	Producción (%)
Guanajuato	44.65
Michoacán	18.56
Tamaulipas	6.75
Jalisco	5.16
Morelos	5.0
Sinaloa	4.9
Puebla	2.7
Sonora	2.5
Chihuahua	1.78
Resto del país	8.0

**Fuente: SAGARPA, 2013**

El bagazo de sorgo dulce (Figura 1.5) es otra fuente potencial de celulosa y hemicelulosa que puede ser aprovechada, debido a que este cultivo ha demostrado tener muchas ventajas económicas y energéticas, ya esta planta ha sido considerada como una de las materias primas prometedoras como alternativas para la producción de bioetanol en todo el mundo (Montes *et al.*, 2010; Du *et al.*, 2014).



**Figura 1.5 Bagazo de sorgo dulce posterior a la molienda**

### **1.5.3 Residuos Maderables**

El aserrín y la corteza de los árboles se consideran como los residuos maderables (Figura 1.6) que se desprenden de los procesos de transformación de la madera, mismos recursos que poseen una amplia aplicación a nivel industrial puesto que en su composición estructural poseen celulosa, hemicelulosa y lignina.



**Figura 1.6 Residuos maderables en deterioro**

En México se tienen diferentes tipos de climas, y por ende se tienen diferentes tipos de bosques: Bosques tropicales, en donde se dan maderas preciosas como la caoba, el cedro el ébano y demás; bosques mixtos, donde existen maderas duras y maderas suaves; bosques de coníferas, donde se tienen maderas blandas y se tiene producción de la celulosa y el papel y bosques espinosos, los cuales son desérticos y se tienen la producción del hule, ixtle, jojoba etc. En la Tabla 1.6 se muestran los principales estados productores.

**Tabla 1.6 Estados productores de residuos maderables en México año 2012.**

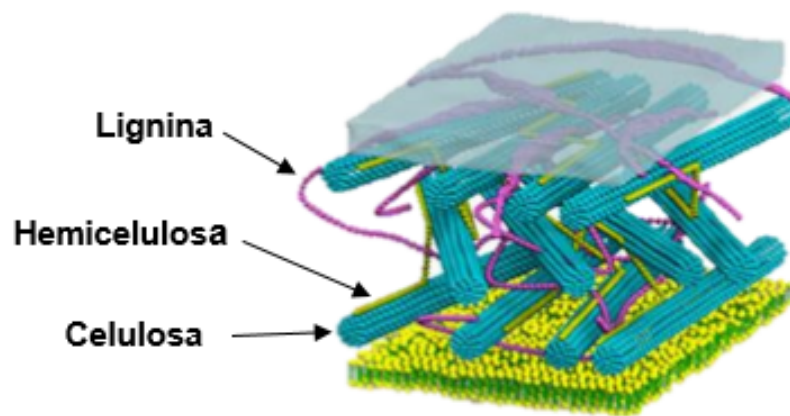
Estados	Producción (%)
Durango	32.97
Chihuahua	17.72
Michoacán	8.11
Oaxaca	7.32
Veracruz	5.24

**Fuente: SEMARNAT, 2012**

En la producción maderable se explotan maderas duras o maderas preciosas que derivan de la categoría botánica de Angiospermas, las maderas que se tienen en este tipo de bosque son: El cedro rojo, caoba, ébano, palo de rosa y otras. Las principales entidades federativas que tienen mayor participación son: Durango, Chihuahua, Michoacán, Jalisco, Oaxaca y Puebla (Díaz, 2001).

## 1.6 Materiales lignocelulósicos

La materia lignocelulósica, es un gran recurso potencial para la producción de biocombustibles, ya que es en gran medida abundante, de bajo costo y la producción de tales recursos es el medio ambiente. Los residuos agrícolas son una gran fuente de biomasa lignocelulósica, que es renovable, principalmente sin explotar. Estos recursos incluyen: hojas y tallos tales como fibra de maíz, rastrojo de maíz, bagazo de caña de azúcar, cáscaras de arroz, cultivos leñosos y residuos forestales (Maki *et al.*, 2009). Los componentes principales de naturaleza que conforman el material lignocelulósico son de tres tipos, celulosa, hemicelulosa y lignina como se muestra en la Figura 1.7



**Figura 1.7 Estructura del material lignocelulósico (Conde-Mejía *et al.*, 2012)**

Los materiales lignocelulósicos derivados de los residuos agrícolas, agroindustriales, forestales y desechos sólidos municipales, están principalmente constituidos por polisacáridos como celulosa y hemicelulosa estos se encuentran cubiertos por un tercer polímero llamado lignina. Estos generalmente se obtienen a partir de la extracción del jugo de la planta, que representa aproximadamente entre el 25 y 40% del material procesado dependiendo del contenido de fibra en la materia prima y la eficiencia de la extracción del molino utilizado (Pernalet *et al.*, 2008; Vargas *et al.*, 2011).

### 1.6.1 Celulosa

La celulosa es un homopolisacárido lineal compuesto de monómeros de D-glucosa unidos por enlaces glicosídicos  $\beta$  (1-4) (Li *et al.*, 2010). Los numerosos grupos hidroxilo de la celulosa favorecen la formación de enlaces de hidrógeno intra e intermoleculares, formando en cada unidad de glucosa dos enlaces intramoleculares y uno intermolecular. Los enlaces de hidrógeno intermoleculares se establecen con otras cadenas que están en el mismo plano, así como con cadenas en planos superiores e inferiores, de este modo, las cadenas de celulosa se unen dando lugar a microfibrillas, y la unión de estas entre sí da lugar a la fibra de la celulosa como se muestra en la Figura 1.8 (Tomas, 2010; Marques, 2010).

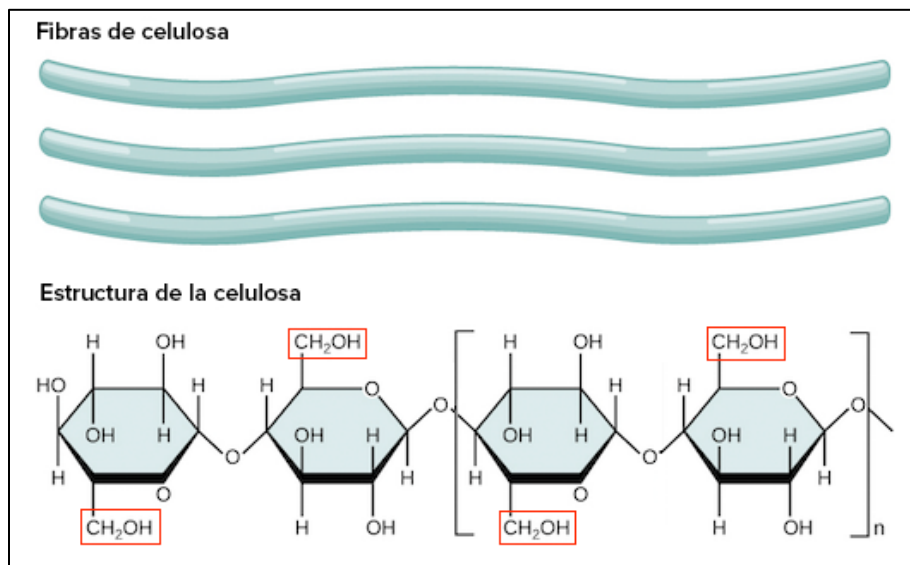


Figura 1.8 Estructura de las fibras de celulosa (Khan Academy, 2019)

### 1.6.2 Hemicelulosa

Después de la celulosa, las hemicelulosas son los segundos polisacáridos más abundantes en las plantas. Junto con pectinas y ligninas, hemicelulosas forman el complejo matriz de la pared celular entre las microfibrillas de celulosa.

Cada una de estas clases de compuestos de matriz se crea para formar redes separadas, que están estrechamente entrelazadas, con lo que las hemicelulosas están parcialmente unidas con microfibrillas de celulosa a través de límites de hidrógeno.

La hemicelulosa es un heteropolisacárido ya que su estructura está compuesta por pentosas (Figura 1.9) como: D-xilosa, D-arabinosa y hexosas tales como: D-glucosa, D-manosa, D-galactosa, así como también de ácido D-glucurónico y ácido 4-Ometil-D-glucurónico (Li *et al.*, 2010). Este heteropolisacárido sirve de conexión entre la lignina y las fibras de celulosa, además de proporcionar rigidez a la planta.

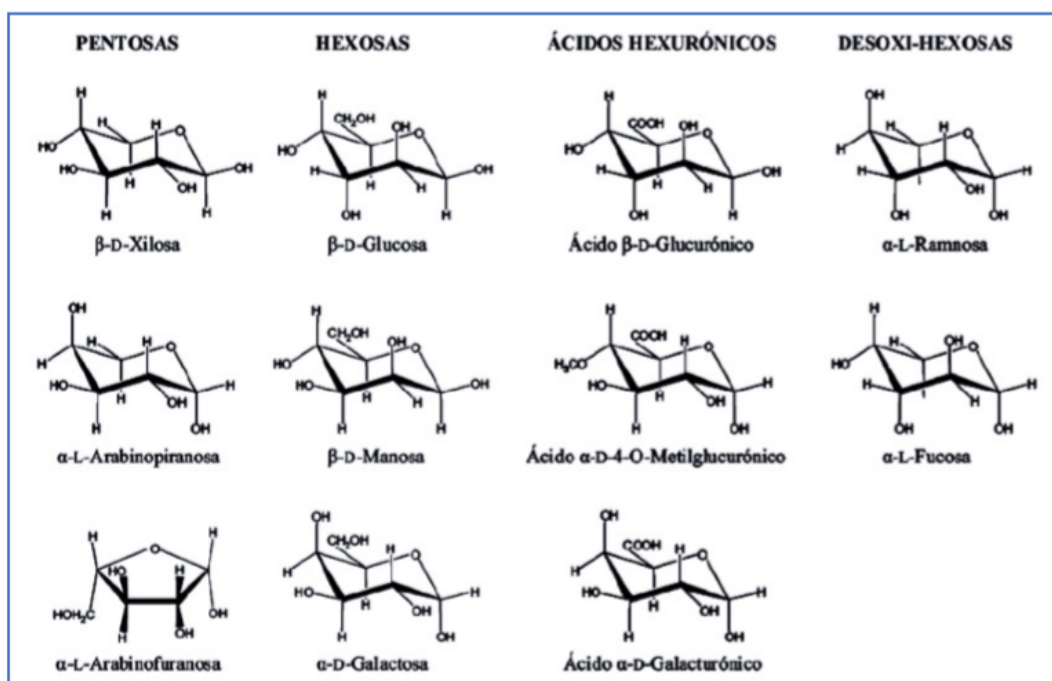
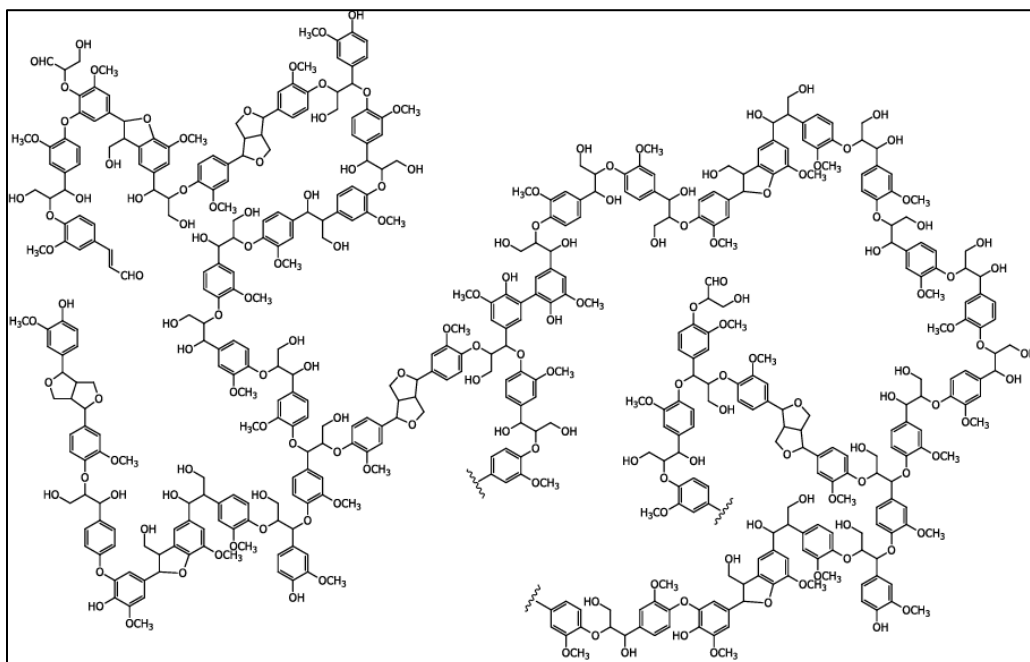


Figura 1.9 Estructura de los componentes de la hemicelulosa (Fengel y Wegener, 1984)

### 1.6.3 Lignina

La lignina, es un polímero tridimensional aromático, este provee de rigidez estructural al endurecer y sostener las fibras de polisacáridos, así mismo participa en el transporte interno de agua, nutrientes y metabolitos.

Las uniones lignina-hemicelulosa se realizan mediante intermediarios cinamílicos tales como el ácido ferúlico, el ácido diferúlico y el ácido p-cumárico, los cuales se unen mediante diferentes intermediarios monoméricos a la cadena principal del xilano (Tomás, 2010). Las ligninas tiene las siguientes características: (1) Son polímeros vegetales contruidos a base de unidades de fenilpropanoides; (2) Presentan la mayor parte de los grupos metoxilo contenidos en la madera; (3) Son resistentes a la hidrólisis ácida, fácilmente oxidables, solubles en bisulfito o álcalis caliente, y fácilmente condensables con fenoles o tioles; (4) Cuando se hace reaccionar con nitrobenzeno en una solución alcalina caliente, las ligninas producen principalmente vainillina, siringaldehído y p-hidroxibenzaldehído en función del origen de las ligninas; (5) Cuando se colocan a ebullición en una solución etanólica de ácido clorhídrico, las ligninas forman monómeros del tipo "cetonas de Hibbert" (mezcla de cetonas aromáticas resultantes de la ruptura de los principales enlaces éter ( $\beta$ -O-4) entre unidades de lignina). En la Figura 1.10 se muestra la estructura de la lignina.



