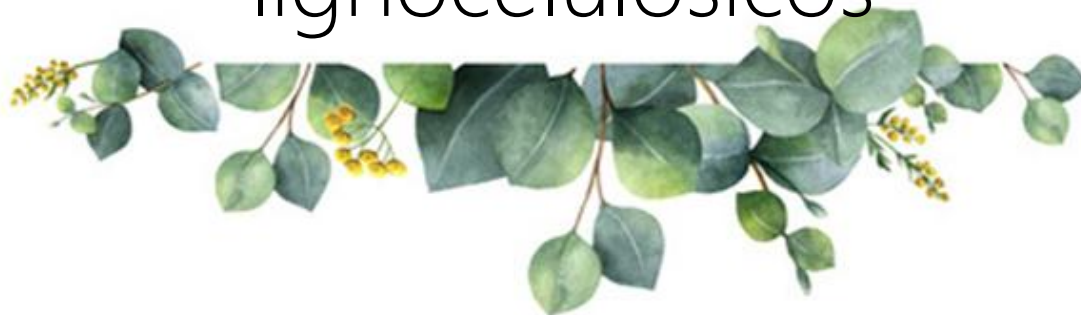




# Búsqueda de nuevos biocatalizadores para la valorización de residuos lignocelulósicos



Emiliana Botto

Programa de Maestría en Química  
Facultad de Química / PEDECIBA Química  
Universidad de la República

Montevideo, República Oriental del Uruguay  
2018



# Búsqueda de nuevos biocatalizadores para la valorización de residuos lignocelulósicos

EMILIANA BOTTO

Tesis presentada con el objetivo de obtener el título de Magíster en Química en el marco del Programa de Posgrado de Facultad de Química y PEDECIBA Química.

LABORATORIO DE BIOCATÁLISIS Y BIOTRANSFORMACIONES

Departamento de Química Orgánica / Departamento de Biociencias

ORIENTADORES:

Dra. Paula Rodríguez  
Directora de Tesis

Dra. Pilar Menéndez  
Directora Académica

TRIBUNAL

Dra. Karen Ovsejevi

Dra. María Inés Siri

Dra. Karina Medina

Montevideo, República Oriental del Uruguay

2018

A Matto con amor y gratitud por devolverme la curiosidad

## Agradecimientos – “The love you take is equal to the love you make”

En primer lugar quisiera agradecer a mis tutoras, a Paula por ser tan comprensiva en las diferencias y por guiarme en mis entretiros. A Pilar, por enseñarme mucho más que ciencia y acompañarme a caminar en la vida. A las dos por permitirme crecer e inventar y aceptarme.

A los compañeros del LBB, trabajar y compartir la vida con ustedes alegre hasta mis días más bajoneros. No podría esperar un grupo de humanos más lindo que ustedes.

Agradezco a quienes muy amablemente aceptaron formar parte del tribunal y brindaron su tiempo y su mirada objetiva y crítica muy importante para mí, Karina Medina, María Inés Siri y Karen Ovsejevi.

A los compañeros de los laboratorios por los cuales ando y/o anduve resonando en algún momento, Bioquímica, Química Orgánica, Microbiología, Farmacognosialo, siempre dispuestos a dar una mano con un reactivo, una técnica, un mate o unas palabras de aliento.

Deseo agradecer además a PEDECIBA, ANII, Comisión Académica de Posgrado, CSIC y UdelaR, sin su ayuda la investigación en Uruguay sería un camino más difícil de recorrer.

Agradecer a los afectos fuera de FQ, a los nonnos, porque sin su apoyo no podría haber salido adelante. A mi hermana y cuñado, al resto de la familia. Como decían los escarabajos de Liverpool, “I get by with a little help from my friends” sigo adelante y agradezco a mis amigas de facultad Lore y Betha, mis amigas de la vida Gabi, Vane y Nati, a la banda Karaoke: Galle, Paulie, Sylvia, Ale, Lu, siempre dando para adelante en todas. A Was y Aome, a Vittorio, al LBBjunior por las charlas, la cerveza artesanal y por crecer juntos en estos años. Agradecer a Matto por ser y estar, “in the vastness of space and the immensity of time, it is my joy to share a planet and an epoch with you”.

## Tabla de contenido

<b>1. Resumen</b>	<b>IV</b>
<b>2. Introducción y marco teórico</b>	<b>1</b>
<b>2.1. Situación forestal en Uruguay</b>	<b>1</b>
2.1.1. El género <i>Eucalyptus</i>	2
2.1.2. Residuos forestales	2
<b>2.2. Composición química del material lignocelulósico leñoso</b>	<b>2</b>
2.2.1. Lignina	4
2.2.2. Celulosa	6
2.2.3. Hemicelulosa	8
2.2.3.1. Xilano	11
<b>2.3. Biorrefinerías</b>	<b>12</b>
2.3.1. Productos comercializados a partir de material lignocelulósico	12
2.3.2. Concepto de biorrefinería	12
2.3.3. Principales productos a obtener a partir de azúcares	16
2.3.4. Procesos para la obtención de azúcares a partir de lignocelulósicos	18
2.3.4.1. Pretratamientos	19
2.3.4.1.1. Pretratamientos físicos	20
2.3.4.1.2. Pretratamientos termo-químicos	20
2.3.4.1.3. Pretratamientos biológicos	23
2.3.4.2. Despolimerización enzimática de celulosa y hemicelulosa	23
<b>2.4. Glicosil hidrolasas (GHs)</b>	<b>25</b>
2.4.1. Clasificación:	26
2.4.1.1. Según configuración anomérica del sustrato:	26
2.4.1.2. Según la localización de la unión a hidrolizar:	26
2.4.1.3. Según la retención o inversión anomérica:	28
2.4.1.3.1. Mecanismo de acción de GHs:	28
2.4.2. GHs que degradan celulosa – CELULASAS	29
2.4.2.1. Endoglucanasas	33
2.4.2.2. Exoglucanasas / Celobiohidrolasas	33
2.4.2.3. $\beta$ -Glucosidasas (BGL)	34
2.4.2.4. Otros mecanismos de degradación de la celulosa	34
2.4.2.5. Otras aplicaciones industriales de las celulasas	35
2.4.3. Sistema xilanolítico	36
2.4.3.1. Endoxilanasas (EC 3.2.1.8)	42
2.4.3.2. $\beta$ -xilosidasas (BXS)	43
2.4.3.3. Otras aplicaciones de las xilanasas	43
2.4.4. Producción de celulasas y xilanasas	44
2.4.5. Búsqueda de biocatalizadores	45
<b>2.5. Justificación de la investigación</b>	<b>47</b>
<b>3. Objetivos de la tesis</b>	<b>50</b>

3.1.	Objetivo general	50
3.2.	Objetivos específicos	50
<b>4.</b>	<b>Aislamiento de microorganismos a partir de hábitats naturales ricos en celulosa y hemicelulosa.</b>	<b>51</b>
4.1.	Metodología	51
4.1.1.	Aislamiento de microorganismos endófitos	53
4.1.2.	Aislamiento de microorganismos epífitos	54
4.1.3.	Conservación de cepas microbianas	54
4.2.	Resultados y discusión	55
4.3.	Conclusiones	60
<b>5.</b>	<b>Cribado cualitativo y cuantitativo de actividades xilanasa y celulasa</b>	<b>61</b>
5.1.	Metodología	61
5.1.1.	Cribado cualitativo de actividades celulasa y xilanasa	62
5.1.2.	Cribado cuantitativo de actividades celulasa y xilanasa	62
5.1.2.1.	Bacterias	62
5.1.2.2.	Levaduras	62
5.1.2.3.	Hongos filamentosos	63
5.1.3.	Medida de actividad xilanasa	63
5.1.4.	Medida de actividad celulasa (FPasa)	64
5.2.	Resultados y discusión	65
5.2.1.	Cribados cualitativo y cuantitativo de actividad celulasa y xilanasa en las bacterias seleccionadas	66
5.2.1.1.	CELULASA	69
5.2.1.2.	XILANASA	70
5.2.2.	Cribados cualitativo y cuantitativo de actividad celulasa y xilanasa en las levaduras seleccionadas	71
5.2.2.1.	CELULASA	72
5.2.2.2.	XILANASA	73
5.2.3.	Cribados cualitativo y cuantitativo de actividad celulasa y xilanasa en los hongos filamentosos seleccionados	74
5.2.3.1.	CELULASA	76
5.2.3.2.	XILANASA	78
5.3.	Conclusiones	79
<b>6.</b>	<b>Identificación de los microorganismos seleccionados</b>	<b>80</b>
6.1.	Metodología	80
6.1.1.	Bacterias	80
6.1.1.1.	Análisis microscópico: Tinción de Gram	80
6.1.1.2.	Identificación taxonómica:	80
6.1.2.	Levaduras	82
6.1.2.1.	Análisis microscópico: Tinción con cristal violeta.	82

6.1.2.2.	Identificación taxonómica:	_____	82
6.1.3.	Hongos filamentosos	_____	84
6.1.3.1.	Análisis microscópico:	_____	84
6.1.3.2.	Identificación taxonómica:	_____	84
<b>6.2.</b>	<b>Resultados y discusión</b>	_____	<b>84</b>
<b>6.3.</b>	<b>Conclusiones</b>	_____	<b>92</b>
<b>7.</b>	<b>Producción de celulasas</b>	_____	<b>93</b>
<b>7.1.</b>	<b>Metodología</b>	_____	<b>93</b>
7.1.1.	Efecto del tiempo de crecimiento y medio de cultivo en la producción de celulasa	_____	94
7.1.1.1.	Medida de actividad celulasa	_____	94
<b>7.2.</b>	<b>Resultados y discusión</b>	_____	<b>94</b>
7.2.1.	Efecto del tiempo de crecimiento y medio de cultivo en la producción de celulasa	_____	94
<b>7.3.</b>	<b>Conclusiones</b>	_____	<b>97</b>
<b>8.</b>	<b>Producción de xilanasas y caracterización de los sistemas enzimáticos</b>	_____	<b>98</b>
<b>8.1.</b>	<b>Metodología</b>	_____	<b>98</b>
8.1.1.	Efecto del tiempo y diferentes medios de cultivo en la producción de xilanasas	_____	98
8.1.1.1.	Bacterias	_____	99
8.1.1.2.	Levaduras	_____	99
8.1.1.3.	Hongo filamentosos	_____	100
8.1.2.	Obtención del crudo enzimático a partir de los medios de cultivo seleccionados	_____	100
	Medida de actividad xilanasas MODIFICADA - Procedimiento modificado de Bailey	_____	101
8.1.2.1.	Cuantificación de proteínas	_____	101
8.1.3.	Estudio de la biotransformación de xilano de haya mediante las xilanasas obtenidas	_____	101
8.1.3.1.	Caracterización analítica de los productos obtenidos	_____	102
8.1.4.	Caracterización respecto a la Temperatura y pH	_____	102
8.1.5.	Estabilidad térmica y peso molecular de xilanasas de <i>Pseudozyma</i> sp. EBV 97-87	_____	103
8.1.6.	Producción de xilanasas de <i>Pseudozyma</i> sp. EBV 97-87 en medio de cultivo con diferentes residuos		103
<b>8.2.</b>	<b>Resultados y discusión</b>	_____	<b>104</b>
8.2.1.	Efecto del tiempo de crecimiento y diferentes medios de cultivo en la producción de xilanasas.		104
8.2.2.	Obtención del crudo enzimático a partir de los medios de cultivo seleccionados	_____	110
8.2.3.	Estudio de la biotransformación de xilano mediante las enzimas precipitadas.	_____	111
8.2.4.	Caracterización de las xilanasas según pH y temperatura	_____	114
8.2.5.	Estabilidad térmica y peso molecular de xilanasas de <i>Pseudozyma</i> sp. EBV 97-87	_____	117
8.2.6.	Producción de xilanasas de <i>Pseudozyma</i> sp. EBV 97-87 en medio de cultivo con diferentes residuos		119
<b>8.3.</b>	<b>Conclusiones</b>	_____	<b>121</b>
<b>9.</b>	<b>Estudio de la posible aplicación de las enzimas obtenidas</b>	_____	<b>122</b>

<b>9.1. Metodología</b>	<b>122</b>
9.1.1. Deslignificación química de la corteza para la hidrólisis enzimática	123
9.1.2. Estudio de la biotransformación de corteza deslignificada mediante las xilanasas	123
9.1.2.1. Análisis de corteza resultante	124
9.1.2.1.1. Estudio de microscopía	124
9.1.2.1.2. Análisis de la composición química	124
9.1.3. Producción de xilitol	124
9.1.3.1. Estudio de distintas variables en la producción de xilosa por <i>Pseudozyma</i> sp. EBV	97-87: 124
9.1.3.1.1. Caracterización analítica de los productos de hidrólisis obtenidos	125
9.1.3.2. Cribado de microorganismos para la producción de xilitol	125
9.1.3.3. Producción de xilitol con <i>Wickerhamomyces anomalus</i> Z1	126
9.1.4. Producción de etanol	127
9.1.4.1. Sacarificación y fermentación a partir de corteza deslignificada hidrolizada xilanasas	127
<b>9.2. Resultados y discusión</b>	<b>128</b>
9.2.1. Deslignificación química de la corteza de <i>Eucalyptus dunnii</i>	128
9.2.2. Hidrólisis de la corteza pre-tratada utilizando xilanasas obtenidas de los microorganismos seleccionados.	129
9.2.2.1. Análisis de la corteza resultante	135
9.2.3. Producción de xilitol	137
9.2.3.1. Estudio de distintas variables en la producción de xilosa por <i>Pseudozyma</i> sp. EBV	97-87: 137
9.2.4. Cribado de microorganismos para la producción de xilitol	138
9.2.4.1. Producción de xilitol a partir del hidrolizado de corteza	141
9.2.5. Producción de etanol	144
9.2.5.1. Sacarificación con celulasas comerciales de la corteza deslignificada resultante de la hidrólisis por xilanasas y fermentación con <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	144
<b>9.3. Conclusiones</b>	<b>148</b>
<b>10. Conclusiones finales y perspectivas</b>	<b>150</b>
<b>11. Referencias</b>	<b>153</b>
<b>12. Anexos</b>	<b>172</b>
<b>12.1. Composición de medios de cultivo</b>	<b>172</b>
<b>12.2. Soluciones y buffers</b>	<b>174</b>
<b>12.3. Curvas de calibración</b>	<b>176</b>
12.3.1. Curvas de calibración con el método DNS	176
12.3.2. Curvas de calibración por HPLC: columna Supelcogel™ C610H	177
12.3.3. Curvas de calibración por HPLC: columna Supelcogel™ Pb	180
12.3.4. Curva de pesos moleculares de proteínas por Gel filtración - columna Superdex™ 75	10/300 GL 181
<b>12.4. Preparación de material lignocelulósico y análisis de composición química</b>	<b>182</b>



12.4.1.	Preparación de corteza libre de extractivos _____	182
12.4.2.	Análisis de la composición química del material lignocelulósico _____	182
12.4.2.1.	Procedimiento de hidrólisis _____	182
12.4.2.2.	Análisis de lignina soluble e insoluble en ácido: _____	183
12.4.2.3.	Análisis de carbohidratos estructurales. _____	183
12.4.2.4.	Cálculo de humedad, glucanos, xilanos y lignina soluble e insoluble _____	184
<b>12.5.</b>	<b>Hoja del depósito de cepa <i>Pseudozyma</i> sp. EBV 97-87 _____</b>	<b>186</b>
<b>12.6.</b>	<b>Medida de proteína - Protocolo de reactivo de Bradford (Sigma-Aldrich) _____</b>	<b>187</b>
<b>12.7.</b>	<b>Conteo de células en cámara de Neubauer _____</b>	<b>193</b>
<b>12.8.</b>	<b>Cromatogramas _____</b>	<b>194</b>
12.8.1.	Hidrólisis de corteza deslignificada _____	194
12.8.2.	Fermentación con <i>W. anomalus</i> _____	196

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1- PRODUCCIÓN DE PLANTAS SEGÚN GÉNERO POR LOS AÑOS RELEVADOS (BOSCANO Y BORAGNO, 2017). .....	1
FIGURA 2- EXTRACCIÓN DE MADERA EN ROLLO 2000 – 2016 EN MILES DE M <sup>3</sup> (BOSCANO Y BORAGNO, 2017).....	1
FIGURA 3- DIFERENTES CAPAS DE LA PARED CELULAR VEGETAL. ML: LAMINILLA MEDIA; P: PARED PRIMARIA; S1,2,3: PARED SECUNDARIA Y LAS RESPECTIVAS CAPAS; W: CAPA VERRUGOSA. LA FLECHA INDICA LA DIRECCIÓN DE LAS MICROFIBRILLAS DE CELULOSA EN LA PARED SECUNDARIA (GELLERSTEDT, EK Y HENRIKSSON, 2009) .....	3
FIGURA 4- MONÓMEROS DE LIGNINA. PROPIL FENOLES (GELLERSTEDT, EK AND HENRIKSSON, 2009) .....	4
FIGURA 5- ESTRUCTURA SUGERIDA DE LIGNINA DE MADERAS DURAS.....	5
FIGURA 6- ASOCIACIÓN DE LA LIGNINA CON LOS DIFERENTES POLISACÁRIDOS DENTRO DE LA PARED CELULAR VEGETAL (GELLERSTEDT, EK AND HENRIKSSON, 2009) .....	6
FIGURA 7- ENLACES DE HIDRÓGENO INTRA E INTER – MOLECULARES EN LA CELULOSA (PINKERT ET AL., 2009).....	7
FIGURA 8- CADENAS DE CELULOSA, APILADAS EN LA PARTE SUPERIOR E INFERIOR. LA ESTRUCTURA IZQUIERDA ES CELULOSA I $\alpha$ Y LA DERECHA ES CELULOSA I $\beta$ (GELLERSTEDT, EK Y HENRIKSSON, 2009). .....	7
FIGURA 9- REPRESENTACIÓN DE LA ESTRUCTURA DEL XILANO DE EUCALYPTUS (VEGA, 2017).....	11
FIGURA 10- PIRÁMIDE DE VALOR DE DIFERENTES APLICACIONES DE LA BIOMASA (INTERNATIONAL ENERGY AGENCY, 2009). 14	14
FIGURA 11- INVESTIGACIÓN EN COMBUSTIBLES Y SUSTANCIAS QUÍMICAS A PARTIR DE BIOMASA.....	15
FIGURA 12- PASOS INVOLUCRADOS EN EL PROCESAMIENTO DE LA BIOMASA LIGNOCELULÓSICA.....	18
FIGURA 13- LA DISTRIBUCIÓN DISPERSA Y LOCALIZADA DE ORGANISMOS CAPACES DE DEGRADAR LIGNOCELULOSA O CELULOSA EN EL ÁRBOL DE LA VIDA (CRAGG ET AL., 2015). .....	24
FIGURA 14- (A-D) MUESTRA LAS TOPOLOGÍAS DE LA SUPERFICIE DEL SITIO ACTIVO DE T. FUSCA CEL9A, C. CELLULOLYTICUM CEL9M, C. THERMOCELLUM CEL9A Y C. THERMOCELLUM GH9_CbHA, TODAS CELULASAS PERTENECIENTES A LA FAMILIA GH9. LAS TRES PRIMERAS SON ENZIMAS ENDOACTIVAS, LA ÚLTIMA ES ÚNICAMENTE EXOACTIVA (SCHUBOT ET AL., 2004). .....	27
FIGURA 15- MECANISMO DE ACCIÓN DE GH CON RETENCIÓN ANOMÉRICA (COLLINS, GERDAY Y FELLER, 2005).....	28
FIGURA 16- MECANISMO DE ACCIÓN DE GH CON INVERSIÓN ANOMÉRICA (COLLINS, GERDAY Y FELLER, 2005). .....	29
FIGURA 17- ESQUEMA DE MECANISMOS MICROBIANOS DE DEGRADACIÓN DE CELULOSA. SISTEMA DE CELULASA LIBRE DE MICROORGANISMOS AEROBIOS. LA CELULOSA SE HIDROLIZA A TRAVÉS DE LA INTERACCIÓN SINÉRGICA DE ENZIMAS SECRETADAS INDIVIDUALES. NR-, EXTREMOS NO REDUCTORES; -R, EXTREMOS NO REDUCTORES (CRAGG ET AL., 2015). .....	31
FIGURA 18- ESQUEMA DE MECANISMOS MICROBIANOS DE DEGRADACIÓN DE CELULOSA. MECANISMO ANAERÓBICO 'CELULOSOMA' ES UN COMPLEJO UNIDO A LA PARED CELULAR MICROBIANA A TRAVÉS DE UNA SUBUNIDAD DE ANCLAJE. EL COMPLEJO CONSISTE EN ENZIMAS CAPACES DE HIDROLIZAR LA CELULOSA, UNIDAS A UNA SUBUNIDAD DE ANDAMIO QUE ANCLA LA CÉLULA BACTERIANA Y LAS ENZIMAS AL SUSTRATO A TRAVÉS DE UN MÓDULO DE UNIÓN DE CARBOHIDRATOS (CBM) (CRAGG ET AL., 2015).....	32
FIGURA 19- RUPTURA DEL MATERIAL LIGNOCELULÓSICO POR HONGOS DE PUDRICIÓN MARRÓN USANDO EL SISTEMA FENTON MEDIADO POR QUELANTE (CRAGG ET AL., 2015). .....	35
FIGURA 20- MODELO PROPUESTO DE DESPOLIMERIZACIÓN DE GLUCURONOXILANO (BIELY, SINGH Y PUCHART, 2016). .....	38
FIGURA 21- MODELO PROPUESTO PARA LA DESPOLIMERIZACIÓN DE ACETIL GLUCURONOXILANO (BIELY, SINGH Y PUCHART, 2016). .....	40
FIGURA 22- DISTRIBUCIÓN DE DIFERENCIAS DE TEMPERATURA TERRESTRE ENTRE PROMEDIOS 2013-2017 (T FINAL) Y PROMEDIOS DE REFERENCIA 1951-1980 (T INICIAL), SEGÚN UN ANÁLISIS DEL INSTITUTO GODDARD DE ESTUDIOS ESPACIALES DE LA NASA. LOS ROJOS MUESTRAN REGIONES DE MAYOR CALENTAMIENTO EN EL POLO NORTE (NASA / GSFC / SCIENTIFIC VISUALIZATION STUDIO).....	48
FIGURA 23 - ESQUEMA DE AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS A PARTIR DE DIFERENTES TEJOS DE E. DUNNII.....	52
FIGURA 24- AISLAMIENTOS. IZQ: ÁRBOL DE EUCALYPTUS GLOBULUS DEL CUAL SE REALIZARON LOS AISLAMIENTOS. DER: AISLAMIENTOS EN MATRACES. ....	59