**Figura 1.10 Estructura de la lignina (Chávez-Sifontes y Domine, 2013)**

## 1.7 Pretratamientos de los residuos lignocelulósicos

Los pretratamientos implicados en la transformación del material lignocelulósico son necesarios para mejorar los rendimientos de azúcares simples fermentables que se liberan por hidrólisis enzimática, por lo que un pretratamiento efectivo debe minimizar la degradación de carbohidratos, la producción de inhibidores enzimáticos y productos tóxicos para la fermentación de microorganismos (Tahezadeh y Karimi, 2008; Krishnan *et al.*, 2010). Así mismo estos deben de generar una modificación macro y microscópica de la estructura del material lignocelulósico, favorecer la explosión de las fibras de celulosa para facilitar el acceso de las enzimas, esto es incrementando la porosidad del material lignocelulósico, disminuir y remover la lignina (deslignificación), y promover las regiones amorfas de la celulosa (Sun y Cheng, 2002; Tahezadeh y Karimi, 2008; Cardona *et al.*, 2010). Existen diversos tipos de pretratamientos, sin embargo, para fines de este proyecto se describirán los del tipo químico y biológico.



### **1.7.1 Pretratamientos químicos**

Los tratamientos químicos son generalmente empleados para remover el contenido de lignina a los residuos agroindustriales. El uso de agentes alcalinos o ácidos son empleados comúnmente en la industria del papel para la recuperación de celulosa y producción de este. Estos procesos tienden a incrementar el costo del proceso, es por eso por lo que se deben seleccionar agentes químicos que permitan la posterior recuperación y aprovechamiento de los subproductos generados (Dopico, *et al.*, 2014).

#### **1.7.1.1 Hidrolisis acida**

En este proceso químico se utilizan agentes ácidos para transformar las cadenas de polisacáridos que forman la biomasa (hemicelulosa y celulosa) en sus monómeros elementales. Utilizando diferentes clases de ácidos, como: sulfuroso, clorhídrico, sulfúrico, fosfórico, nítrico y fórmico. Este método se clasifica en dos tipos: ácidos concentrados (10-30%), los cuales actúan a bajas temperaturas (30-90°C) y mayor tiempo de reacción y ácidos diluidos (1-5%): que utilizan temperaturas altas (100-240°C) y tiempos de reacción de minutos (Galbe y Zacchi, 2002; Liu y Wyman, 2003). Este último método es el más utilizado debido a su efectividad y bajo costo, ya que los métodos basados en ácidos concentrados son muy caros y causan significativos problemas operacionales (Wyman, 1994; Carvalheiro *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2011).

La principal reacción que ocurre durante el pretratamiento ácido es la hidrólisis de la hemicelulosa, generando especialmente xilanos como el glucomanano. La hemicelulosa puede ser sometida a reacciones hidrolíticas produciendo monómeros, como furfural, hidroximetil furfural y otros productos (Liu y Wyman, 2003).

### **1.7.1.2 Hidrolisis alcalina**

La hidrólisis alcalina consiste principalmente en la remoción de la lignina disminuyendo el grado de polimerización y cristalinidad de la celulosa (Arni *et al.*, 2007; Carvalheiro *et al.*, 2008). Este polímero constituye la principal barrera para que la celulosa y la hemicelulosa sean hidrolizados por el ataque sinérgico de las celulasas y xilanasas.

Este pretratamiento consiste en la adición de un compuesto alcalino, y se pueden dividir en dos grupos: los que utilizan hidróxido de sodio (NaOH), potasio (KOH), y calcio (Ca (OH)<sub>2</sub>) y los que utilizan hidróxido de amonio (NH<sub>4</sub>OH).

Este método genera reacciones tales como: sustitución electrofílica, el desplazamiento de cadenas laterales, rompimientos de vínculos de alquil, aril, éter o de núcleos aromáticos (Hon y Shiraishi, 2001).

Cuando el material lignocelulósico se sumerge en NaOH diluido, a 60°C por 24 h, se produce un hinchamiento de la biomasa, teniendo lugar reacciones como solvatación y saponificación. Esto provoca un estado de inflamación de la biomasa, lo que la hace más accesible por enzimas y bacterias (Sánchez-Riaño, 2009).

### **1.7.2. Pretratamientos biológicos.**

La conversión de la biomasa lignocelulósica en biocombustibles como el etanol implica la fracción y liberación de azúcares. Estos materiales compuestos de las tres fracciones principales antes mencionadas: celulosa, hemicelulosa y lignina. La celulosa y la hemicelulosa contienen azúcares en forma polimérica que pueden convertirse por enzimas en monómeros para su fermentación y producción de etanol. Por lo que en la actualidad el estudio para la generación de enzimas altamente específicas sobre sustratos lignocelulósicos y con mayores rendimientos en cuanto a la conversión de azúcares fermentables ha incrementado.

### 1.7.2.1. Hidrólisis enzimática.

En este proceso los materiales lignocelulósicos que ya han pasado por los pretratamientos químicos donde generalmente se lleva a cabo la deslignificación es catalizada por las enzimas denominadas celulasas y xilanasas, cuyo objetivo es la hidrólisis de celulosa y hemicelulosa respectivamente, como un complejo enzimático que está compuesto principalmente de: endo-(1,4)- $\beta$ -D-glucanasa, exo-(1,4)- $\beta$ -D-glucanasa y  $\beta$ -glucosidasa (Percival *et al.*, 2006; Kuhad *et al.*, 1997; Deswal *et al.*, 2011).

Las endoglucanasas atacan aleatoriamente el enlace interno O-glicosídico, produciendo cadenas de glucosa de diferentes tamaños. Las exoglucanasas actúan en los extremos de la cadena de celulosa y genera como producto final la  $\beta$ -celobiosa. La  $\beta$ -glucosidasa actúa específicamente en el disacárido  $\beta$ -celobiosa generando el monosacárido de glucosa (Bayer *et al.*, 1994; Singh, 1999).

Por su parte, en el complejo de las xilanasas actúan primeramente las endo- $\beta$ -1,4-xilanasas, que causan un decremento en el grado de polimerización del sustrato, las  $\beta$ -xilosidasas hidrolizan xilooligosacáridos a xilosa y varias enzimas accesorias como la  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa,  $\alpha$ -glucosidasa, acetilesterasas, ácidos ferulicoesterasa y ácido p-cumarínicoesterasa que son necesarios para la hidrólisis de varios sustituyentes del xilano.

La  $\beta$ -xilosidasa hidroliza a los xilooligosacáridos a xilosa. La  $\alpha$ -arabinofuranosidasa y la  $\alpha$ -glucuronidasa remueven la arabinosa y el 4-metil ácido glucurónico, respectivamente, de la cadena principal de xilano.

Las esterasas hidrolizan las uniones éster entre las unidades de xilosa y el ácido acético (acetilxilanoesterasas) o entre residuos de arabinosa de la cadena y ácidos fenólicos (ácido ferúlico esterasa) y ácido p-cumarínico (ácido p-cumarínico esterases), que remueven los sustituyentes en la cadena de heteroxilano (Rahman *et al.*, 2003). Los sitios de acción de las celulasas y xilanasas se pueden observar esquematizados en las Figuras 1.11 y 1.12.

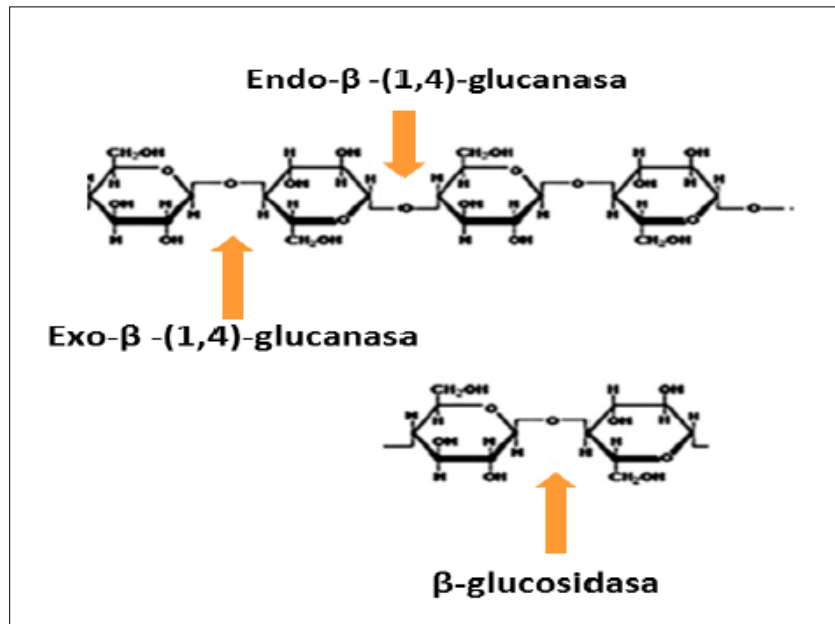


Figura 1.11. Sitios de acción de las celulasas sobre la celulosa (Saini *et al.*, 2015)

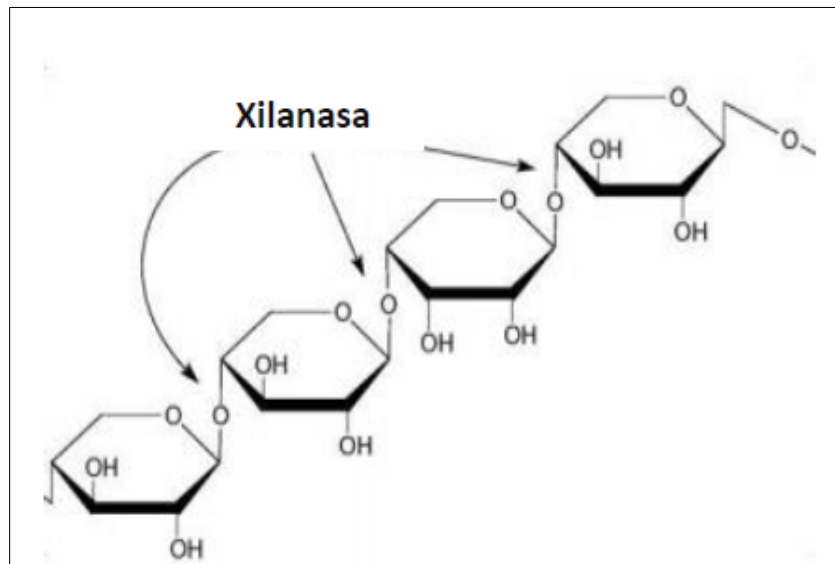


Figura 1.12. Sitios de acción de las xilanasas sobre el xilano presente en la hemicelulosa (Coughlan y Hazlewood, 1993)

En la hidrólisis enzimática también conocida como sacarificación, se lleva a cabo la transformación de la celulosa y hemicelulosa a azúcares fermentables generalmente monómeros de glucosa y xilosa respectivamente.

Sin embargo, esta etapa es considerada crítica en el proceso de obtención de etanol de segunda generación debido a que actualmente se realiza mediante el uso de enzimas comerciales altamente costosas y de baja disponibilidad, por lo que esta etapa representa alrededor del 50% de los costos del proceso de producción de etanol 2G.

### **1.8 Antecedentes bibliográficos**

Las xilanasas son de las enzimas de mayor interés a nivel industrial, por lo tanto, existen diversos reportes sobre la obtención de estas enzimas, en los que se evalúan diversos factores que son de vital importancia ya que afectan directamente los rendimientos y la productividad en la producción enzimática.

Una de las alternativas es el uso de residuos lignocelulósicos como fuente de carbono para los microorganismos, los cuales aprovecharán este material como inductor para la expresión de xilanasas, excretando estas enzimas al medio de cultivo. En general, las características de los residuos agrícolas, agroindustriales y forestales son muy variadas, y dependen de la materia prima y del proceso que los generó, no obstante, comparten como característica principal el contenido de materia orgánica, constituida por diferentes porcentajes de celulosa, hemicelulosa y lignina. Dentro de la producción de enzimas de aplicación industrial existe una gran variedad de residuos lignocelulósicos que pueden ser aprovechados para este fin.

A continuación, se enlista una serie de trabajos específicos sobre la producción de xilanasas en los cuales utilizar diferentes microorganismos, fuentes de carbono, y condiciones de operación.

Reyes, (2015), Realizó el Aislamiento y la selección de hongos y bacterias productores de celulasas y xilanasas a partir de residuos lignocelulósicos, como bagazo de sorgo, bagazo de caña y residuos de madera, a partir de estos materiales logró aislar 96 microorganismos de los cuales 47 presentaron capacidades para producir xilanasas, la selección se realizó mediante pruebas cualitativas y cuantitativas obteniendo una máxima actividad xilanasas de 8.9 UI/mL de su mejor cepa la cual fue seleccionada y codificada como MH1-a2.

Cruz *et al.*, (2009), a partir de composta de residuos agrícolas aisló hongos, bacterias y Actinomicetos con capacidades celulolíticas y xilanolíticas, realizó la extracción enzimática a partir de fermentación sumergida en medios de trazas de Mandels y Weber, utilizando xilano como sustrato, a 28°C por 4 días para hongos y 48 h para bacterias. Obtuvo la mejor actividad xilanasas de 11.2 UI/mL con bacterias, y una actividad celulolíticas de 2.10 UI/mL con hongos.

Fanchini *et al.*, (2010), a partir de mazorca y olotes, cáscara de avena y bagazo de caña por fermentación sumergida con cepa de *Penicillium janthinellum*, obtuvieron enzimas xilanolíticas entre ellas xilanasas extracelular, beta-xilosidasa y alfa-L-arabinofuranosidasa para ser utilizadas como aditivos para alimentos. Realizando una optimización de los estudios de concentración de la fuente de carbono, la temperatura y pH incultivo. La producción de estas enzimas se duplicó cuando los cultivos se suplementaron con grano agotado de cerveza a una concentración de 2%, pH 6,0 y 25 °C. En estas condiciones optimizadas obtuvieron una actividad de xilanasas de 15.19 UI/mL y 23.54 UI/mg, la actividad de beta-xilosidasa de 0.16 UI/mL y 0.25 UI/mg y la actividad de alfa-L-arabinofuranosidasa de 0.67 UI/ml y 1.04 UI/mg.