FIGURA 25- DETALLE DE LOS AISLAMIENTOS OBTENIDOS DE CADA ÓRGANO VEGETAL. ....	60
FIGURA 26 - ESQUEMA DE LOS CRIBADOS REALIZADOS.....	61
FIGURA 27- PLACAS EN LAS QUE SE OBSERVA HALO DE DEGRADACIÓN DE LOS POLÍMEROS EN ESTUDIO MEDIANTE TINCIÓN CON COLORANTE ROJO CONGO INDICANDO ACTIVIDAD HIDROLÍTICA. EJEMPLOS DE ACTIVIDAD XILANASA Y CELULASA EN BACTERIAS A LA IZQUIERDA Y HONGOS A LA DERECHA EN CADA CASO. ....	66
FIGURA 28- ACTIVIDAD CELULASA MEDIDA EN LAS BACTERIAS SELECCIONADAS EN LOS MEDIOS DE CULTIVO TSB CMC (MEDIO NUTRIENTE MÁS CARBOXIMETILCELULOSA) Y M9 CMC (MEDIO MÍNIMO MÁS CARBOXIMETILCELULOSA).....	69
FIGURA 29- ACTIVIDAD XILANASA MEDIDA EN LAS BACTERIAS SELECCIONADAS, EN LOS MEDIOS DE CULTIVO TSB XIL (MEDIO NUTRIENTE MÁS XILANO) Y M9 XIL (MEDIO MÍNIMO MÁS XILANO). ....	70
FIGURA 30- ACTIVIDAD CELULASA DE LA LEVADURA SELECCIONADA (EBV 96-86 ) EN LOS MEDIOS DE CULTIVO PDB CMC (MEDIO NUTRIENTE MÁS CARBOXIMETILCELULOSA) Y YNB CMC ( MEDIO MÍNIMO MÁS CARBOXIMETILCELULOSA). ...	73
FIGURA 31 - ACTIVIDAD XILANASA MEDIDA EN LAS LEVADURAS SELECCIONADAS, EN LOS MEDIOS DE CULTIVO PDB XIL (MEDIO NUTRIENTE MÁS XILANO) E YNB XIL (MEDIO MÍNIMO MÁS XILANO). ....	74
FIGURA 32 - ACTIVIDAD CELULASA EN LOS HONGOS FILAMENTOSOS SELECCIONADOS EN LOS MEDIOS DE CULTIVO PDB CMC (MEDIO RICO MÁS CARBOXIMETILCELULOSA) Y YNB CMC (MEDIO MÍNIMO MÁS CARBOXIMETILCELULOSA). ....	77
FIGURA 33 - ACTIVIDAD XILANASA MEDIDA EN LOS HONGOS FILAMENTOSOS SELECCIONADOS. EN PDB XIL (MEDIO RICO MÁS XILANO) Y YNB XIL (MEDIO MÍNIMO MÁS XILANO). ....	78
FIGURA 34 - PROGRAMA DE PCR UTILIZADO PARA LA AMPLIFICACIÓN DEL GEN DEL ARN RIBOSOMAL 16S DE LAS CEPAS BACTERIANAS .....	81
FIGURA 35- LEVADURA EBV 96-86. ARRIBA A LA IZQUIERDA Y MEDIO: OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA DE LAS COLONIAS, ARRIBA A LA DERECHA Y ABAJO: OBSERVACIÓN AL MICROSCOPIO (AUMENTO 100X) DE SUSPENSIÓN DE UNA COLONIA TEÑIDA CON AZUL DE METILENO. ....	86
FIGURA 36 - HONGO FILAMENTOSO, EBV 96-24. ARRIBA: OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA DEL MICELIO (IZQ: DERECHO DE LA PLACA, DER: REVERSO DE LA PLACA). ABAJO: OBSERVACIÓN AL MICROSCOPIO DEL MICELIO IZQ: AUMENTO 10X DER: AUMENTO 40X.....	87
FIGURA 37 – IZQUIERDA: COLONIA EN PLACA DE PDA LUEGO DE 15 DÍAS. OBSERVACIÓN DE LOS CONIDIOS ARRIBA A LA DERECHA Y DEL PSEUDOPARÉNQUIMA ABAJO A LA DERECHA DEL HONGO PREUSSIA SP.....	88
FIGURA 38 - BACTERIA DEL GÉNERO BACILLUS SP. EBV 12-22. IZQUIERDA: OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA DE LAS COLONIAS EN TSA CON UN CRECIMIENTO DE 24 HORAS A 28°C, DERECHA: TINCIÓN DE GRAM DEL CULTIVO REPRESENTADO EN LA FOTO DERECHA. ....	89
FIGURA 39 - LEVADURA DEL GÉNERO PSEUDOZYMA SP. EBV 97-87. ARRIBA: OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA DE LAS COLONIAS EN PDA. ABAJO: OBSERVACIÓN AL MICROSCOPIO (AUMENTO 100X) DE SUSPENSIÓN DE UNA COLONIA TEÑIDA CON AZUL DE METILENO. ....	90
FIGURA 40 - HONGO FILAMENTOSO DEL GÉNERO PENICILLUM SP. EBV 95-17. ARRIBA: OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA DEL MICELIO EN PDA (IZQ: DERECHO DE LA PLACA, DER: REVERSO DE LA PLACA). ABAJO: OBSERVACIÓN AL MICROSCOPIO (AUMENTO 40X) DEL MICELIO IZQ: SIN TEÑIR. DER: TEÑIDA CON AZUL DE METILENO.....	91
FIGURA 41 - ESQUEMA DE PRODUCCIÓN DE CELULASA.....	93
FIGURA 42 - ACTIVIDAD CELULASA DE LA LEVADURA AUREOBASIDIUM SP. EBV 96-86 A DIFERENTES TIEMPOS. LAS REFERENCIAS CORRESPONDEN A LOS PRE-CULTIVOS QUE FUERON CRECIDOS EN LOS MEDIOS: CDM CMC: CZAPEK-DOX MODIFICADO + 0.5 % CMC, CDM GLUC: CZAPEK-DOX MODIFICADO + GLUCOSA, PDB: POTATO DEXTROSE BROTH.95	95
FIGURA 43 - ACTIVIDAD CELULASA DE LOS HONGOS PREUSSIA SP. EBV 96-24 Y TRICHODERMA SP. Y5 A DIFERENTES TIEMPOS. ....	96
FIGURA 44 - ESQUEMA DE TRABAJO DE PRODUCCIÓN DE XILANASA Y SU ESTUDIO.....	98
FIGURA 45 - ACTIVIDAD XILANASA EN LA BACTERIA SELECCIONADA BACILLUS SP. EBV 12-22. M9 X: M9 + XILANO 1%, M9 CORDES: M9 + CORTEZA DE E. DUNNII DESLIGNIFICADA, TSB X: TRYPTIC SOY BROTH + XILANO 1%, TSB: TRYPTIC SOY BROTH.....	105

FIGURA 46 - RECUENTO DE CÉLULAS TOTALES DE LA BACTERIA SELECCIONADA BACILLUS SP. EBV 12-22. M9 X: M9 + XILANO 1%, M9 CORDES: M9 + CORTEZA DE E. DUNNII DESLIGNIFICADA, TSB X: TRYPTIC SOY BROTH + XILANO 1%, TSB: TRYPTIC SOY BROTH. ....	105
FIGURA 47 - ACTIVIDAD XILANASA EN LA LEVADURA SELECCIONADA PSEUDOZYMA SP. EBV 97-87. PDBX: POTATO DEXTROSE BROTH + XILANO 1%, YNBX: YEAST NITROGEN BASE + XILANO 1%, CDMCORDES: CZAPEK-DOX MODIFICADO + CORTEZA DE E. DUNNII DESLIGNIFICADA. CDMX: CZAPEK-DOX MODIFICADO + XILANO 1%, PDB: POTATO DEXTROSE BROTH. ....	107
FIGURA 48 - RECUENTO DE CÉLULAS VIABLES DE LA LEVADURA SELECCIONADA PSEUDOZYMA SP. EBV 97-87. ESCALA LOGARÍTMICA. PDBX: POTATO DEXTROSE BROTH + XILANO 1%, YNBX: YEAST NITROGEN BASE + XILANO 1%, CDMCORDES: CZAPEK-DOX MODIFICADO + CORTEZA DE E. DUNNII DESLIGNIFICADA, CDMX: CZAPEK-DOX MODIFICADO + XILANO 1%, PDB: POTATO DEXTROSE BROTH. ....	107
FIGURA 49 - ACTIVIDAD XILANASA EN EL HONGO SELECCIONADO PENICILLIUM SP. EBV 95-17 . PDB: POTATO DEXTROSE BROTH; PDBX: POTATO DEXTROSE BROTH + XILANO 1%, CDX: CZAPEK-DOX + XILANO 1%, CD CLE: CZAPEK-DOX + CORTEZA DE E. DUNNII LIBRE DE EXTRACTIVOS 1%. ....	109
FIGURA 50- PRODUCTOS DE HIDRÓLISIS DEL XILANO COMERCIAL CON LOS DISTINTOS MICROORGANISMOS. EBV 12-22: BACILLUS SP., EBV 97-87: PSEUDOZYMA SP. Y EBV 95-17: PENICILLIUM SP. BE 12-22: SOBRENADANTE DE ENZIMA DE BACILLUS SP. BE 97-87: SOBRENADANTE DE ENZIMA DE PSEUDOZYMA SP. BE 95-17: SOBRENADANTE DE ENZIMA DE PENICILLIUM SP. BX: BLANCO XILANO SIN ENZIMA, X1, X2, X3, X4, X5 Y X6: ESTÁNDARES DE OLIGOXILANOS (ARRIBA SE MUESTRAN LOS RF DE LOS MISMOS). ....	111
FIGURA 51 - COMPARACIÓN DE CROMATOGRAMAS DE HIDRÓLISIS DE XILANO COMERCIAL) GRIS: XILANO SIN HIDROLIZAR, VERDE: HIDRÓLISIS CON ENZIMAS DE PENICILLIUM SP. EBV 95-17, NEGRO: HIDRÓLISIS CON ENZIMAS DE PSEUDOZYMA SP. EBV 97-87, VIOLETA: HIDRÓLISIS CON ENZIMAS DE BACILLUS SP. EBV 12-22. ....	112
FIGURA 52 - DETERMINACIÓN DEL RANGO DE PH ÓPTIMO EN XILANASAS DE BACILLUS SP. EBV 12-22 .....	115
FIGURA 53 - DETERMINACIÓN DEL RANGO DE TEMPERATURA ÓPTIMO EN XILANASAS DE BACILLUS SP EBV 12-22 .....	115
FIGURA 54 - DETERMINACIÓN DEL RANGO DE PH ÓPTIMO EN XILANASAS DE PSEUDOZYMA SP. EBV97-87.....	116
FIGURA 55 - DETERMINACIÓN DEL RANGO DE TEMPERATURA ÓPTIMO EN XILANASAS DE PSEUDOZYMA SP. EBV97-87. ....	116
FIGURA 56 - PORCENTAJE DE ACTIVIDAD REMANENTE DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO PARCIALMENTE PURIFICADO OBTENIDO DEL CULTIVO DE PSEUDOZYMA SP. EBV 97-87 Y CONSERVADO A 4, 30 Y 50 °C. ....	117
FIGURA 57 - PERFIL DE ELUCIÓN DE PICOS DE PROTEÍNAS SEPARADAS POR GEL FILTRACIÓN DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO DE DE PSEUDOZYMA SP. EBV 97-87. ....	118
FIGURA 58 – TLC DE HIDRÓLISIS DE XILANO DE HAYA CON XILANASA PURIFICADA DE EBV 97-87, EN LOS EXTREMOS DOS FRACCIONES CORRESPONDIENTES A LA FRACCIÓN ELUÍDA CON ACTIVIDAD XILANASA DE PSEUDOZYMA SP. EBV 97-87, EN EL CENTRO EL ESTÁNDAR DE XILOSA. ....	119
FIGURA 59 - ACTIVIDAD XILANASA EN EL MEDIO CDM CON DIFERENTES RESIDUOS COMO FUENTE DE CARBONO: SALVADO DE AVENA (SA), PAJA DE ARROZ (PA), YERBA MATE USADA (YMU), CÁSCARA DE NARANJA SECA (CNS), MAZORCA DE MAÍZ (MM), CEBADA USADA (CU).....	120
FIGURA 60 - ESQUEMA SEGUIDO PARA EL ESTUDIO DE LA HIDRÓLISIS DEL XILANO DE LA CORTEZA DE E. DUNNII Y LA POSIBLE APLICACIÓN DE LOS PRODUCTOS.....	122
FIGURA 61 - TLC DEL SOBRENADANTE DE LA HIDRÓLISIS DE LA CORTEZA DESLIGNIFICADA CON EL CRUDO ENZIMÁTICO PARCIALMENTE PURIFICADO DE BACILLUS SP. EBV 12-22 A LAS 72 HORAS DE REACCIÓN. ....	130
FIGURA 62 - CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES DE LOS SOBRENADANTES DE LA HIDRÓLISIS DE LA CORTEZA CON LAS ENZIMAS DE BACILLUS SP. EBV 12-22 A LAS 72 HORAS DE REACCIÓN. ....	131
FIGURA 63 - TLC DE LOS PRODUCTOS DE HIDRÓLISIS DE LA CORTEZA DESLIGNIFICADA CON ENZIMAS DE PSEUDOZYMA SP. EBV98-87 A DISTINTOS TIEMPOS. ....	132
FIGURA 64 - CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES DE LOS SOBRENADANTES DE LA HIDRÓLISIS DE LA CORTEZA CON LAS ENZIMAS DE PSEUDOZYMA SP. EBV 97-87.....	133

FIGURA 65 - PRIMER HIDRÓLISIS DE CORTEZA DESLIGNIFICADA CON XILANASA DE PSEUDOZYMA SP. EBV 97-87.....	134
FIGURA 66 - HIDRÓLISIS DE LA CORTEZA DE E. DUNNII DESLIGNIFICADA CON ENZIMAS DE PSEUDOZYMA SP. EBV 97-87 A 30 °C.....	134
FIGURA 67 - MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO DE LAS CORTEZAS DESLIGNIFICADAS. FILA 1 – SIN TRATAR CON ENZIMAS. FILA 2 – TRATADA CON XILANASA DE PSEUDOZYMA SP. EBV 97-87. FILA 3 – TRATADA CON XILANASA DE BACILLUS SP. EBV 12-22. SE MUESTRAN LOS MISMOS AUMENTOS PARA TODOS LOS CASOS PARA PODER COMPARAR LOS CAMBIOS EN LA SUPERFICIE. AUMENTOS DE IZQUIERDA A DERECHA, x370, x1400 Y x9500. ....	135
FIGURA 68 - PRODUCCIÓN DE XILITOL MEDIANTE LA FERMENTACIÓN DE D-XILOSA EN LEVADURAS DE LA COLECCIÓN DEL LBB. ....	139
FIGURA 69 - PRODUCCIÓN DE XILITOL MEDIANTE LA FERMENTACIÓN DE D-XILOSA EN BACTERIAS DE LA COLECCIÓN DEL LBB. ....	140
FIGURA 70 - PRODUCCIÓN DE XILITOL MEDIANTE LA FERMENTACIÓN DE D-XILOSA EN HONGOS FILAMENTOSOS DE LA COLECCIÓN DEL LBB. ....	140
FIGURA 71 - CANTIDAD INICIAL DE GLUCOSA EN LAS MUESTRAS TRATADAS CON XILANASA BACTERIANA (F1222), DE LEVADURA (F9787) Y BLANCO (FB). ....	145
FIGURA 72 - PERFIL DE CONSUMO DE CELOBIOSA EN LA PRODUCCIÓN DE ETANOL B2G. CORTEZA TRATADA CON XILANASA BACTERIANA (F1222) Y BLANCO. ....	146
FIGURA 73 - CONCENTRACIÓN DE XILOSA EN LA PRODUCCIÓN DE ETANOL B2G. CORTEZA TRATADA CON XILANASA BACTERIANA (F1222), DE LEVADURA (F9787) Y BLANCO (FB). ....	146
FIGURA 74 - PRODUCCIÓN DE ETANOL B2G, MUESTRAS PRETATADAS CON XILANASA BACTERIANA (F1222), DE LEVADURA (F9787) Y BLANCO (FB). ....	147
FIGURA 75- CURVA DE CALIBRACIÓN DE XILOSA.....	176
FIGURA 76- CURVA DE CALIBRACIÓN DE GLUCOSA .....	177
FIGURA 77- CURVA DE CALIBRACIÓN DE XILOSA COLUMNA SUPELCOGELTM C610H.....	177
FIGURA 78- CURVA DE CALIBRACIÓN DE XILOBIOSA COLUMNA SUPELCOGELTM C610H .....	178
FIGURA 79- CURVA DE CALIBRACIÓN DE XILOTRIOSIA COLUMNA SUPELCOGELTM C610H.....	178
FIGURA 80- CURVA DE CALIBRACIÓN DE XILITOL COLUMNA SUPELCOGELTM C610H .....	178
FIGURA 81- CURVA DE CALIBRACIÓN DE GLUCOSA COLUMNA SUPELCOGELTM C610H .....	179
FIGURA 82- CURVA DE CALIBRACIÓN DE CELOBIOSA COLUMNA SUPELCOGELTM C610H .....	179
FIGURA 83- CURVA DE CALIBRACIÓN DE ETANOL COLUMNA SUPELCOGELTM C610H.....	179
FIGURA 84- CURVA DE CALIBRACIÓN DE GLUCOSA COLUMNA SUPELCOGELTM Pb .....	180
FIGURA 85- CURVA DE CALIBRACIÓN DE XILOSA COLUMNA SUPELCOGELTM Pb.....	180
FIGURA 86- CURVA DE CALIBRACIÓN DE INOSITOL COLUMNA SUPELCOGELTM Pb.....	180
FIGURA 87- CROMATOGRAMA.....	181
FIGURA 88- CURVA DE CALIBRACIÓN .....	181
FIGURA 89- MODELO MATEMÁTICO .....	181
FIGURA 90- IZQ. CONTEO DE UN CUADRO GRANDE DE CÁMARA DE NEUBAUER. DER. REPRESENTACIÓN DE LA CÁMARA.....	193