Cavalieri, *et al.*, (2013), evaluaron tres fuentes de carbono en la producción de xilanasas las cuales fueron: Salvado de arroz, Salvado de trigo, y Bagazo de caña en fermentación sumergida a partir de la cepa *Aspergillus niger*, bajo las siguientes condiciones: 35°C, pH 5, 110 rpm, durante 5 días; resultando el bagazo de caña como la mejor fuente de carbono con el cual se obtuvo la mayor actividad xilanasas de 11.57 UI/mL.

Díaz, *et al.*, (2019), llevaron a cabo la producción de xilanasas utilizando diversos residuos lignocelulósicos como sustrato los cuales fueron: Bagazo de yuca, Aserrín de pino, Aserrín de eucalipto, y Bagazo de caña en fermentación sumergida con la cepa *Aspergillus niger*, y utilizando las mismas condiciones de operación las cuales fueron: 28°C, pH 4.8, 100 rpm, durante 8 días; obtuvieron su mayor actividad xilanasas (32.05 UI/mL) a partir del bagazo de caña.

A partir de lo anterior se puede sintetizar lo siguiente:

- 1) Los residuos lignocelulósicos son una fuente potencial para la producción de xilanasas al mostrar una mayor actividad xilanasas que la que se obtiene por reactivos sintéticos como el xilano.
- 2) El bagazo de caña es una de las mejores fuentes de carbono para la producción de estas enzimas ya que es el residuo del que se obtiene la mayor actividad xilanasas (32.05 UI/mL)
- 3) El género *Aspergillus* es de los más utilizados para la producción de estas enzimas.

Así mismo se observa que los valores de pH oscilan entre 4 y 6, lo que demuestra que, entre estos valores, y a una temperatura alrededor de los 30°C los microorganismos producen la mayor cantidad de xilanasas; ya que estos dos factores juegan un papel muy importante en el metabolismo y en la morfología de los microorganismos.

Al utilizar residuos lignocelulósicos como alternativa para la producción de xilanasas, estas se obtienen de una forma más económica y sostenible en comparación con el proceso industrial de producción de xilanasas en el que se utilizan reactivos sintéticos.



## 2. JUSTIFICACIÓN

La utilización de microorganismos en diversos procesos industriales se ha elevado progresivamente, causando el desarrollo biotecnológico, y una disminución en los costos de producción y mayores rendimientos en los bioprocesos.

La tecnología de segunda generación como la producción de etanol a partir de materiales lignocelulósicos requiere de la acción concertada de enzimas como las celulasas y xilanasas para la generación de azúcares fermentables, transformando los polisacáridos como celulosa a glucosa por medio de una etapa conocida como hidrólisis enzimática.

La hidrólisis enzimática constituye la etapa crítica en el proceso de producción de etanol de segunda generación (2G), y las xilanasas son de las enzimas más utilizadas, sin embargo, debido a su elevado costo comercial, se buscan alternativas para la obtención de estas enzimas, que permitan reducir los costos de este proceso.

En este sentido, el presente proyecto está encaminado a la producción de xilanasas a partir de hongos autóctonos utilizando como fuente de carbono materiales lignocelulósicos residuales, bajo un esquema de desarrollo sostenible.

Este trabajo es parte del proyecto No. 2017-03-291143, del fondo sectorial SAGARPA-CONACYT: Producción de etanol 2G y enzimas obtenidas de microorganismos autóctonos.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GENERAL**

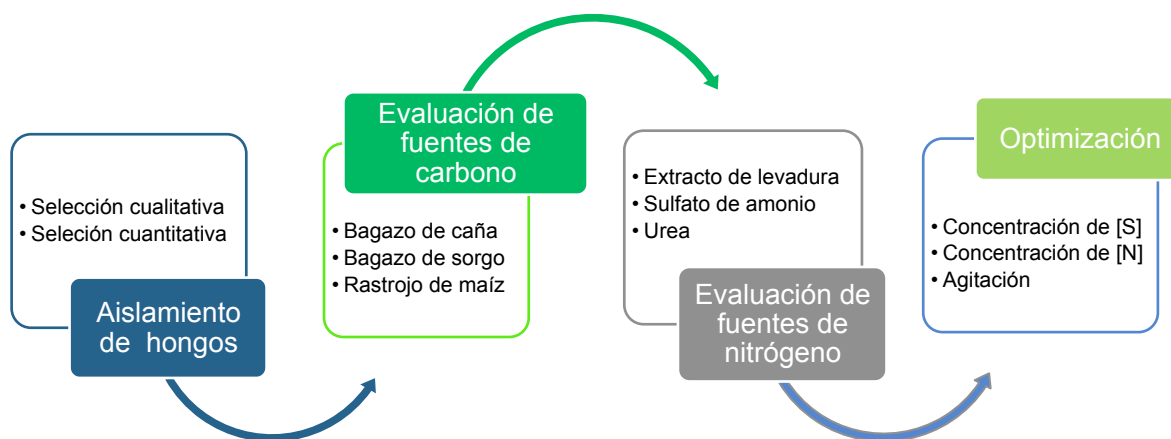
Producir xilanasas mediante el uso de residuos lignocelulósicos utilizando hongos autóctonos.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Aislar y seleccionar hongos productores de xilanasas.
- Evaluar el efecto de la fuente de carbono y nitrógeno sobre la producción de xilanasas.
- Optimizar la producción de xilanasas, en función de la concentración de sustrato, nitrógeno y velocidad de agitación.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

Para llevar a cabo el proceso de producción de xilanasas se estableció la siguiente metodología general, dividida en cuatro etapas, partiendo desde el aislamiento de hongos productores de xilanasas, evaluando su potencial de expresión de estas enzimas mediante pruebas de selección cualitativa y cuantitativa, posteriormente se evaluaron de diversas fuentes de carbono y nitrógeno, de las cuales se seleccionaron las mejores para la producción de xilanasas, y finalmente se optimizó la producción de estas enzimas en términos de concentración de sustrato seleccionado ([S]), concentración de la fuente de nitrógeno seleccionada ([N]), y velocidad de agitación, como se muestra en la Figura 4.1.



**Figura 4.1 Metodología general para la producción de xilanasas a partir hongos autóctonos usando residuos lignocelulósicos.**

#### **4.1 Recolección y toma de muestras de residuos lignocelulósicos**

Se llevó a cabo una selección de los diferentes tipos de residuos lignocelulósicos a tratar según sus características organolépticas y que presentaron deterioro microbiológico, con presencia de hongos, con objeto de facilitar la proliferación de los microorganismos. Los residuos de bagazo de caña y sorgo se recolectaron de la planta piloto de bioetanol ubicada en el Instituto Tecnológico de Veracruz, y los maderables fueron provenientes del campo experimental Cotaxtla, Veracruz zona golfo centro del INIFAP.

#### **4.2 Aislamiento de cepas fúngicas productoras de xilanasas**

Cada muestra de bagazo de caña, sorgo y madera (10 g) se sembró en agua peptonada (90 ml) 0.1% estéril ajustando el pH a 7 con hidróxido de sodio 0.1 N. A cada muestra se le agregó cloranfenicol en una concentración de 0.4 g/L, y se incubaron a 30°C a 150 rpm por 48 h en una incubadora marca Marca Lab Tech, Modelo LSI3016A.

Posteriormente se prepararon diluciones en agua estéril desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-6}$ . Se prepararon cajas de medios ricos en hemicelulosa como en la Tabla 4.1, y se adicionó cloranfenicol en una concentración de 0.4 g/L. De las últimas dos diluciones se sembraron 50  $\mu$ L por extensión en caja Petri con una espátula de Drigalsky sobre el medio. Para la detección de cepas fúngicas se incubaron a 30°C durante 72 h. Posterior a esto se prosiguió a determinar si existían en el medio diferentes tipos de colonias formadas y realizar el aislamiento por la técnica de siembra por punción hasta obtener cepas puras.

**Tabla 4.1. Composición de medio para aislamiento**  
**Medio rico en hemicelulosa:**

<b>Componentes</b>	<b>Cantidad (g/L)</b>
Hemicelulosa	20
Peptona de caseína	10
Extracto de Levadura	5
NaCl	5
Agar	20

#### **4.2.1 Medio de conservación**

Las cepas aisladas fueron conservadas en tubos y placas con medio PDA (Tabla 4.2) a 4°C, con resiembras cada 30 días.

**Tabla 4.2. Medio PDA para la conservación de la cepa.**

<b>Componentes</b>	<b>Cantidad (g/L)</b>
Extracto de levadura	10
Peptona de caseína	20
Dextrosa	20
Agar	25

#### 4.2.2 Determinación cualitativa de la actividad xilanasa

Se tomaron muestras de las cepas aisladas, colocándolas en un medio en placas rico en xilano (Tabla 4.3), para la determinación cualitativa de actividad xilanasa.

Una vez solidificadas las placas con medios, en cada una de estas se realizó un orificio de 6 mm de diámetro con un orador previamente esterilizado para posteriormente, evaluar los halos de hidrolisis de cada microorganismo.

Dado que se trata de hongos se preparó una solución de Tween 80 al 0.1% para cosechar las esporas, esto se realizó agregando 2 mL en los tubos inclinados con cultivo para lograr una solución de esporas, y finalmente se colocaron 50 µL de cada uno de los microorganismos y se incubaron a 30°C por 48 h.

**Tabla 4.3 Medio de prueba cualitativa de actividad xilanasa (Gaitán y Pérez, 2007)**

MEDIO RICO EN XILANO	
Componentes	Cantidad (g/L)
Xilano	10
Extracto de levadura	2.5
Peptona	2.5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5
CaCl <sub>2</sub>	0.5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.1
Agar	15

Transcurrido el tiempo de incubación se realizó una tinción adicionando 5 mL de rojo congo al 1% (p/v) a cada una de las placas, dejando actuar por 15 minutos, posteriormente se retiró el exceso de colorante y se lavó con 5 mL de solución 2 M de NaCl durante 15 minutos. Después de eliminar el exceso de la solución salina se determinó la actividad xilanolítica por la presencia de halos debidos a la hidrólisis de xilano, los cuales se midieron en cm, y se seleccionó a la cepa que presentó el mayor halo de hidrolisis xilanolítica, y realizar las siguientes evaluaciones.

### 4.2.3 Determinación cuantitativa de la actividad xilanasa

La cepa fúngica que haya sido seleccionada de la prueba cualitativa pasó a la prueba cuantitativa, la cual, se realizó conforme a la determinación de azúcares reductores, con la técnica de Miller (1959). Para lo cual, lo primero que se realizó es una activación de la cepa aislada.

#### 4.2.3.1 Activación de la cepa

La activación de la cepa se realizó mediante una solución de Tween 80 al 0.1% estéril para el arrastre de las esporas, colocando 10 mL a cada tubo que contenía las cepas.

#### 4.2.3.2 Preparación del inóculo

Se llevó a cabo la preparación del medio de fermentación en solución de trazas de Mandels y Weber (1969) como se muestra en la Tabla 4.4. El medio se esterilizó en autoclave a 121 °C y 1 atmósfera de presión durante 15 min. Y para la determinación de actividad xilanasa se utilizó xilano como sustrato (Costa *et al.*, 2010).

Tabla 4.4. Medio de trazas de Mandels y Weber (1969).

Compuesto	Cantidad (g/L)
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2.0
$\text{MgSO}_4\text{H}_2\text{O}$	0.3
$\text{CaCl}_2\text{H}_2\text{O}$	0.3
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.4
$\text{FeSO}_4\text{H}_2\text{O}$	5.0
$\text{MnSO}_4\text{H}_2\text{O}$	1.6
$\text{ZnSO}_4\text{H}_2\text{O}$	1.4
$\text{CuSO}_4\text{H}_2\text{O}$	1.0
Peptona	0.5
Carbohidrato	10

### 4.2.3.3 Inoculación

Después de realizar la activación y arrastre de esporas con Tween 80 al 0.1% para el hongo, se prosiguió a contar el número de esp/mL, realizado por conteo directo al microscopio óptico, utilizando una cámara de Thoma e inoculando  $3 \times 10^6$  esp/mL. Posteriormente se llevó a cabo una cinética de 120 h, realizando mediciones de absorbencia en un espectrofotómetro Cary 8454 UV-VIS a 540 nm, y realizando determinaciones de azúcares reductores a cada muestra.

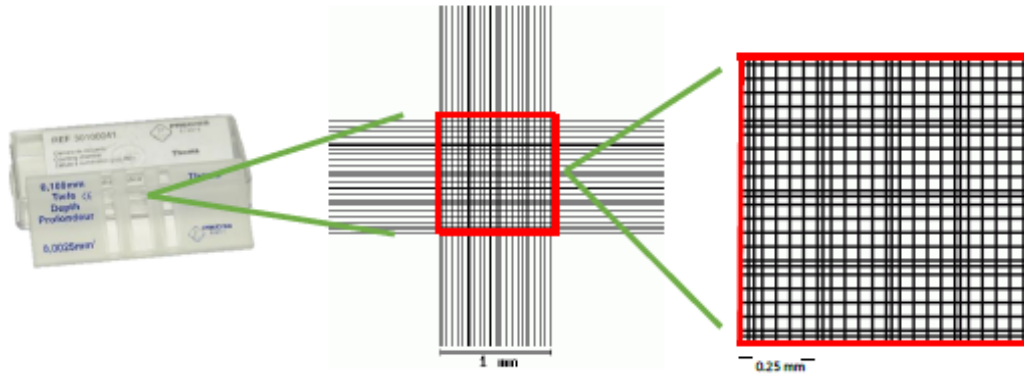
#### 4.2.3.3.1 Cuenta celular

El conteo de las esporas se realizó mediante un arrastre de éstas con una solución de Tween 80 al 0.1% (v/v) y posteriormente se realizó su conteo utilizando una cámara de Thoma la cual está constituida por las siguientes partes (Figura 4.2):

- Cuadro grande (centro de la cruz, 400 cuadros pequeños):  $1 \text{ mm}^2/400$  cuadros
- Cuadro mediano (formado por 16 cuadros):  $0.25 \text{ mm} \times 0.25 \text{ mm}$
- Cuadro pequeño:  $0.05 \text{ mm} \times 0.05 \text{ mm} = 0.0025 \text{ mm}^2$
- Líneas separadoras de cuadros medianos (en rojo):  $0.025 \text{ mm}$  del extremo del cuadro

La muestra del inculo se colocó mediante una pipeta Pasteur colocándola en una de las ranuras de la cámara con el cubreobjetos encima, poniendo la punta de la pipeta lo suficientemente cerca y haciendo presión con el pulgar para que por capilaridad las esporas se distribuyan en la zona de conteo de la cámara. El volumen aproximado a considerar para realizar el conteo es de  $20 \times 10^{-6}$  mL.