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1 - PRINCIPALES TIPOS DE HEMICELULOSAS EN MADERAS DURAS Y BLANDAS (GÍRIO ET AL., 2010). .....	9
TABLA 2- CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE OPORTUNIDADES PARA EL DESARROLLO DE TECNOLOGÍAS Y PRODUCTOS DE INTERÉS EN BIORREFINERÍAS A PARTIR DE CARBOHIDRATOS. ADAPTADO DE (BOZELL & PETERSEN, 2010). .....	15
TABLA 3- VÍAS ACTUALMENTE UTILIZADAS O POTENCIALES PARA OBTENER LOS DOCE PRODUCTOS DE MAYOR INTERÉS SEGÚN LA DOE. F = FERMENTACIÓN, Q = QUÍMICA, B = BIOTRANSFORMACIÓN. EL SUBÍNDICE c = COMERCIALIZADO (EN 2004). .....	16
TABLA 4- AISLAMIENTOS. CÓDIGO: DADO AL AISLAMIENTO PARA SU IDENTIFICACIÓN, TIPO DE AISLAMIENTO: EPÍFITO O ENDÓFITO, ORIGEN: RAMAS, CORTEZA U HOJAS, ENRIQUECIMIENTO: SI PROVINO DEL AISLAMIENTO INICIAL O ALGÚN SUBCULTIVO.....	56
TABLA 5-BACTERIAS SELECCIONADAS DEL CRIBADO CUALITATIVO EN PLACA DE ACTIVIDADES XILANASA Y CELULASA. X =XILANASA / C=CELULASA .....	67
TABLA 6- LEVADURAS SELECCIONADAS DEL CRIBADO CUALITATIVO EN PLACA DE ACTIVIDADES XILANASA Y CELULASA. X =XILANASA / C=CELULASA .....	72
TABLA 7- HONGOS FILAMENTOSOS SELECCIONADOS DEL CRIBADO CUALITATIVO EN PLACA DE ACTIVIDADES XILANASA Y CELULASA. X =XILANASA / C=CELULASA.....	75
TABLA 8- IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS SELECCIONADAS BASADA EN LAS SECUENCIAS DE LOS GENES ANALIZADOS .....	85
TABLA 9- RESULTADO DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y ESPECÍFICA DE LOS EXTRACTOS ENZIMÁTICOS DE PSEUDOZYMA SP. EBV 97-87; BACILLUS SP. EBV 12-22 Y PENICILLIUM SP. EBV 95-17. INICIAL: ACTIVIDAD EN MEDIO SELECCIONADO, RESUSPENDIDA: ACTIVIDAD DEL PRECIPITADO OBTENIDO LUEGO DE AGREGAR 70% SULFATO DE AMONIO, RESUSPENDIDO EN BUFFER UTILIZADO PARA MEDIR ACTIVIDAD. ....	110
TABLA 10 - Rf DE LOS ESTÁNDARES DE XILOOLIGOSACÁRIDOS (XOS). .....	111
TABLA 11 - COMPOSICIÓN DE LOS POLÍMEROS DE LA CORTEZA DE E. DUNNII SIN TRATAR Y TRATADA CON ÁCIDO PERACÉTICO. ....	128
TABLA 12- PORCENTAJE DE XILANOS DE LA CORTEZA DESLIGNIFICADA Y TRATADA CON LAS XILANASAS DE BACILLUS SP. EBV 12-22 A LAS 72 HORAS DE REACCIÓN .....	131
TABLA 13 - PORCENTAJE DE XILANOS DE LA CORTEZA DESLIGNIFICADA Y TRATADA CON LAS XILANASAS DE PSEUDOZYMA SP. EBV 97-87 A LAS 72 HORAS DE REACCIÓN .....	133
TABLA 14 - HIDRÓLISIS DE CORTEZA DESLIGNIFICADA CON ENZIMAS DE PSEUDOZYMA SP. EBV 97-87. SE MUESTRA LA CONCENTRACIÓN FINAL DE XILOSA, EL TIEMPO EN LA QUE SE OBTUVO LA MAYOR CONCENTRACIÓN Y EL PORCENTAJE FINAL DE CONVERSIÓN DE XILANO (AQUELLOS CON ESTIMACIÓN DEL ERROR SON PROMEDIOS DE DOS REPETICIONES). .....	137
TABLA 15 - FERMENTACIÓN DE XILOSA DEL HIDROLIZADO ENZIMÁTICO DE CORTEZA DE E. DUNNII Y MEDIOS SINTÉTICOS. CONCENTRACIÓN DE XILOSA INICIAL, XILITOL Y RENDIMIENTO (XILITOL/XILOSA) Y PRODUCTIVIDAD VOLUMÉTRICA....	142

**LISTA DE ABREVIATURAS**

AA	enzimas auxiliares
B	Bacterias
BGL	$\beta$ -glucosidasas
BSA	Albumina del suero bovino
BXL	$\beta$ -xilosidasas
CAZy	Carbohydrate Active Enzyme
CBH	exoglucanasas / celobiohidrolasas
CBM	Módulo de unión a carbohidratos
CD	Czapek-Dox
CDm	Czapek-Dox modificado
CLE	Corteza libre de extractivos de <i>Eucalyptus dunnii</i>
CMC	carboximetilcelulosa
CorDes	Corteza deslignificada de <i>Eucalyptus dunnii</i>
DNS	Ácido Di-nitro-salicílico
DOE	Department of Energy
DP	grado de polimerización
EG	endoglucanasas
FPasa	Actividad celulasa medida con método de papel de fitro
GH	glicosil hidrolasas
HF	Hongos filamentosos
HPLC	cromatografía líquida de alta performance
IEA	Internation Energy Agency
L	Levaduras
LPMO	monooxigenasas degradadoras de polisacáridos
MeGlcA	ácido 4-O-metil-D-glucurónico
Mn	peso molecular promedio en número
Mw	peso promedio ponderado
PDA	Potato Dextrose Agar
PDB	Potato Dextrose Broth
SmF	fermentación sumergida
SSF	Fermentación en estado sólido
TLC	Cromatografía en capa fina
TSA	Tryptic Soy Agar
TSB	Tryptic Soy Broth
X1	Xilosa
X2	Xilobiosa
X3	Xilotriosa
X4	Xilotetrosa
X5	Xilopentosa
X6	Xilohexosa
Xilp	xilopiranosas

XLN	endoxilanasas
XOS	xilooligosacáridos
YNB	Yeast Nitrogen Base



# 1. Resumen

Las enzimas son biocatalizadores eficientes que se investigan para su uso a escala industrial. Según Business Communication Company (BCC) Research, se prevé que el mercado global de enzimas aumente de \$ 5.01 mil millones en 2016 a \$ 6.32 mil millones en 2021, con tendencias del mercado que predice un cambio hacia una mayor producción de enzimas para las industrias textiles, del papel, el cuero y las biorrefinerías (Chapman, Ismail y Dinu, 2018). Se estima que tales proyecciones de mercado son en gran medida impulsadas por el desarrollo de procesos en la producción enzimática de biocombustibles que han crecido en últimas décadas. Este interés está motivado por el enorme potencial que tiene la biomasa lignocelulósica para la generación de energía y bio-productos y la reducción de la dependencia de materias primas no renovables, lo que conduce a una reducción de las emisiones de gases de efecto invernadero (Silva, Vaz y Filho, 2018).

Es en este contexto que surge el concepto de biorrefinería, en la que se busca agregar valor a la biomasa lignocelulósica. Sin embargo, la etapa de hidrólisis enzimática de la lignocelulosa está en desarrollo ya que existen dificultades operacionales, como resultado el proceso general es muy costoso y se refleja en el precio del producto, lo que reduce la competitividad en el mercado. Por lo tanto, aún se necesita mucha investigación para mejorar la viabilidad operacional y financiera de este proceso. Una de las vías es mejorar la etapa de hidrólisis enzimática a través de la eficiencia de la enzima y la reducción del costo de producción de ésta (Kumar y Sani, 2017). En particular, dentro del sistema de enzimas degradadoras del material lignocelulósico, las xilanasas y celulasas tienen una importancia significativa en esta y otras industrias.

En la presente tesis se contribuyó a la valorización de residuos lignocelulósicos mediante la aplicación de enzimas xilanasas y celulasas producidas a partir de microorganismos nativos. De acuerdo a los objetivos propuestos en esta tesis, se realizaron aislamientos de microorganismos a partir de diferentes partes (ramas, corteza y hojas) de un árbol de *Eucalyptus globulus*. Sobre todos los microorganismos aislados (bacterias y hongos) se realizó un cribado cualitativo de actividades xilanasas y celulasas. Luego de seleccionar los microorganismos que se mostraron positivos a estas actividades se llevó a cabo un análisis cuantitativo de las actividades xilanasas y celulasas producidas en los microorganismos aislados. De esta forma se seleccionaron los microorganismos que presentaron una mayor actividad enzimática. Estos microorganismos fueron identificados mediante observación macroscópica y microscópica y análisis moleculares.

Posteriormente, se realizó un estudio de la variación de la producción de las actividades xilanasas y celulasas en cada microorganismo seleccionado a través del tiempo de incubación y utilizando diferentes medios de cultivo. Con los resultados obtenidos se

profundizó en el estudio de la actividad xilanasas producida por una cepa de *Bacillus*, una de *Pseudozyma* y una de *Penicillium*. Para ello se realizó la purificación parcial de las enzimas a partir de los cultivos de los microorganismos. Las xilanasas parcialmente purificadas se caracterizaron en relación a su temperatura óptima, pH óptimo y en cuanto a los productos de hidrólisis del xilano de haya.

Por último se analizó la hidrólisis de corteza deslignificada de *Eucalyptus dunnii* mediante las xilanasas parcialmente purificadas producidas por *Bacillus* sp. EBV 12-22 y *Pseudozyma* sp. EBV 97-87. El material vegetal resultante se estudió mediante microscopía electrónica de barrido. También se realizó el análisis químico del mismo y del sobrenadante con el fin de evaluar los productos de biotransformación obtenidos a partir de la hidrólisis enzimática y alcanzar de esta forma datos para una posible aplicación de las enzimas. A partir de los resultados obtenidos en este estudio se procedió a evaluar la aplicación de la enzima xilanasas producida por la levadura *Pseudozyma* sp. EBV 97-87. Para ello se realizó la hidrólisis enzimática de la corteza deslignificada y la xilosa obtenida como principal producto de hidrólisis se utilizó para la producción de xilitol mediante la fermentación por una levadura, *Wickerhamomyces anomalus* Z1. Por otro lado el material remanente de la hidrólisis con xilanasas se utilizó para el estudio de la producción de etanol B2G.

Los resultados obtenidos en la presente tesis permiten contribuir al desarrollo de conocimiento, técnicas biotecnológicas y de análisis para ser aplicados sobre diferentes biomásas lignocelulósicas en búsqueda de su valorización mediante la obtención de productos de mayor valor agregado.

## 2. Introducción y marco teórico

### 2.1. Situación forestal en Uruguay

A partir de la aplicación de la ley forestal en el año 1987, el sector forestal ha mostrado un continuo crecimiento en las exportaciones, situándose para el año 2016 en 1.512.856 miles de dólares el total de exportaciones de productos forestales (Boscana y Boragno, 2017). La producción de plantas del género *Eucalyptus*, han sido las mayoritarias desde 1991 hasta la actualidad (Figura 1) al igual que la extracción de maderas (Figura 2).