**Figura 4.2 Cámara de Thoma**

La concentración de esporas ( $X$ ) por mililitro está dada por la siguiente ecuación (4.1):

$$X = \frac{N * d}{Nc * 4} * 10^6 \quad (4.1)$$

Donde:

$N$  = Número de células

$D$  = Factor de dilución

$NC$  = Número de cuadros contados

Posteriormente se empleó la ecuación 4.2 para determinar el volumen a añadir de la solución de esporas obtenida en la fermentación:

$$C1 * V1 = C2 * V2 \quad (4.2)$$

Donde:

V1= Volumen de la solución de esporas que se debe añadir

C1= Concentración deseada en la fermentación  $3 \times 10^6$  esp/ml

V2= Volumen de fermentación

C2= X (Concentración de esporas)

#### **4.2.3.4 Fermentación sumergida**

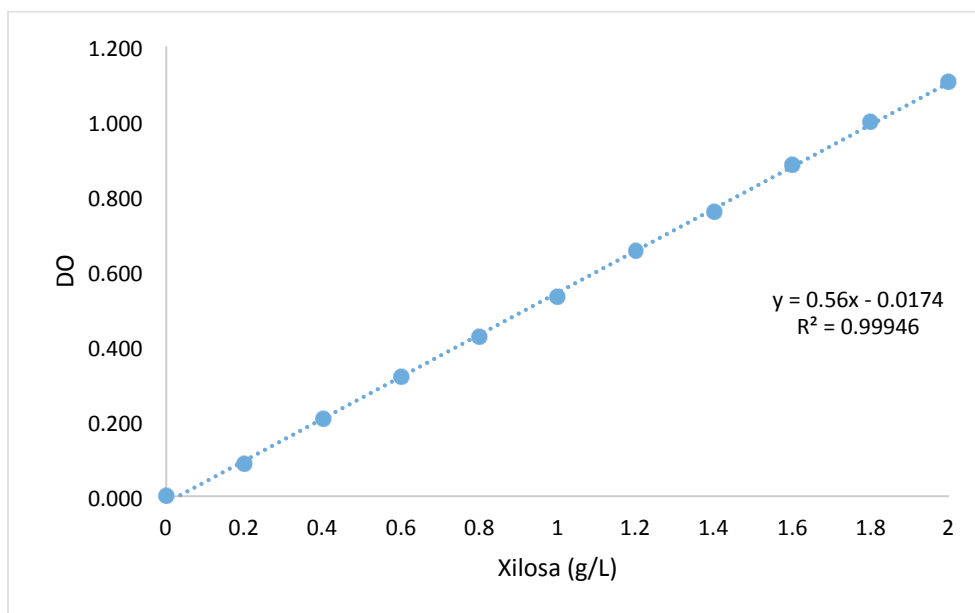
Se realizó una cinética de fermentación incubando por 120 h, 30°C y 250 rpm, tomando mediciones de las muestras en los tiempos 0,12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, y 120 h. La fermentación se llevó a cabo utilizando Xilano como fuente de carbono, La actividad xilanasa fue calculada mediante azúcares reductores de acuerdo con el método de Miller (1959), realizando una curva de calibración con xilosa.

##### **4.2.3.4.1 Determinación de azúcares reductores**

Para la determinación de la formación de azúcares reductores que para este caso es xilosa, se usa el reactivo DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico, que es color amarillo) que al reaccionar con dichos azúcares se reduce a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico de color rojo ladrillo, las mediciones se realizan determinando la absorbencia a 540 nm (Costa *et al.*, 2010).

El reactivo DNS se prepara disolviendo 1 g de 3-5 DNS y 30 g de  $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  en 16 mL de solución de NaOH al 10% (p/p) posteriormente se adicionan 50 mL de agua destilada, se lleva a un Baño María para disolver, y se afora a 100 mL en un matraz volumétrico.

Se realizó una curva patrón de xilosa con una concentración máxima de 2 g/L para la determinación de actividad xilanasas. Como se observa en la Figura 4.3; de la cual se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.9995 lo que garantiza la fiabilidad para los cálculos de concentración de xilosa liberada durante la reacción enzimática.



**Figura 4.3 Curva patrón de xilosa**

La pendiente de la ecuación de esta curva tiene unidades de (absorbancia / concentración), por lo tanto, dicha pendiente será utilizada para relacionarla con la pendiente que se obtiene de la cinética enzimática en la que se correlaciona (absorbancia / tiempo), teniendo como resultado unidades de (concentración / tiempo), para entonces obtener las unidades de actividad xilanasas.

#### 4.2.3.5 Obtención del extracto enzimático con actividad xilanasa

Después de la fermentación, el extracto enzimático crudo fue centrifugado a 4,000 rpm por 20 minutos a 4°C con la ayuda de una Centrífuga modelo 5804 R Marca eppendorf (Figura 4.3), se recuperó el sobrenadante y posteriormente se guardó el extracto enzimático en tubos Falcon de 50 mL a 4°C para su posterior análisis.



**Figura 4.3 Centrífuga eppendorf modelo 5804 R**

El proceso para determinar la actividad enzimática se midió máximo 2 días después de haber obtenido el extracto enzimático, para evitar la pérdida de actividad por inestabilidad.

#### 4.2.3.5.1 Método para medir la actividad xilanasa

Preparación del Sustrato:

Solución de Xilano al 1% en buffer de  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  0.05 M, pH 5.0.

Método

1. Añadir 1 mL de enzima a un tubo de ensayo para la reacción.
2. Mantener a una temperatura de 50°C, añadir 1 mL del sustrato y mezclar.
3. Se toman muestras de 100  $\mu\text{L}$  cada 2 minutos.
4. Añadir 100  $\mu\text{L}$  de DNS a cada muestra y mezclar.
5. Hervir durante 5 minutos exactamente en un baño de agua en ebullición con abundante agua. (Todas las muestras, blanco y estándares de xilosa, deben ser hervidos juntos). Después de hervir, enfriar durante 5 min.
6. Añadir 1 mL de agua desionizada o agua destilada. Mezclar por completo invirtiendo el tubo varias veces de manera que la solución se separe del fondo.
7. Leer las muestras a una longitud de onda de 540 nm en un espectrofotómetro Thermo Spectronic Genesys 4001/4 (Figura 4.3).



Figura 4.4 Thermo Spectronic Genesys 4001/4

Se tomaron las lecturas de absorbencia de las muestras y se realizaron los siguientes cálculos para obtener la actividad xilanasa (UI/mL).

Una unidad de actividad xilanasa se define como la cantidad de enzima capaz de liberar 1  $\mu\text{mol}$  de xilosa por minuto (ecuación 4.3) bajo condiciones estándares evaluadas de pH y Temperatura.

$$1 \text{ UI/mL} = \frac{1 \mu\text{mol de xilosa liberada}}{1 \text{ min}} \quad (4.3)$$

Cálculo de Unidades por mililitro:

1. Construir una curva estándar de xilosa con una concentración máxima de xilosa de 2 g/L, graficando contra la Absorbencia a 540 nm.
2. Usando esa línea estándar, obtener los valores de absorbencia de las muestras de la reacción entre la enzima y el sustrato.
3. Graficar la absorbencia de esta reacción contra el tiempo y obtener la pendiente.
4. Calcular UI (ecuación 4.4):

$$\text{UI/mL} = \left(\frac{m_1}{m_2}\right) * (FD) * \left(\frac{1\mu\text{mol}}{150.13\mu\text{g}}\right) * \left(\frac{1000\mu\text{g}}{1\text{mg}}\right) \quad (4.4)$$

Donde:

$m_1$ = Pendiente de la absorbencia contra tiempo de la muestra

$m_2$ = Pendiente de la línea estándar de xilosa

FD= Factor de dilución

### 4.3 Evaluación de la fuente de carbono sobre la producción de xilanasas

Después de evaluar la actividad xilanasa para cada una de las cepas se seleccionó aquella en la que se obtuvo la mayor actividad. Posteriormente con la cepa seleccionada se llevaron a cabo fermentaciones sumergidas para evaluar el efecto de la fuente de carbono sobre la producción de xilanasas, utilizando Xilano como testigo y tres diferentes tipos de residuos lignocelulósicos previamente deslignificados, como se muestra en la Tabla 4.5, en una concentración de 10 g/L.

**Tabla 4.5. Materiales lignocelulósicos como fuente de carbono.**

<b>Tipos de residuos</b>
*Bagazo de sorgo
*Bagazo de caña
*Rastrojo de Maíz
Xilano
*Deslignificado

Para que el microorganismo pueda aprovechar los polisacáridos como celulosa y hemicelulosa, es necesario remover la lignina mediante un pretratamiento alcalino de cada uno de los materiales, para realizarlo se utilizaron las condiciones óptimas de pretratamiento que se obtuvieron de estudios anteriores en el laboratorio de bioingeniería de acuerdo con (Partidas, 2017; Moran, 2018; Tiburcio, 2019).

#### **4.3.1 Pretratamiento Alcalino (Deslignificado) de los residuos lignocelulósicos**

Se pretrataron y utilizaron diferentes residuos lignocelulósicos como Bagazo de caña (BC), Bagazo de sorgo (BS), y Rastrojo de maíz (RM) como fuente de carbono para los hongos filamentosos en cultivo sumergido, dichos residuos fueron obtenidos de la planta de etanol de segunda generación, provenientes del campo experimental Cotaxtla, Veracruz zona Golfo centro del INIFAP.

#### **4.3.2 Hidrólisis alcalina del BS**

Se tomó 1 Kg de bagazo de sorgo y se colocó en un contenedor, agregando peróxido de sodio al 4% (v/v), en relación sólido-líquido (1:16) y ajustando pH a 11.5 con sosa caustica 10 M, a 25 °C por 45h, posteriormente se secó al sol, se pesó y etiqueto para su posterior uso.

#### **4.3.3 Hidrólisis alcalina del RM**

Se tomó 1 Kg del rastrojo de maíz y se colocó en un contenedor, agregando peróxido de sodio al 6% (v/v), en relación sólido-líquido (1:10) y ajustando pH a 11.5 con sosa caustica 10 M, a 25 °C por 10h, posteriormente se secó al sol, se pesó y etiqueto para su posterior uso.

#### **4.3.4 Hidrólisis alcalina del BC**

Se tomaron 20 Kg de bagazo de caña y se colocó en un tanque de hidrolisis alcalina escala planta piloto, agregando peróxido de sodio al 4% (v/v), en relación sólido-líquido (1:16) y ajustando pH a 11.5 con sosa caustica 10 M, a 25 °C por 96h, posteriormente se secó al sol, se pesó y etiqueto para su posterior uso y caracterización.

En la Figura 4.3, se muestra el pretratamiento para deslignificar el material lignocelulósico.





**Figura 4.5 Pretratamiento alcalino de los residuos lignocelulósicos**

#### **4.3.4.1 Caracterización del material lignocelulósico**

Para obtener la composición lignocelulósica previa y posterior del pretratamiento se llevó a cabo la metodología propuesta por el Laboratorio Nacional de Energías Renovables (NREL por sus siglas en inglés) en el reporte técnico NREL/TP-510-42618 “Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass”, la cual establece los métodos analíticos estándar para la biomasa.

La humedad se obtuvo mediante los datos arrojados por la termobalanza Precisa XM 50, en la cual se colocó 1 gramo de la muestra realizando un secado por 30 minutos y pasado el tiempo arrojó el porcentaje de humedad final.

Para la cuantificación de cenizas se realizó por el método propuesto por la Sociedad Americana de Químicos Petroleros (AOCS por sus siglas en inglés) AOCS Ba 5a-49 para lo cual se pesaron 2 gramos de muestra los cuales se colocaron en un crisol de porcelana previamente pesado y se llevó a una mufla Thermo Scientific FB1415M, a 550°C por 2 horas. Terminado el ciclo se retiró el crisol, y se dejó enfriar en un desecador para posteriormente pesarlo.

El porcentaje de cenizas se obtuvo mediante la ecuación (4.4):

$$\%Cenizas = \frac{\text{peso de las cenizas (g)}}{\text{peso inicial de la muestra (g)}} * 100 \quad (4.4)$$

Al llevarse a cabo la caracterización completa de los materiales crudos y pretratados se puede obtener el porcentaje de remoción de lignina con la ecuación (4.5):

$$\% \text{ de remoción de lignina} = 100 - \left( \frac{\% \text{ de lignina final} * 100}{\% \text{ de lignina final}} \right) \quad (4.5)$$

#### 4.3.5 Reducción del tamaño de partícula

Después del pretratamiento alcalino al que se sometieron los materiales lignocelulósicos, se realizó una disminución del tamaño de partícula de estos mismos como se muestra en la Figura 4.4, utilizando una pulverizadora modelo GRT-02A con el objetivo de que el hongo lo pueda digerir mejor en su fisiología como fuente de carbono para la expresión de xilanasas.



Figura. 4.6 Bagazo de caña con un tamaño de partícula de 750µm

#### 4.4 Evaluación de la fuente de nitrógeno sobre la producción de xilanasas.

Después de la evaluación de la fuente de carbono, se procedió a realizar la evaluación de la fuente de nitrógeno sobre la producción de xilanasas, para lo cual se probarán tres fuentes distintas las cuales fueron Sulfato de amonio  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , Urea  $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ , y Extracto de levadura en una concentración 1.5 g/L, como se muestra en la Tabla 4.6.

**Tabla 4.6. Fuentes de nitrógeno a evaluar.**

Fuente de nitrógeno
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
$\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$
Extracto de levadura

El medio de fermentación fue suplementado con cada una de estas fuentes de nitrógeno, para seleccionar aquella en la que se presente mayor actividad xilanasas, cuantificada por el método de Miller (1959).

#### 4.5 Optimización de la producción de xilanasas

Para la optimización de la producción de xilanasas una vez obtenida la mejor fuente de carbono y nitrógeno, se realizó un diseño central compuesto (Tabla 4.7) considerándose como variables independientes a tres niveles: Concentración [S] (10, 15 y 20 g/L), Concentración [N] (1, 1.5 y 2 g/L) y agitación (150, 200 y 250 rpm). La Tabla 4.8 muestra el diseño propuesto con valores codificados y reales teniéndose como variable de respuesta la actividad xilanasas, siendo cuantificada mediante la transformación de Xilano a azúcares reductores como xilosa usando DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico).

**Tabla 4.7. Rango experimental y niveles de acuerdo con un Diseño Central Compuesto (DCC).**

Variables	Niveles		
	-1	0	+1
<b>Concentración [S]</b>	<b>10</b>	<b>15</b>	<b>20</b>
<b>Concentración [N]</b>	<b>1</b>	<b>1.5</b>	<b>2</b>
<b>Agitación (rpm)</b>	<b>150</b>	<b>200</b>	<b>250</b>

**Tabla 4.8. Matriz de Diseño Central Compuesto para la optimización del proceso de producción de xilanasas con valores codificados y reales.**

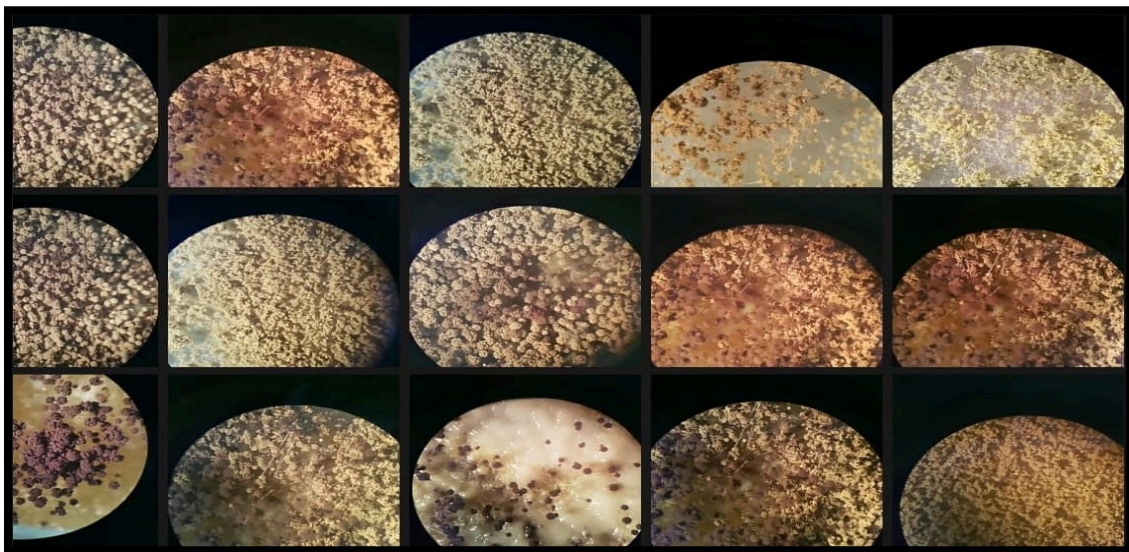
PRUEBA	VARIABLES CODIFICADAS			VARIABLES NATURALES		
	Concentración [S]	Concentración [N]	Agitación rpm	Concentración [S]	Concentración [N]	Agitación rpm
<b>1</b>	-1	-1	-1	10	1	150
<b>2</b>	1	-1	-1	20	1	150
<b>3</b>	-1	1	-1	10	2	150
<b>4</b>	1	1	-1	20	2	150
<b>5</b>	-1	-1	1	10	1	250
<b>6</b>	1	-1	1	20	1	250
<b>7</b>	-1	1	1	10	2	250
<b>8</b>	1	1	1	20	2	250
<b>9</b>	-1.6	0	0	6.6	1.5	200
<b>10</b>	1.6	0	0	23.4	1.5	200
<b>11</b>	0	-1.6	0	15	0.6	200
<b>12</b>	0	1.6	0	15	2.3	200
<b>13</b>	0	0	-1.6	15	1.5	116
<b>14</b>	0	0	1.6	15	1.5	284
<b>15</b>	0	0	0	15	1.5	200
<b>16</b>	0	0	0	15	1.5	200
<b>17</b>	0	0	0	15	1.5	200

Teniendo como variable de respuesta la actividad enzimática. Una vez realizadas todas las corridas experimentales, se llevó a cabo la validación de las condiciones óptimas obtenidas del modelo obtenido por el software estadístico NCSS.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Aislamiento de microorganismos

A partir de la incubación en agua peptonada de las muestras de madera, bagazo de caña, y bagazo de sorgo se realizaron diluciones seriadas desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-5}$ , de las cuales se sembraron usando una espátula de Drigalsky en cajas con medio rico en xilano. Después de transcurridas 48 h de incubación se observó el crecimiento de diversas colonias (Figura 5.1) de las cuales se prosiguió a realizar una siembra por punción, el tipo de colonia a purificar se seleccionó con la ayuda de un estereoscopio.

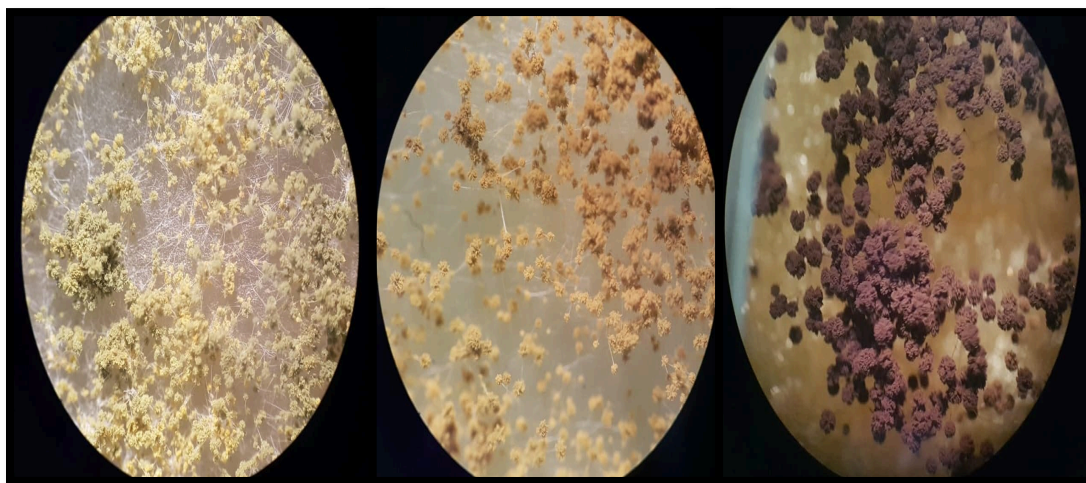


**Figura 5.1. Crecimiento de diversas colonias fúngicas.**

Al partir de las muestras de los residuos agrícolas, BS, BC y RM se obtuvieron  $3 \times 10^7$ ,  $3 \times 10^7$  y  $4 \times 10^7$  UFC/g de residuo respectivamente, es decir la carga microbiana fue similar en los tres residuos.

## 5.2 Propagación y mantenimiento de los microorganismos

La técnica anterior se repitió hasta obtener cepas puras de estos hongos autóctonos (Figura 5.2), posteriormente, se sembraron en un medio de conservación de PDA en tubos inclinados de 20 mL, para una mejor manipulación y evitar la contaminación de los cultivos.



**Figura 5.2. Cepas fúngicas totalmente purificadas.**

Se aislaron un total de 10 cepas puras de hongos autóctonos, capaces de crecer en medio con Xilano (Tabla 5.1). Lo cual los caracteriza como microorganismos potenciales para hidrolizar hemicelulosa, debido a que estos microorganismos son capaces de crecer y desarrollarse en este medio.

**Tabla 5.1 Total de microorganismos aislados en medio selectivo de Xilano**

MUESTRA	MICROORGANISMO	XILANO
Bagazo de sorgo		4
Bagazo de caña	Hongos	2
Residuos de madera		4

### 5.3 Caracterización cinética de actividad enzimática

Para la caracterización de la actividad xilanasa se realizaron dos procesos de evaluación, una prueba cualitativa y una selección cuantitativa de actividad enzimática, como se presenta a continuación.

#### 5.3.1 Selección primaria: Prueba cualitativa de actividad enzimática

La evaluación se realizó preparando medio sólido de prueba cualitativa rico en xilano y carboximetil celulosa con forme a lo reportado por Gaitán y Pérez (2007), y cuya composición se muestra en la Tabla 4.1. Transcurridas las 48 h de incubación se continuó realizando una tinción con solución de Rojo Congo al 10 %, y se retiró el exceso de colorante con una solución de NaCl 2 M.

Posteriormente se realizó la medición del diámetro (en centímetros) de los halos de hidrolisis formados en cada orificio de las cajas, las mediciones se realizaron con ayuda de una regla, y se obtuvo un promedio de los orificios como se muestra en la Figura 5.3 y en la Tabla 5.2.

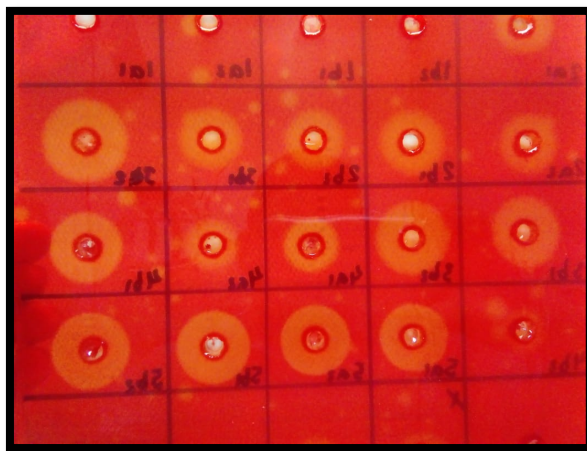


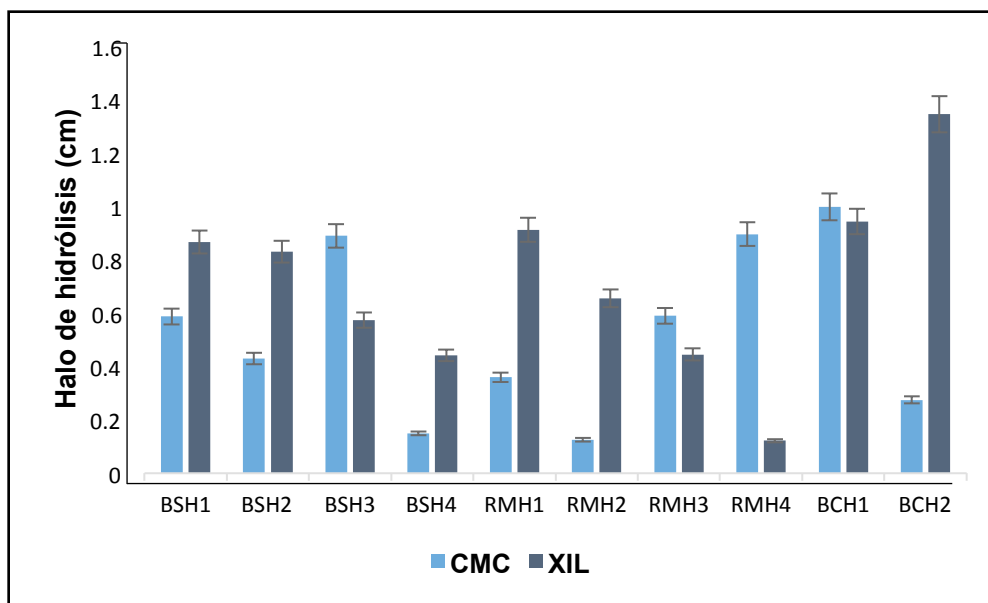
Figura 5.3 Determinación cualitativa de la actividad enzimática



**Tabla 5.2 Prueba cualitativa de actividad en medio de CMC y XIL (Gaitán y Pérez, 2007)**

M.O	CMC		XIL	
	MUESTRA	PROMEDIO	MUESTRA	PROMEDIO
Hongos	BSH1	0.587	BSH1	0.867
	BSH2	0.430	BSH2	0.830
	BSH3	0.890	BSH3	0.574
	BSH4	0.150	BSH4	0.442
	RMH1	0.360	RMH1	0.913
	RMH2	0.125	RMH2	0.655
	RMH3	0.590	RMH3	0.445
	RMH4	0.896	RMH4	0.122
	BCH1	0.998	BCH1	0.943
	BCH2	0.275	BCH2	1.345

Como se puede observar a partir de los resultados mostrados en la Tabla 5.2, todos los hongos son capaces de producir enzimas que hidrolizan tanto CMC como xilano, sin embargo, algunos son mejores en CMC y otros en xilano, como se muestra también en la Figura 5.4.



**Figura 5.4 Halos de actividad enzimática en Carboximetilcelulosa (CMC) y Xilano (XIL)**

A partir de los resultados obtenidos de la evaluación primaria se seleccionó a la cepa BCH2 como el hongo mejor productor de xilanasas, dado que presentó el mayor halo de hidrólisis en xilano de 1.345 cm, mayor al reportado por (Reyes, 2015), quien también realizó aislamiento de cepas xilanolíticas con una capacidad máxima de 1 cm. Y con lo reportado por Mikán y Castellanos (2004) que aislaron tres tipos de microorganismos diferentes entre los que obtuvieron un halo de degradación máximo para hongos de 0.8 cm

Por lo tanto, de esta evaluación se seleccionó la cepa BCH2 como la mejor y se eligió como un microorganismo potencial para la producción de xilanasas y para las pruebas posteriores.