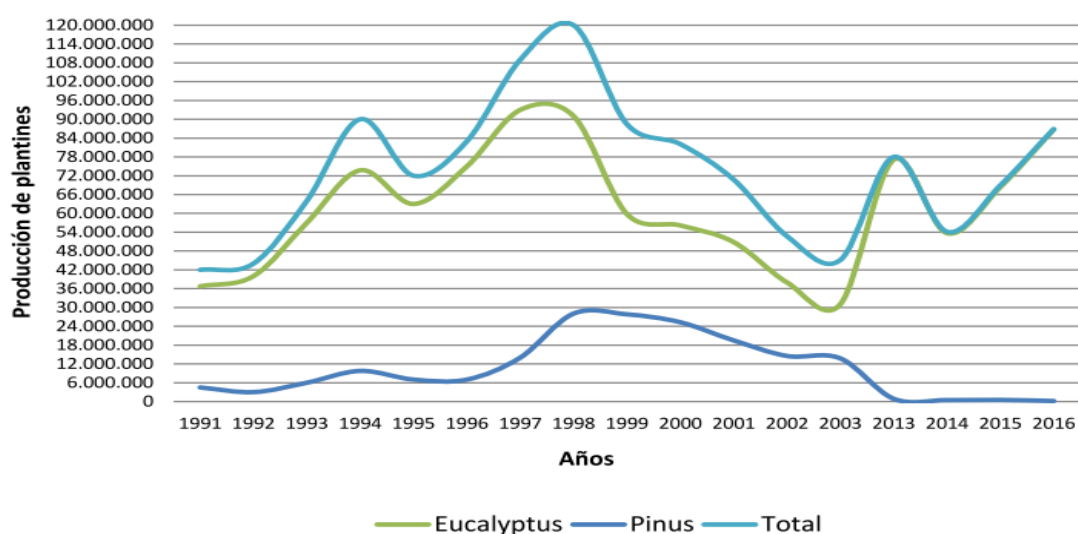


Figura 1- Producción de plantas según género por los años relevados (Boscana y Boragno, 2017).

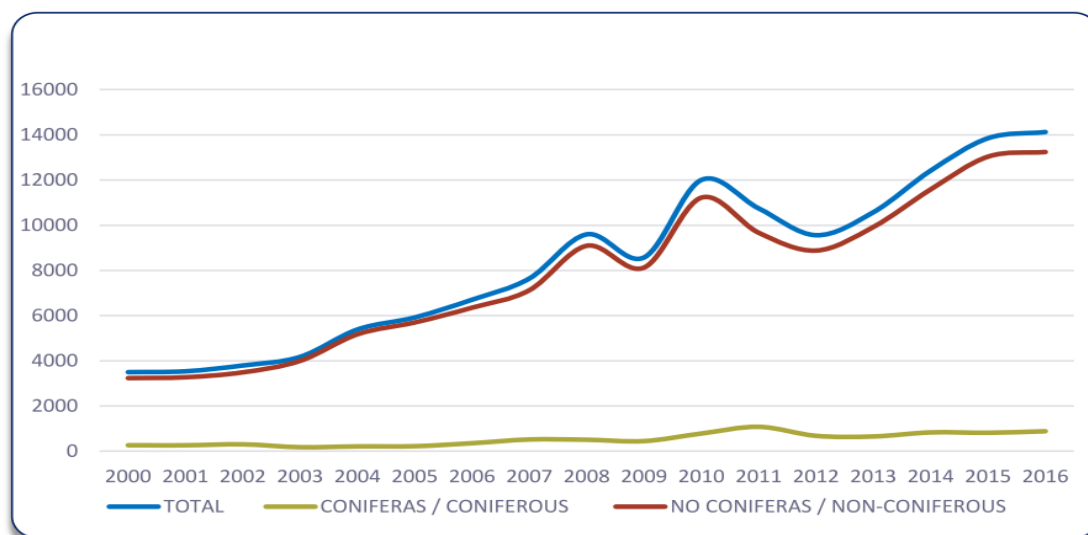


Figura 2- Extracción de madera en rollo 2000 – 2016 en miles de m<sup>3</sup> (Boscana y Boragno, 2017).

### 2.1.1. El género *Eucalyptus*

El *Eucalyptus* es un género de árboles de madera dura, originarios de Australia. En la actualidad se distribuye globalmente en las áreas templadas y debido a su alta tasa de crecimiento y la pequeña longitud de sus fibras es de gran interés en la producción de celulosa para papel fino a partir del proceso de pulpeo químico (Gellerstedt, Ek y Henriksson, 2009). Existen alrededor de 700 especies de *Eucalyptus* y en Uruguay fue introducido por el empresario Thomas Tomkinson en la década de 1830, al traer las semillas y plantarlas en su campo en la zona de Paso de la Arena convirtiéndose en los árboles más comercializados del país (Askey, no date). Según datos de 2016, en nuestro país la especie *Eucalyptus dunnii* representa el 58.5% del total de plantines de *Eucalyptus* producidos, seguido de *E. grandis* con un 28.5%, *E. benthamii* con un 6.4%, *E. smithii* con un 1.1% y *E. globulus ssp. globulus* con un 0.8% (Boscana y Boragno, 2017). En Uruguay, la utilización de la madera de *Eucalyptus* está destinada principalmente a la producción de pulpa de celulosa (Doldán, Fariña y Tarigo, 2008).

### 2.1.2. Residuos forestales

La extracción de madera para sus diferentes usos (para aserradero, para la producción de pulpa, entre otros) conlleva a la generación de residuos. Éstos pueden dividirse en dos clases: los que proceden de la recolección y extracción de los montes y los que generan las propias industrias forestales durante el proceso de fabricación de madera, tableros contrachapados, tableros de partículas, producción de pulpa (FAO, 1991).

De 100 toneladas de madera comercial producidas, se calcula que se generan 64 toneladas de residuos (corteza, ramas y madera no comercial) (Mantero, Fernández y Ros, 2008; Reina *et al.*, 2016). Estos residuos son considerados valiosos y posibles recursos como materia prima para la producción de energía u otros productos relacionados (FAO, 2014). Estos residuos forestales, junto con los residuos de la agricultura y los pastos, constituyen la biomasa lignocelulósica siendo este el recurso orgánico renovable más importante del planeta (Hadar, 2013).

## 2.2. Composición química del material lignocelulósico leñoso

---

Las células vegetales están recubiertas por la pared celular; en algunos tipos celulares, como es el caso del material lignocelulósico leñoso, esta pared está compuesta por la pared primaria (formada por una capa) y las paredes secundarias (formada de 2 a 3 capas). A su vez, las células están conectadas entre sí por la región de laminilla media intercelular (Gellerstedt, Ek y Henriksson, 2009). En la Figura 3, se muestra un modelo

típico de la organización de la pared celular. Está compuesta estructuralmente por tres polímeros principales: celulosa, hemicelulosas y lignina. En términos simplificados, la celulosa forma un esqueleto que está rodeado por las hemicelulosas y la lignina. Desde el punto de vista químico los dos primeros son polisacáridos, mientras que la lignina es un polímero aromático de origen fenólico. La presencia y concentración de los polímeros en las paredes celulares dependen de la ubicación de la célula en el vegetal, la especie y la etapa de crecimiento (Isikgor y C. Remzi Becer, 2015).

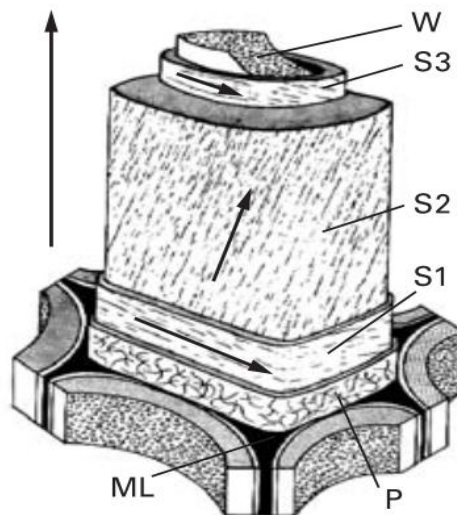


Figura 3- Diferentes capas de la pared celular vegetal. ML: Laminilla media; P: pared primaria; S1,2,3: pared secundaria y las respectivas capas; W: capa verrugosa. La flecha indica la dirección de las microfibrillas de celulosa en la pared secundaria (Gellerstedt, Ek y Henriksson, 2009)

En el caso de material lignocelulósico leñoso, la región de la laminilla media es rica en lignina (ML) (Figura 3). Si bien el contenido de lignina de esta laminilla es alto, debido a que la capa es delgada solo el 29-25% de la lignina total está presente en esta capa.

La pared primaria (P) forma la capa externa de la célula y está compuesta por microfibrillas de celulosa orientadas al azar junto con las hemicelulosas y otros polisacáridos presentes en menor medida conocidos como pectinas (Figuras 3).

La pared secundaria está compuesta de 2-3 capas conocidas como capas S1, S2 y S3, las capas S1 y S3 son comparativamente delgadas y la capa central S2 forma la parte principal de la pared celular. Esta última es de una importancia primordial debido a su grosor y a la orientación casi vertical de las microfibrillas de celulosa, que confiere a las células leñosas resistencia e imparte las principales propiedades mecánicas y físicas del material lignocelulósico. Esta capa de la pared secundaria contribuye entre el 80 y 90 % del total de la pared y tiene diferentes cantidades de celulosa, hemicelulosa y lignina (Gellerstedt, Ek y Henriksson, 2009; Wertz, Bédoué y Mercier, 2010).

## 2.2.1. Lignina

Como se explicó en la sección anterior, el material lignocelulósico está compuesto principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina. Después de los polisacáridos de celulosa y hemicelulosa, la lignina es el polímero orgánico más abundante en el reino vegetal. Tiene la estructura más compleja entre los polímeros de origen natural con una mezcla de restos aromáticos y alifáticos. No es un polímero lineal como la celulosa o un polímero ramificado como las hemicelulosas o la pectina, sino una red tridimensional, con los monómeros (los bloques de construcción) (Figura 4) conectados con varios enlaces éteres (C-O-C) diferentes y enlaces carbono - carbono (C-C) obtenidos a partir de reacciones radicalarias, que se distribuyen aleatoriamente (Timell, 2004).

Las ligninas se forman por la polimerización de tres monómeros (propilfenoles) principalmente, alcohol *p*-cumarílico, alcohol coniferílico y alcohol sinapílico. Su diferencia radica en el número de grupos metoxilo en el anillo (Figura 4). La estructura de la lignina de las maderas duras se la conoce como siringil-guayacil (S-G) lignina, y contiene principalmente unidades de alcohol coniferílico (G) y sinapílico (S). La síntesis de este polímero se realiza mediante reacciones radicalarias catalizadas principalmente por enzimas oxidorreductasas presentes en el vegetal. Como la mayoría de los enlaces que se forman en el polímero son de tipo éter, con el oxígeno proveniente de los hidroxilos fenólicos, al final, solo aproximadamente el 10 % del polímero tiene residuos fenólicos (Gellerstedt, Ek y Henriksson, 2009) (Figura 5).