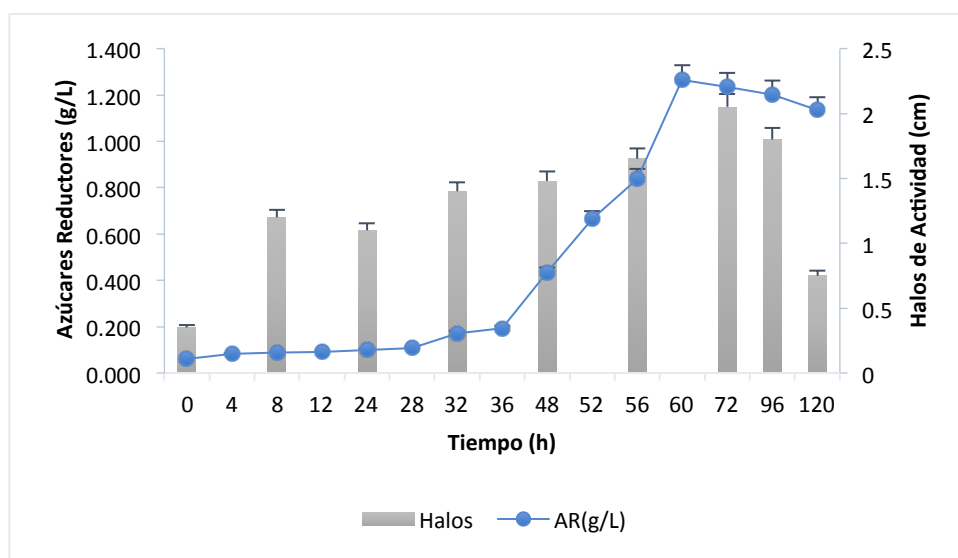
### **5.3.2 Selección secundaria: Prueba cuantitativa de actividad xilanasa por fermentación sumergida (SMF).**

Para esta evaluación se determinó la actividad cuantitativa de acuerdo al método de Miller (1959) de azúcares reductores. Para la determinación de azúcares reductores se realizó una curva patrón de xilosa como se observó en la Figura 4.3.

De esta curva patrón se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.9995 lo que garantiza la fiabilidad para los cálculos de concentración de xilosa liberada durante la reacción enzimática.

A partir de lo anterior se llevaron a cabo fermentaciones sumergidas utilizando xilano como sustrato inductor en la cepa seleccionada BCH2 para la expresión de xilanasas, las cuales dado que son enzimas extracelulares son excretadas al medio de cultivo, de donde se pueden recuperar las enzimas, para su posterior evaluación.

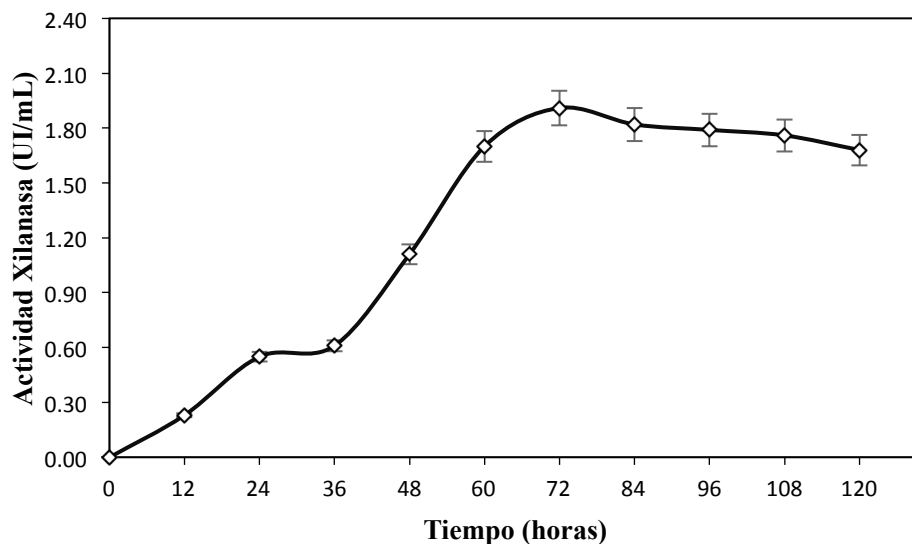
Las fermentaciones se realizaron con el medio de trazas propuesto por Mandels y Weber (1969). Los resultados de azúcares reductores y halos de actividad de la cinética de fermentación con la cepa seleccionada BCH2 se muestran en la Figura 5.6.



**Figura 5.6 Halos de actividad y azúcares reductores generados en la cinética de fermentación con xilano.**

Se puede observar que a existe un incremento tanto en los azúcares reductores como los Halos de actividad durante la fermentación, sin embargo, de estos dos factores se determinó que los halos de hidrólisis brindan un mejor criterio de que el microorganismo está produciendo xilanasas.

No obstante, para evaluación de la producción y la eficiencia de las xilanasas producidas, se realizó el cálculo de la actividad cuantitativa del extracto enzimático obtenido de la fermentación. En la Figura 5.7, se muestra la cinética enzimática de la producción de xilanasas hasta las 120 horas por el hongo BCH2 usando xilano como inductor.



**Figura 5.7 Cinética enzimática de actividad xilanasas**

Donde se observa que a las 72 horas se obtiene la mayor actividad xilanasas con un valor de 1.91 UI/mL. Por lo tanto, para las siguientes evaluaciones las fermentaciones se llevarán a cabo hasta este tiempo, ya que como se puede observar después de las 72 horas la actividad comienza a disminuir.

#### 5.4 Evaluación de la fuente de carbono sobre la producción de xilanasas

Para la producción de xilanasas se evaluó el efecto de diversos residuos lignocelulósicos deslignificados como inductores para la expresión de estas enzimas. En la Tabla 5.3 se observa que, de los tres residuos evaluados, el bagazo de caña mostró ser el mejor inductor con una actividad xilanasas de 2.90 UI/mL.

**Tabla 5.3. Evaluación del efecto de los residuos lignocelulósicos como fuente de carbono sobre la producción de xilanasas.**

Fuente de carbono	Composición lignocelulósica (%)			Actividad xilanasas (UI/mL)
	Celulosa	Hemicelulosa	Lignina	
Bagazo de caña	76.12	25.55	5.03	<b>2.90 ± 0.130</b>
Bagazo de sorgo	36.29	26.76	5.23	2.22 ± 0.180
Rastrojo de maíz	44.48	26.85	8.88	2.61 ± 0.205
Xilano	100% Hemicelulosa			1.91 ± 0.170

A partir de la Tabla 5.3, se obtiene que, al utilizar bagazo de caña como fuente de carbono se incrementa la producción de xilanasas, 58%, 45%, y 23% más, en comparación con: bagazo de sorgo, rastrojo de maíz y xilano respectivamente. Esto, podría estar relacionado a su bajo contenido de lignina y su alto porcentaje de celulosa. Aunque se esperaría que la mejor fuente de carbono fuese el xilano, se concluye que la presencia de un alto porcentaje de celulosa y hemicelulosa promueve la producción de xilanasas, esto también se encuentra reportado por Díaz, *et al.*, (2019), los cuales evaluaron diversos residuos lignocelulósicos en la producción de xilanasas como: bagazo de yucca, aserrín de pino, aserrín de eucalipto y bagazo de caña, obteniendo la mejor actividad con este último sustrato, debido a que éste residuo contenía arriba del 80% de celulosa y hemicelulosa.

### 5.5 Evaluación de la fuente de nitrógeno sobre la producción de xilanasas.

Después de seleccionar al bagazo de caña como la mejor fuente de carbono, se realizó la evaluación de la fuente de nitrógeno sobre la producción de xilanasas. Se realizaron tres fermentaciones suplementando el medio con Sulfato de amonio ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), Urea  $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ , y Extracto de levadura (E.L.) respectivamente. En la Figura 5.8 se muestra que el Sulfato de amonio (SA) resultó ser la mejor fuente de nitrógeno para la producción de xilanasas con una actividad de 5.35 UI/mL, mayor que Urea y E.L. con actividades de 2.48 UI/mL y 2.56 UI/mL respectivamente.

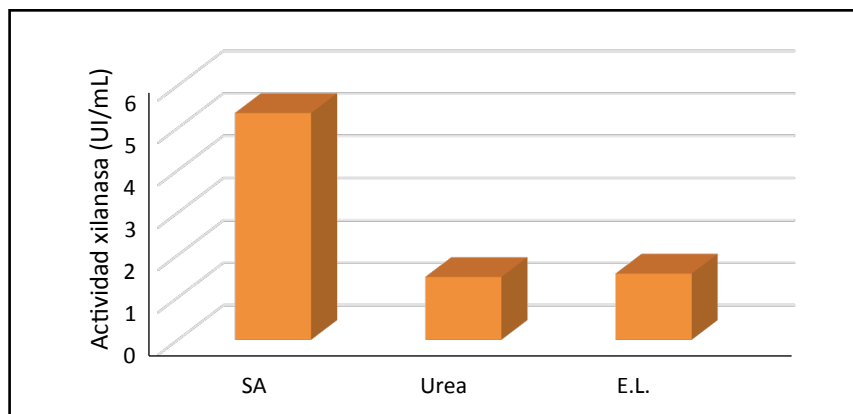


Figura 5.8 Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la producción de xilanasas

Por lo tanto, se concluye que el Sulfato de amonio es la mejor fuente de nitrógeno y que incrementa la producción 1.8 veces que antes de suplementar el medio con sulfato de amonio.

Este resultado es congruente con lo reportado con Dhulappa, *et al.*, (2015), quienes evaluaron diversas fuentes de nitrógeno en la producción de xilanasas como: nitrato de amonio, extracto de levadura, extracto de carne y peptona, a partir de esto resultó que la mayor actividad xilanasas la obtuvo al suplementar su medio de cultivo con nitrato de amonio, lo que demuestra que las sales de amonio son las mejores fuentes de nitrógeno para producción de estas enzimas.

Esto podría estar relacionado a que dichas sales representan la forma más simple y fácil para que los microorganismos asimilen el nitrógeno, metabólicamente esto sucede a través de la glutamato deshidrogenasa y la glutamina sintasa, estas dos enzimas efectúan la conversión del amoníaco en los aminoácidos glutamato y glutamina, respectivamente. Los grupos amino y amido de estas dos sustancias son transferidos a otros esqueletos de carbono por reacciones de transaminación y transamidación para la síntesis de aminoácidos y de proteínas.

## **5.6 Determinación de las condiciones óptimas de la producción de xilanasas**

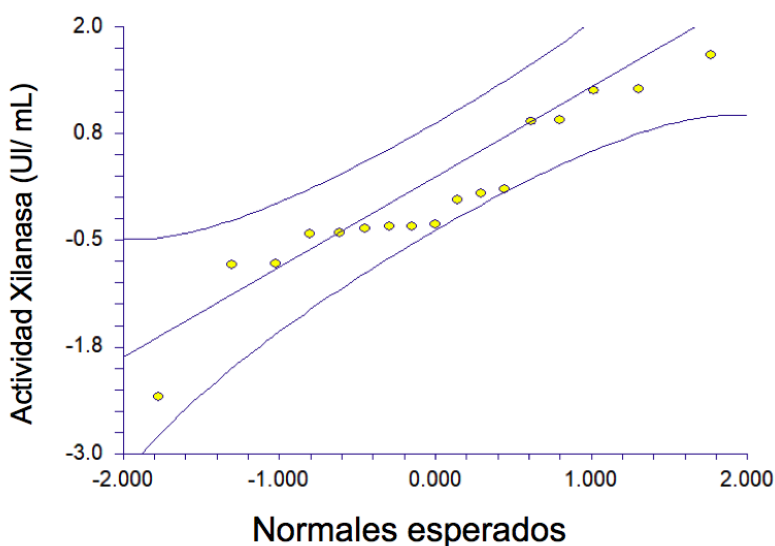
Para la optimización de la producción de xilanasas, una vez que se obtuvo la mejor fuente de carbono y nitrógeno, se realizó un Diseño Central Compuesto (Tabla 5.4) considerándose como variables independientes a tres niveles: Concentración [S] (10, 15 y 20 g/L), Concentración [N] (1, 1.5 y 2 g/L) y agitación (150, 200 y 250 rpm). La variable de respuesta fue la actividad xilanasas, siendo cuantificada mediante la transformación del Xilano a xilosa, usando DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico).

**Tabla 5.4. Diseño Central Compuesto para la producción de xilanasas**

PRUEBA	VARIABLES INDEPENDIENTES			ACTIVIDAD XILANASA
	Concentración [S]	Concentración [N]	Agitación	UI/mL
<b>1</b>	-1	-1	-1	7.1
<b>2</b>	1	-1	-1	7.77
<b>3</b>	-1	1	-1	6.81
<b>4</b>	1	1	-1	7.23
<b>5</b>	-1	-1	1	7.21
<b>6</b>	1	-1	1	8.04
<b>7</b>	-1	1	1	6.79
<b>8</b>	1	1	1	5.92
<b>9</b>	-1.6	0	0	6.87
<b>10</b>	1.6	0	0	3.4
<b>11</b>	0	-1.6	0	9.8
<b>12</b>	0	1.6	0	8.47
<b>13</b>	0	0	-1.6	2.18
<b>14</b>	0	0	1.6	8.61
<b>15</b>	0	0	0	7.24
<b>16</b>	0	0	0	7.31
<b>17</b>	0	0	0	7.36

Los resultados obtenidos se analizaron en el software estadístico NCSS para obtener las condiciones óptimas de maximización de la actividad xilanasas.

El análisis de la variable de respuesta genero un polinomio de tercer orden (Ec. 5.1) con un ajuste ( $R^2$ ) de 97.27%, representado por el diagrama de probabilidad normal (Figura 5.9) donde se observa que los residuos se encuentran estandarizando y dentro de los límites de probabilidad, con una dispersión de 2.73%, lo cual garantiza la fiabilidad de los datos experimentales y su reproducción teórica.