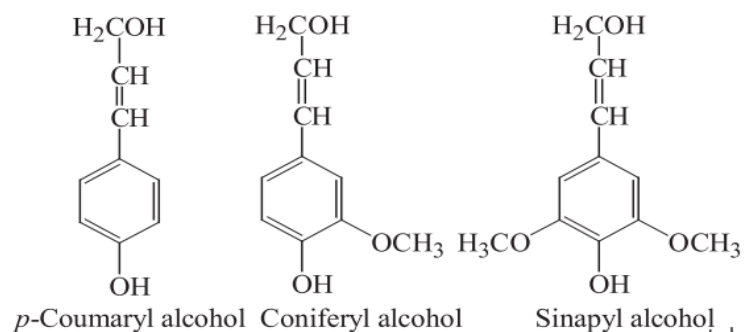


Figura 4- Monómeros de lignina. Propil fenoles (Gellerstedt, Ek and Henriksson, 2009)

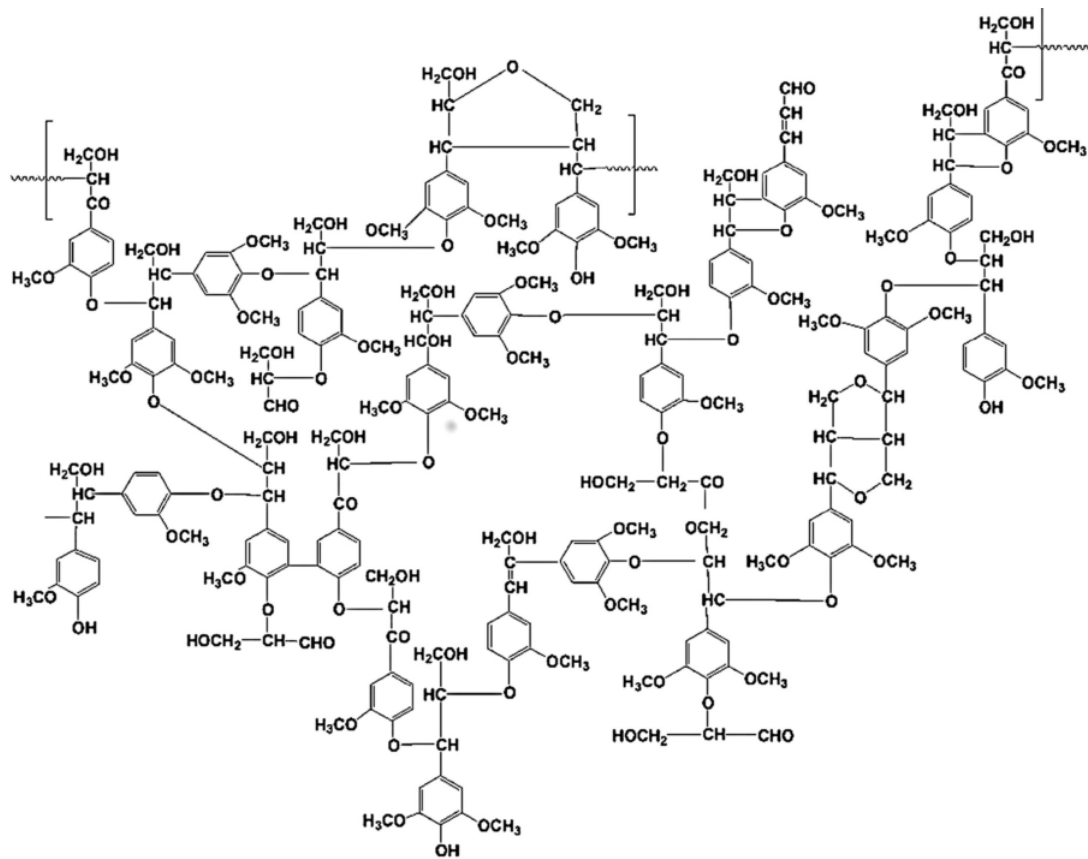


Figura 5- Estructura sugerida de lignina de maderas duras

La lignina tiene varias funciones en la planta. Una muy importante es la de actuar como un cemento que fija a los polisacáridos de la pared vegetal, proporcionándole a las fibras su rigidez, y actuando en su conjunto como soporte mecánico para que el árbol pueda desarrollar las ramas y el follaje y permitiéndole competir por más luz solar. Además tiene la capacidad de adherir las células entre sí, al estar presentes en la laminilla media. Por otro lado, la estructura de la lignina y su forma de recubrir el material, hace a la pared vegetal hidrofóbica, requisito necesario para un eficiente transporte de nutrientes y agua. Por último, la lignina tiene un rol fundamental en la protección del árbol contra la degradación microbológica debido a que forma una capa muy compacta sobre los polisacáridos impidiendo el ingreso de las enzimas extracelulares microbianas para la degradación de los azúcares (Figura 6). Sin embargo, algunos hongos y bacterias logran degradar la lignina eficientemente debido a que han desarrollado sistemas enzimáticos formados principalmente por oxidasas y peroxidasas (Hadar, 2013; Bertrand *et al.*, 2016).

La concentración y estructura de la lignina difiere según las partes del árbol y el grado de lignificación es dependiente de la edad del mismo. Por otra parte, al estar tan asociada a los polisacáridos es muy difícil obtener la lignina aislada en su forma nativa lo cual hace difícil la determinación del peso molecular y el conocimiento de su estructura real (Gellerstedt, Ek and Henriksson, 2009).

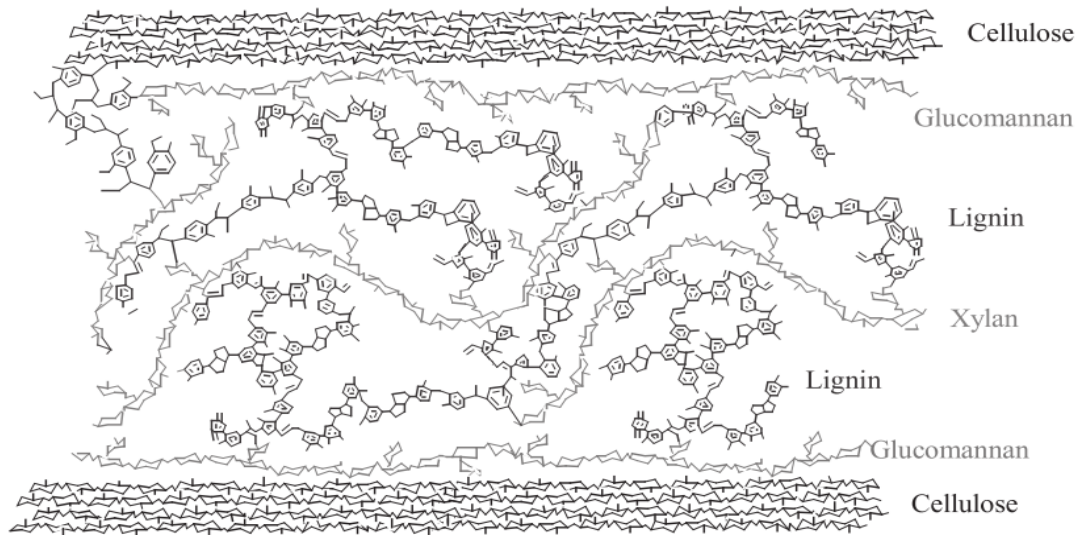


Figura 6- Asociación de la lignina con los diferentes polisacáridos dentro de la pared celular vegetal (Gellerstedt, Ek and Henriksson, 2009)

### 2.2.2. Celulosa

El principal componente de las células vegetales de todas las plantas es la celulosa, este hecho junto con la gran abundancia del material vegetal en la tierra, hacen de la celulosa el biopolímero más abundante del planeta. Este polímero tiene una gran simpleza estructural ya que está constituida por cadenas largas y sin ramificaciones de glucosa y exhibe varias propiedades de gran interés científico y tecnológico (Ramawat y Mérillon, 2015). Siguiendo el ejemplo de la madera como material compuesto, la celulosa serían las fibras que le dan la fuerza y estructura al material.

A la celulosa se la puede describir desde diferentes niveles estructurales. Como estructura primaria, las cadenas lineales formadas por unidades de  $\beta$ -glucopiranosas unidas por enlaces glicosídicos  $\beta 1 \rightarrow 4$  y con grado de polimerización alto, de aproximadamente 15000 residuos de glucosa por cadena. En la cadena, cada unidad de glucosa se rota  $180^\circ$  respecto a la próxima. En la Figura 7 se muestra la numeración de los carbonos de la glucosa en el anillo, se observan dos oxígenos unidos al C1, sustituyentes hidroxilo en los carbonos C2, C3 y un oxígeno unido al C4, en el C5 hay un sustituyente metil-hidroxilo. Las posiciones C1 y C4 están involucradas en la unión de dos monosacáridos para la formación de la cadena. Los diferentes C1 corresponden a una unión acetal a lo largo de la cadena excepto el extremo derecho que corresponde a un carbono hemiacetal con propiedades reductoras. Este extremo se lo conoce como extremo reductor, corresponde a un grupo hemiacetal no sustituido, por el otro lado, el extremo izquierdo se lo conoce como extremo no reductor (Wertz, Bédoué y Mercier,



2010). Dentro de la estructura secundaria se destacan los enlaces de hidrógeno intramoleculares ( $O3-H \rightarrow O5'$  y  $O6 \rightarrow H-O2'$ ) que estabilizan los enlaces glicosídicos y dejan rígida la estructura. También hay enlaces de hidrógeno entre dos cadenas adyacentes ( $O6-H \rightarrow O3'$ ) (Figura 7) (Pinkert *et al.*, 2009). Esta disposición mantiene a la red plana y permite que las cadenas paralelas formen una “hoja de celulosa” interaccionando entre ellas por fuerzas débiles de van der Waals entre las partes más “apolares” del anillo que corresponderían a los átomos de carbono. Al unirse estas hojas de celulosa se pueden formar dos tipos de cristales distintos en la celulosa natural, los cuales se denominan, celulosa I $\alpha$  e I $\beta$ . La diferencia entre ellos se debe a la forma en que se apilan los residuos de glucosa de las diferentes láminas y si existe o no un desplazamiento en la posición de las cadenas en las láminas de celulosa adyacentes. Como se observa en la Figura 8, la tercera lámina se puede desplazar en la misma dirección que la segunda, formando celulosa I $\alpha$  o en la dirección opuesta, formando celulosa I $\beta$ . Ambos tipos de cristales co-existen en la celulosa (Gellerstedt, Ek y Henriksson, 2009; Wertz, Bédoué y Mercier, 2010).