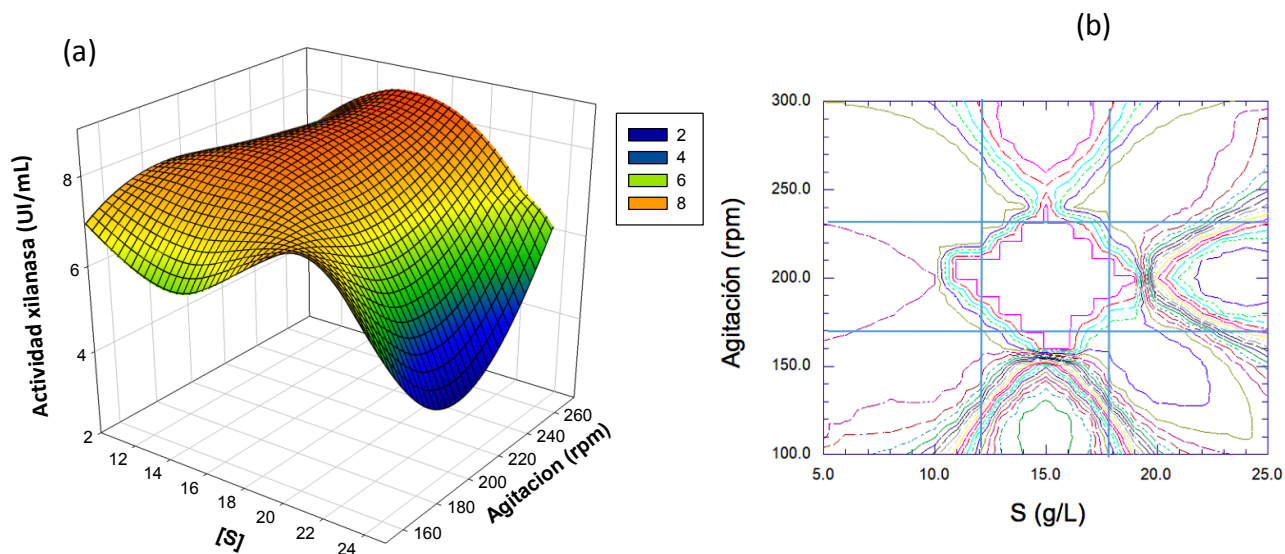


**Figura 5.9 Gráfico de probabilidad normal**

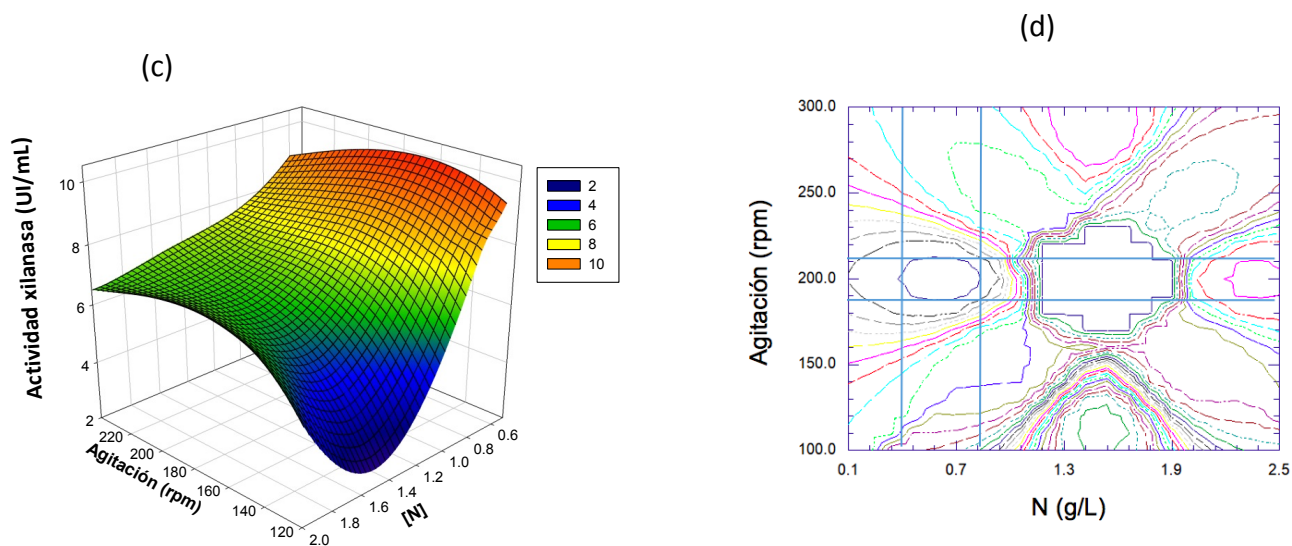
$$\begin{aligned}
 \text{Actividad Xilanasa} \left( \frac{\text{UI}}{\text{mL}} \right) = & 6.679 - 2.261X_1 - 7.015X_2 + 0.1224X_3 + 0.203X_1^2 + 3.122X_2^2 - \\
 & 2.166E - 04X_3^2 - 5.087E - 03X_1^3 - 0.097X_1X_2 - 0.0005X_1X_3 - 0.008X_2X_3 \quad (\text{Ec. 5.1})
 \end{aligned}$$



El análisis de superficie de respuesta y de contornos muestran las condiciones óptimas para que se lleve a cabo la producción de xilanasas como se observa en las Figura 5.10 y 5.11.



**Figura 5.10 (a) Superficie de respuesta [S] vs Agitación y (b) Grafico de contornos de condiciones óptimas del proceso.**



**Figura 5.11 (c) Superficie de respuesta [N] vs Agitación y (d) Grafico de contornos de condiciones de maximización del proceso.**

A partir del análisis anterior las mejores condiciones arrojadas por el modelo son 15 g/L de bagazo de caña, 0.7 g/L de Sulfato de amonio y 200 rpm, con un valor predicho de 10.7 UI/mL. Finalmente se realizó la validación de las mejores condiciones para la producción de xilanasas, y se obtuvo una actividad xilanasas de 10.9 UI/mL  $\pm$  0.19, es decir, 2% mayor al predicho. Por lo tanto, la producción de xilanasas se optimizó 5.7 veces con respecto a la primera actividad que se tuvo con un valor de 1.91 UI/mL. La optimización permitió incrementar la actividad xilanasas de 5.35 a 10.9 UI/ml lo que representa un aumento mayor al 100 %.

### 5.7 Identificación molecular de los hongos aislados

Las cepas aisladas fueron identificadas molecularmente a través de la secuenciación de la región ITS1 e ITS4, como se muestra en la Tabla. 5.5.

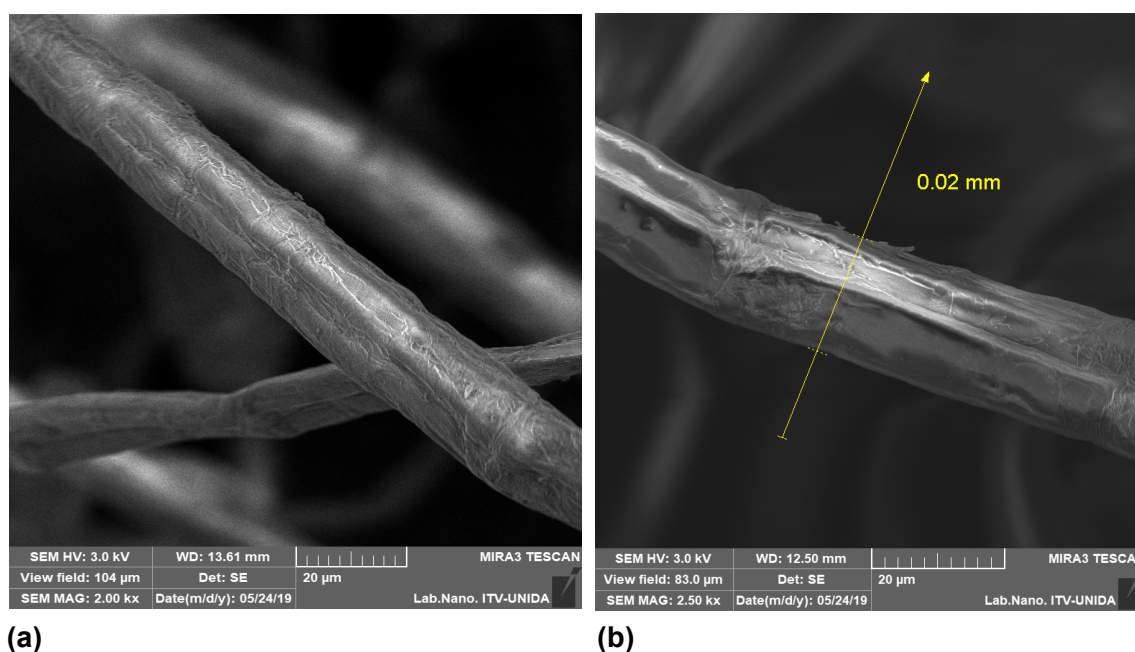
**Tabla 5.5. Identificación molecular de los aislados con actividad xilanasas**

Clave	Microorganismo	Covertura (%)	Identidad (%)	No. de acceso
BSH1	<i>Aspergillus brasilensis</i>	100%	100%	MH862749.1
BSH2	<i>Aspergillus niger</i>	100%	100%	MK138359.1
BSH3	<i>Aspergillus niger</i>	100%	100%	MK543209.1
RMH1	<i>Aspergillus niger</i>	100%	100%	MK543209.1
RMH2	<i>Aspergillus tubingensis</i>	100%	100%	MK551153.1
RMH3	<i>Aspergillus tubingensis</i>	100%	100%	MK551153.1
RMH4	<i>Apergillus brasilensis</i>	100%	100%	MH137913.1
BCH1	<i>Aspergillus niger</i>	100%	100%	MK543209.1
BCH2	<i>Aspergillus tamaraii</i>	100%	99.09	KC874831.1

Se encontró que el 100% de las cepas están relacionadas con diferentes especies de *Aspergillus* (Tabla 1), el 44% con *A. niger*, el 22% con *A. brasilensis*, el 22% con *A. tubingensis* y el 11% con *A. tamaraii*.

## 5.7 Efecto de la capacidad de hidrólisis del extracto enzimático obtenido sobre la estructura o degradación del residuo.

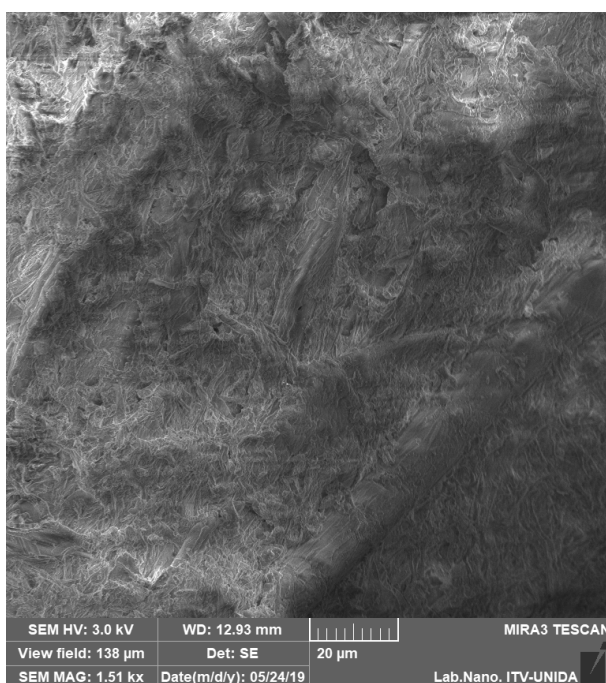
El extracto enzimático obtenido, demostró su potencial para la degradación de residuos lignocelulósicos, para este caso, se probó con bagazo de caña (BC) deslignificado, rico en celulosa y hemicelulosa; a continuación, se muestran micrografías tomadas a través de un Microscopio Electrónico de Barrido utilizando un haz de electrones secundarios para la detección de las microestructuras de este material, las micrografías se tomaron del bagazo de caña antes de la fermentación (Figura 5.12) y después de la acción enzimática (Figura 5.13).



**Figura 5.12 Micrografía del BC deslignificado (a) vista general y (b) vista aumentada con dimensiones**

En la Figura 5.12 (a) se puede observar que las fibras de las microestructuras obtenidas corresponden a la celulosa; con presencia de pequeños residuos en su superficie que pueden asociarse a la lignina no removida en su totalidad, la cual, de acuerdo con su caracterización lignocelulósica fue menor al 5%, esto significa que el pretratamiento alcalino utilizado fue efectivo, al remover más del 90% de la

lignina, esto permite que el microorganismo pueda tener acceso a la celulosa y a la hemicelulosa disponible, y utilizarlas como fuente de carbono para la síntesis de las enzimas necesarias para llevar a cabo la hidrólisis de estos polisacáridos. En la Figura 5.12 (b) se puede apreciar mejor la morfología cilíndrica de las fibras de celulosa perfectamente definidas antes de la acción enzimática, con un diámetro de 0.02 mm, esta micrografía fue tomada con una resolución de 20  $\mu\text{m}$ . Posterior al pretratamiento alcalino, se producen cambios estructurales de los residuos lignocelulósicos, obteniendo materiales menos cristalinos y más porosos lo que podría aumentar la accesibilidad del microorganismo al complejo lignocelulósico.



**Figura 5.13 Micrografía del BC después de la acción enzimática**

En la Figura 5.13 se puede observar el cambio en la morfología de la celulosa que ha perdido totalmente su estructura cilíndrica debido a la degradación, y se aprecia que las fibras de este polisacárido han sido licuadas casi en su totalidad después de la acción enzimática, esto se debe a la acción concertada de las enzimas presentes en el extracto que hidrolizan las uniones glucosídicas ( $\beta$ -1,4)

entre los azúcares que constituyen a la celulosa y a la hemicelulosa. Por lo tanto, el extracto enzimático obtenido, tuvo un efecto potencial para la hidrólisis de los residuos lignocelulósicos como el bagazo de caña en este caso; y podrá ser utilizado para la generación de azúcares fermentables en la etapa de la hidrólisis enzimática del proceso de producción de etanol de segunda generación.

Los resultados obtenidos permiten caracterizar la cepa autóctona BCH2 en términos metabólicos, considerando que el bagazo de caña deslignificado es una fuente de carbono altamente asimilable por este microorganismo y actúa como sustrato inductor que va a regular al promotor para la activación de los genes que codifican para la expresión de enzimas xilanasas y celulasas.

## 6. CONCLUSIONES

Todas las cepas fúngicas aisladas presentaron actividad xilanasa, sin embargo para fines de éste proyecto, se seleccionó la cepa BCH2 ya que expresó la mayor producción de xilanasas.

A partir de la evaluación de la fuente de carbono se seleccionó el bagazo de caña como mejor sustrato, donde se observa la mayor actividad xilanasa, debido su bajo contenido de lignina y su alto contenido de celulosa y hemicelulosa, ya que estos factores afectan la producción de estas enzimas.

El Sulfato de amonio fue la mejor fuente de nitrógeno obteniendo una actividad de 5.35 UI/ml, incrementando la producción de xilanasas 1.8 veces más que antes de suplementar el medio con este nutriente.

A partir de la optimización las mejores condiciones para la producción de xilanasas fueron 15 g/L de bagazo de caña, 0.7 g/L de Sulfato de amonio y 200 rpm de agitación. La optimización permitió incrementar la actividad xilanasa de 5.35 a 10.9 UI/ml lo que representa un aumento mayor al 100 %.

Los hongos que se aislaron presentaron actividad xilanasa, y todos ellos relacionados con distintas especies del género *Aspergillus*.

El extracto enzimático obtenido, tuvo un efecto potencial para hidrolisis de residuos lignocelulósicos; y podrá ser utilizado para la generación de azúcares fermentables en la etapa de la hidrolisis enzimática del proceso de producción de etanol de segunda generación.

## 7. RECOMENDACIONES

- Caracterizar el extracto enzimático obtenido, en términos de Temoestabilidad, pH y perfil de Temperatura.
- Evaluar la capacidad de hidrólisis del extracto obtenido sobre diferentes residuos agroindustriales.
- Purificar las enzimas obtenidas para realizar un estudio comparativo con las xilanasas comerciales Cellic HTec3 monitoreando la hidrolisis de diversos residuos lignocelulósicos.
- Evaluar los parámetros cinéticos de la enzima Km y Vmax.
- Escalar el proceso de producción de xilanasas a nivel planta piloto

## 8. BIBLIOGRAFÍA

Akpinar, O., Erdogan, K., y Bostanci, S. (2009). Enzymatic production of xylooligosaccharide from selected agricultural wastes. *Food and Bioproducts Processing*, 87(2): 145-151.

Adsul, M., Ghule, J., Shaikh, H., Singh, R., Bastawde, D. y Varma, A. 2005. Enzymatic hydrolysis of delignified bagasse polysaccharides. *Carbohydrate polymers*, 62(1).

Arni, S., Zilli, M., y Converti, A. (2007). Solubilization of lignin components of food concern from sugarcane bagasse by alkaline hydrolysis. *Food Science and Technology*. (4): 271-277

Bayer, E.A., Morag, F., y Lamed, R. (1994). The cellulosome a treasure-trove for biotechnology. *Trends in Biotechnology*. 12 (9): 379-386

Bayer, E.A., Belaich, P., Shoham, Y. y Lamed, R. (2004). The celulosomes: multienzyme machines for degradations of plant cell Wall polysaccharides. *Annual Review of Microbiology*. 58: 521-554.

Beg, Q. K., Bhushan, B., Kapoor, M., y Hoondal, G. S. (2000). Enhanced production of a thermostable xylanase from *Streptomyces* sp. QG-11-3 and its application in biobleaching of eucalyptus kraft pulp. *Enzyme and Microbial Technology*, 27(7), 459-466.



Beg, Q., Kapoor, M., Mahajan, L., y Hoondal, G. S. (2001). Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Applied microbiology and biotechnology*, 56(3-4): 326-338.

Brink J., y Vries R. 2011. Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. *Applied microbiology and biotechnology*. 91: 1477-1492.

Bueno G., Cordevés M. y Delgado G. 2009. Sorgo dulce: sus potencialidades productivas. *Redalyc*. 43 (3): 15-21.

Camacho, N. A., y Aguilar, G. (2003). Production, purification, and characterization of a low-molecular-mass xylanase from *Aspergillus sp.* and its application in baking. *Applied biochemistry and biotechnology*, 104(3): 159-171.

Chávez, R., Bull, P., y Eyzaguirre, J. (2006). The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium*. *Journal of biotechnology*, 123(4): 413-433.

Chander, R., Gupta, R. y Singh, A. 2011. Microbial cellulases and their industrial applications. *Enzyme Research*, 2011: 1-10.

Conde-Mejía, C., Jiménez-Gutiérrez, A., El-Halwagi, M. (2012). A comparison of pretreatment methods for bioethanol production from lignocellulosic materials. *Process Safety and Environmental Protection*. 90:189-202.

Costa M., Torres M., Magariños H. y Reyes A. 2010. Producción y purificación parcial de enzimas hidrolíticas de *Aspergillus ficuum* en fermentación sólida sobre residuos agroindustriales. *Revista colombiana de biotecnología*. 12 (2):163-175.

Coughlan, M.P., Touhy, M.G., Filho, E.X.F., Plus, J., Claeysens, M., Vrsanska, M., y Hughes, M.M. (1993). Enzymological aspects of microbial hemicellulases with emphasis on fungal systems. In *Hemicellulose and Hemicellulases*. Coughlan M.P. and Hazlewood G.P. (Eds). Portlan Press, London. 53-84.

de Vries, R. P., y Visser, J. (2001). *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiology and molecular biology reviews*, 65(4): 497-522.

El-Hadi, A. El-Nour, S. Hammad, A. Kamel, Z., 2014. Optimization of cultural and nutritional conditions for carboxymethylcellulase production by *Aspergillus hortai*. *Journal of Radiation Research and Applied Science*, 7: 23-28.

Faheina, G., Sabóia, M., Gondim, C., Menezes, D., Alves, K. y Saavedra, G., 2015. Strategies to increase cellulase production with submerged fermentation using fungi isolated from the Brazilian biome. *Acta Scientiarum. Biological Science*, 37(1): 15-22.

Fanchini, C., Temer, B., Teixeira, M. y Cano, E. 2010. Production of xylanolytic enzymes by *Penicillium janczewskii*. *Bioresource Technology*. 101: 4139-4143.

Fengel, D. y Wegener, G. (1984). *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions*. Walter de Gruyter. Berlin.

Fernández F. 2012. Producción de xilanasas por cepas de *Aspergillus niger* en cultivo sólido sobre salvado de avena y salvado de trigo. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Querétaro.

Ghose, T., 1987. Measurement of cellulase activities. *Pure and applied chemistry*. 59(2): 257-268.

Gurung, N., Ray, S., Bose, S. y Vivek, R., 2013. A broader view: Microbial enzymes and their relevance in industries, Medicine and beyond. *BioMed Research International*, 2013: 18.

Haq, I., Javed, M. y Khan, T., 2006. An innovative approach for hyperproduction of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes by consortium of *Aspergillus niger* MSK-7 and *Trichoderma viride* MSK-10. *African Journal of Biotechnology*, 5(8): 609-614.

Headon, D. y Walsh, G., 1994. The industrial production of enzymes. *Biotechnology Advances*, 12: 635-646.

Heck, J., Hertz, P. y Ayub, M., 2002. Cellulase and xylanase production by isolated amazon *Bacillus* strains using soybean industrial residue based solid-state cultivation. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33: 213-218.

Hon, D.N.S. y Shiraishi, N. (2001). Wood and Cellulosic Chemistry, second ed. Dekker, New York.

International Union of Biochemistry and Molecular Biology, 2017. *The Enzyme Database*. [en línea] Disponible en: <http://www.enzyme-database.org/class.php>

Juhász, T., Szengyel, Z., Réczey, K., Siika-Aho, M. y Viikari, L., 2005. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. *Process Biochemistry*, 40, pp. 3519-3525.

Kang, S., Park, Y., Lee, J., Hong, S y Kim, S., 2004. Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 91: 153-156.

Khan Academy, 2019. Carbohidratos: *Descripción general de los carbohidratos que abarca estructura y propiedades de monosacáridos, disacáridos y polisacáridos*. [en línea]. Disponible en: <https://es.khanacademy.org/science/biology/macromolecules/carbohydrates-and-sugars/a/carbohydrates>. [Consultado 08 septiembre 2019]

Kaur, S. y Verma, M., 2014. *Enzymes in value-addition of wastes*. [e-book] Nueva York, Nova Science Publishers, Inc.

Kumar, P., Barrett, D., Delwiche, M. y Stroeve, P., 2009. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Industrial and engineering chemistry research*, 48 (8): 3713–3729

Lago D. y Hernández M. 2000. Purificación y caracterización parcial de la enzima xilanasa a partir del preparado comercial Novoban 240 *Cultivos Tropicales*. 21 (2): 27-31.

Li, B.Z., Balan, V., Yuan Y. J., y Dale B. E. (2010). Process optimization to convert forage and sweet sorghum bagasse to ethanol based on ammonia fiber expansion (AFEX) pre-treatment. *Bioresource Technology* 101:1285–1292.

Liu, C., y Wyman, C. E. (2003). The effect of flow rate of compressed hot water on xylan, lignin and total mass removal from corn stover. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 42: 5409–5416.

López, A., Gabor, K., Martens, A., Renckens, B., Claassen, P., Van der Oost, J. y De Vos, W., 2004. Substrate-Induced production and secretion of cellulases by *Clostridium acetobutylicum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(9): 5238-5243.

Mandels, M. y Weber, J., 1969. The production of cellulases. In: G. Hajny y E. Reese, eds. 1969. *Cellulases and Their Applications*. American Chemical Society. Capítulo 23.

Miller, G, 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry*, 31: 426-428.

Novozymes, 2016. Novozymes. [en línea] Disponible en: <https://www.novozymes.com/> [Consultado 02 Septiembre 2017].

Ovando-Chacón S. y Waliszewski K. 2005. Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. *Universidad y Ciencia*. 21 (42): 111-120.

Pandey, A., Negi, S., y Soccol, C. R. (2016). *Current developments in biotechnology and bioengineering: production, isolation and purification of industrial products*. Elsevier.

Partida-Sedas. (2017). Producción de etanol a partir de jugo y bagazo de sorgo dulce (*Sorghum bicolor* L. Moench) mejorado genéticamente. Tesis de Doctorado. UNIDA-ITV, Veracruz, México.

Percival-Zhang, Y.H., Himmel, M.E. y Mielenz, J.R. (2006). Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. *Biotechnology Advances*. 24(5): 452-481.

Pernalet Z., Piña F., Suárez M., Ferrer A., Aiello C. (2008) Fractionation of sugarcane bagasse by ammonia treatment: Effect of bagasse moisture and ammonia charge. *Bioagro*. 20(1): 3-10.

Reyes, E., 2015. Aislamiento y selección de hongos o bacterias productores de celulasas y hemicelulasas a partir de residuos lignocelulósicos para la obtención de azúcares reductores. Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico de Orizaba.

Riaño A., Gutiérrez M. Muñoz H. y Barrero R. 2010. Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos. *Ciencia Química*. 5: 61-91.

Sadhu S. y Kanti T. 2013. Cellulase Production by Bacteria: A Review. *British Microbiology Research Journal*. 3 (3): 235-258

SAGARPA, 2013. Principales estados productores. Avances de siembra y cosecha. Disponible en: <http://www.infoaserca.gob.mx/claridades/revistas/234/ca234-22.pdf>

Saini, J. K., Saini, R., y Tewari, L. (2015). Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. *Biotechnology*. 5(4): 337-353.

Sánchez-Riaño, A.M., Gutiérrez-Morales, A.I., Muñoz-Hernández, J.A., y Rivera Barrero, C.A. (2010). *Production of bioethanol from lignocellulosic agroindustrial products*. [Online] <http://revistas.ut.edu.co/index.php/tumbaga/article/view/58>. [Consultado 16 Agosto 2019]

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, 2017. *Planeación Agrícola Nacional 207-2030*. [pdf]. Disponible en: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/256427/B\\_sicoCa\\_a\\_de\\_az\\_car.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/256427/B_sicoCa_a_de_az_car.pdf). [Consultado 08 septiembre 2019]

SEMARNAT, 2012. *Anuario estadístico de la producción forestal*. [pdf] Disponible en: [http://web2.semarnat.gob.mx/temas/gestionambiental/forestalsuelos/Anuarios/ANUARIO\\_2012](http://web2.semarnat.gob.mx/temas/gestionambiental/forestalsuelos/Anuarios/ANUARIO_2012).

SIAP, 2014. *Impactos de la caña de azúcar*. Disponible en <http://www.sagarpa.gob.mx/agricultura/Paginas/Agricultura.aspx>.

Sohail, M., Siddiqi, R., Ahmad, A. y Ahmed, S., 2009. Cellulase production from *Aspergillus niger* MS82: effect of temperature and pH. *New Biotechnology*, 25(6): 437-441.

Singhania, R., Sukumaran, R., Kumar, A., Larroche, C. y Pandey, A. 2010. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 142: 60-70.

Sukumaran, R., Singhania, R. y Pandey, A. 2005. Microbial cellulases – Production, applications and challenges. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 64: 832-844.

Subramaniyan, S., y Prema, P. (2002). Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. *Critical reviews in biotechnology*, 22(1): 33-64.

Sun, Y. y Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocelulosic materials for ethanol production a review. *Bioresourse Technology*. 83:1-11.

Sun, J.X., Sun, X.F., Zhao, H., Sun, R.C. (2004). Isolation and characterization of cellulose from sugarcane bagasse. *Polymer Degradation and Stability*. 84: 331-339.

Taherzadeh, M.J., y Karimi, K. (2008). Pretreatment of lignocelulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. *International Journal of Molecular Sciences*. 9:162-1651.



Tan, L. U., Yu, E. K., Louis-Seize, G. W., y Saddler, J. N. (1987). Inexpensive, rapid procedure for bulk purification of cellulase-free  $\beta$ -1, 4-D-xylanase of high specific activity. *Biotechnology and bioengineering*, 30(1): 96-100.

Teal, A.R. y Wymer P.E., 1994 *Enzymes and their role in biotechnology*. [e-book] Biochemical Society.

Tolan, J. y Foody, B. 1999. Cellulase from submerged fermentation. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 65: 41-67.

Torres, M. 2009. Obtención de enzimas hidrolíticas a partir de una cepa del hongo *Aspergillus ficuum* mediante fermentación en el medio sólido. Tesis de Licenciatura. Universidad Austral de Chile.

Tomás, M. (2010). Bioethanol from wheat straw: integration strategies stages of the process. "Doctoral Thesis. Complutense University of Madrid. School of Biological Sciences, Department of Microbiology III, 135.

Twomey, L. N., Pluske, J. R., Rowe, J. B., Choct, M., Brown, W., McConnell, M. F., y Pethick, D. W. (2003). The effects of increasing levels of soluble non-starch polysaccharides and inclusion of feed enzymes in dog diets on faecal quality and digestibility. *Animal Feed Science and Technology*, 108(1-4): 71-82.

Vásquez Vanegas, A. M. (2013). Producción de xilanasas por *aspergillus* sp: en fermentación sumergida y fermentación en medio sólido. Tesis de Maestría. Universidad Iberoamericana Ciudad de México.

Wyman, C.E. (1994), Ethanol from lignocellulosic biomass: technology economics, and opportunities. *Bioresource Technology*. 50: 3-15.

Wong, K. K., Tan, L. U. L., y Saddler, J. N. (1988). Multiplicity of beta-1, 4-xylanase in microorganisms: functions and applications. *Microbiological reviews*, 52(3): 305.

Wong, K. K., y Saddler, J. N. (1992). Trichoderma xylanases, their properties and application. *Critical reviews in Biotechnology*, 12(5-6): 413-435.