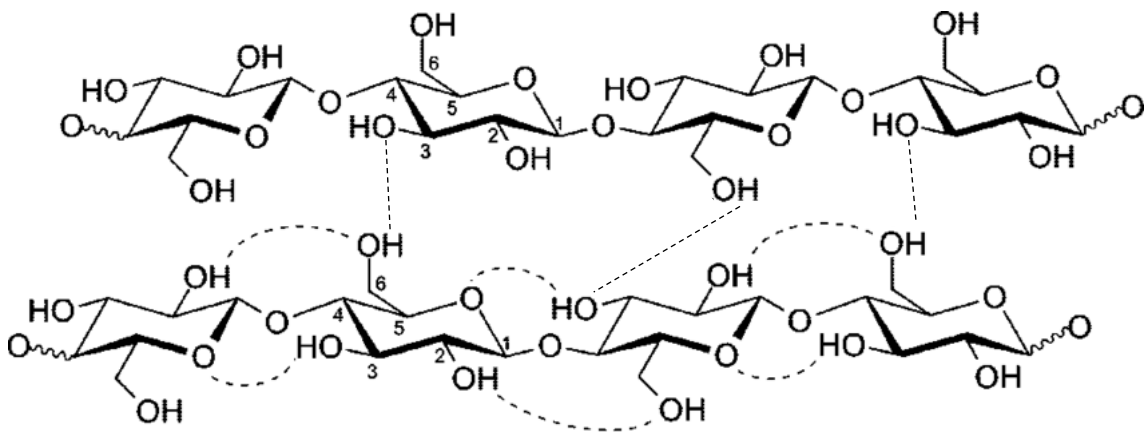


Figura 7- Enlaces de hidrógeno intra e inter – moleculares en la celulosa (Pinkert *et al.*, 2009)



Figura 8- Cadenas de celulosa, apiladas en la parte superior e inferior. La estructura izquierda es celulosa I $\alpha$  y la derecha es celulosa I $\beta$  (Gellerstedt, Ek y Henriksson, 2009).

Las largas hojas de celulosa, forman microfibrillas, una estructura fibrilar rígida, insoluble y cristalina. En las microfibrillas, las partes cristalinas se acompañan con regiones amorfas menos estructuradas (Hearle, 1958).

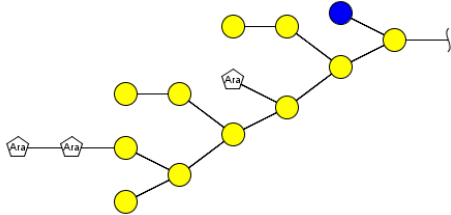
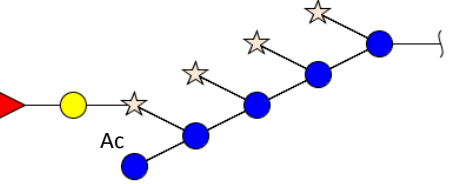
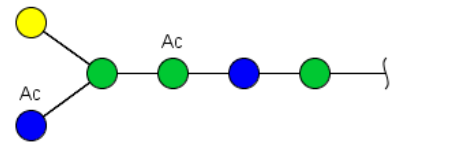


El alto grado de polimerización, las interacciones entre las cadenas, y la organización en microfibrillas le otorgan a la celulosa sus inusuales propiedades dentro del resto de los polisacáridos. Estas serían su gran fuerza como material, su insolubilidad en agua en condiciones fisiológicas (a pesar de la gran cantidad de grupos hidroxilos) y la resistencia a la derivatización química (Arenas-Cárdenas *et al.*, 2017).

### 2.2.3. Hemicelulosa

Las hemicelulosas son uno de los componentes mayoritarios de la madera, entre un 16 y un 35 % del peso seco. Son el segundo polisacárido más abundante de la naturaleza, luego de la celulosa y también se lo considera un carbohidrato estructural, ya que se encuentra en la pared celular formando la matriz donde se localizan las fibras de celulosa y la lignina. Además de encontrarse en la madera al igual que la celulosa, las hemicelulosas se encuentran en pastos, cereales y algunas plantas primitivas, pero varían en su composición y estructura (Kumar y Sani, 2017). En general las hemicelulosas son heteropolisacáridos formadas principalmente por hexosas (glucosa, manosa o galactosa) y/o pentosas (xilosa o arabinosa), en algunos casos se encuentran deoxi-azúcares y ácidos urónicos. Como se observa en la Tabla 1, donde se detallan las estructuras de los principales tipos de hemicelulosas, muchos de los azúcares están acetilados. Las hemicelulosas forman enlaces de hidrógeno con la celulosa y enlaces covalentes con la lignina (principalmente uniones  $\alpha$ -bencil-éter y enlaces éster) (Gatenholm y Tenkanen, 2003).

En general, la estructura principal de las hemicelulosas es una cadena de residuos de azúcares en su forma piranosa, unidos por enlaces  $\beta 1 \rightarrow 4$  y está más o menos sustituido por pequeñas ramificaciones. Su grado de polimerización (DP) es menor que el de la celulosa, siendo de aproximadamente 200 unidades. Por otra parte, debido a su estructura de heteropolisacárido, con la existencia de ramificaciones y sustituyentes, la estabilidad térmica y química de la hemicelulosa es menor que la de la celulosa (Mussatto, 2016). Presentan, al igual que la celulosa, extremo reductor y no reductor de la cadena principal.

Tabla 1 - Principales tipos de hemicelulosas en maderas duras y blandas (Gírio *et al.*, 2010).

Tipo de polisacárido	Origen	Cantidad	Cadena principal	Sustituyentes	Tipos de unión	DP	Representación esquemática
Arabinogalactano	Madera blanda	1-3;35	$\beta$ -D-Galp	$\beta$ -D-Galp $\alpha$ -L-Araf $\beta$ -D-Arap	$\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6) $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3) $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)	100-600	
Xilogucano	Madera dura, pastos	2-25	$\beta$ -D-Glcp $\beta$ -D-Xilp	$\beta$ -D-Xilp $\beta$ -D-Galp $\alpha$ -L-Araf $\alpha$ -L-Fucp Acetil	$\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3) $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 2) $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2) $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2)		
Galactoglucomanano	Madera blanda	10-25	$\beta$ -D-Manp $\beta$ -D-Glcp	$\beta$ -D-Galp Acetil	$\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6)	40-100	
Glucomanano	Maderas blandas y duras	2-5	$\beta$ -D-Manp $\beta$ -D-Glcp			40-70	
Glucuronoxilano	Maderas duras	15-30	$\beta$ -D-Xilp	4-O-Me- $\alpha$ -D-GlcpA Acetil	$\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2)	100-200	

<b>Arabinoglucuronoxilano</b>	Pastos, cereales y maderas blandas	5-10	$\beta$ -D-Xilp	4-O-Me- $\alpha$ -D-GlcpA $\beta$ -L-Araf	$\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2) $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)	50-185	
<b>Arabinoxilano</b>	Cereales	0.15-30	$\beta$ -D-Xilp	$\alpha$ -L-Araf Feruloil	$\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2) $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)		
<b>Glucuronoarabinoxilano</b>	Pastos cereales y	15-30	$\beta$ -D-Xilp	$\alpha$ -L-Araf 4-O-Me- $\alpha$ -D-GlcpA	$\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2) $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)		
<b>Homoxilano</b>	Algas		$\beta$ -D-Xilp				

- $\beta$ -D-Xil p = D-xilosa en forma piranosa,  $\beta$  configuración del hidroxilo anomérico
- $\alpha$ -L-Fuc p = L-fucosa en forma piranosa,  $\alpha$  configuración del hidroxilo anomérico
- $\beta$ -D-Gal p = D-galactosa en forma piranosa,  $\beta$  configuración del hidroxilo anomérico
- $\beta$ -D-Glc p = D-glucosa en forma piranosa,  $\beta$  configuración del hidroxilo anomérico
- $\beta$ -D-Man p = D-manosa en forma piranosa,  $\beta$  configuración del hidroxilo anomérico

- $\beta$ -L-Ara f = L-arabinosa en forma furanosa,  $\beta$  configuración del hidroxilo anomérico
- $\beta$ -L-Ara p = L-arabinosa en forma piranosa,  $\beta$  configuración del hidroxilo anomérico
- Me 4-O-Me- $\alpha$ -D-Glc pA = 4-O-Metil-  $\alpha$ -D-ácido glucurónico en forma piranosa,  $\alpha$  configuración del hidroxilo anomérico
- Ac Acetilo = grupo acetilo
- Ácido ferúlico = grupo sustituyente

### 2.2.3.1. Xilano

Los glucuronoxilanos, o más comúnmente denominados xilanos, son el tipo de hemicelulosa más relevante junto con los glucomananos ya que son ubicuos en las plantas. Tienen una cadena principal de residuos de  $\beta 1 \rightarrow 4$ -D-xilopiranosido (Gírio *et al.*, 2010). La mayoría de los xilanos de madera dura, tienen como grupo lateral, ácido 4-O-metil-D-glucurónico (MeGlcA), unido por enlace  $\alpha - (1 \rightarrow 2)$  a la cadena de xilano y contienen además grupos acetilos. Como se observa en la Figura 9, la hemicelulosa presente en el género *Eucalyptus* es principalmente O-acetil-(4-O-metilglucurono) xilano. En promedio hay un ácido 4-O-metil glucurónico cada 8-20 residuos de xilosa y la cadena principal está parcialmente acetilada. Se han reportado pesos moleculares de entre 5.600 a 40.000 Da y un grado de polimerización de entre 100 y 220 unidades. Los grupos acetilos están en general en las posiciones C2 y C3 y el grado de acetilación es variable (Evtuguin *et al.*, 2003; Vega *et al.*, 2015).

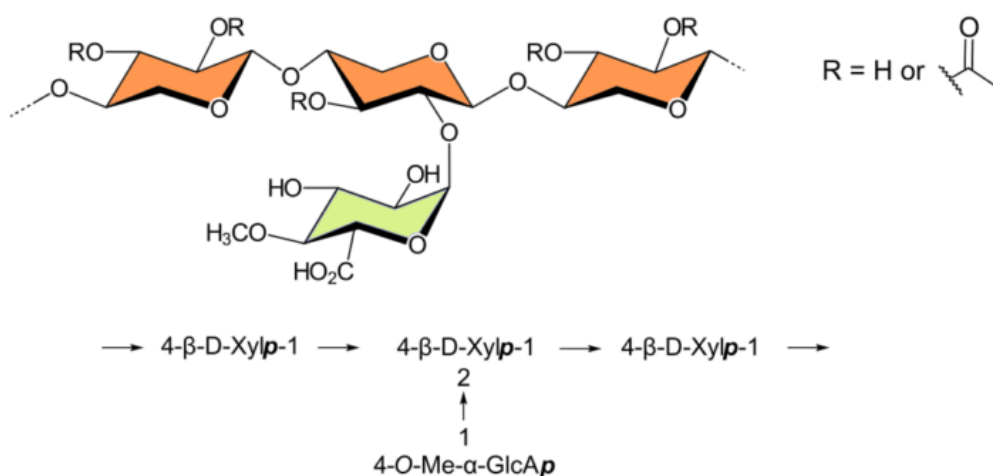


Figura 9- Representación de la estructura del xilano de *Eucalyptus* (Vega, 2017).

Debido a la existencia de estas ramificaciones, no es posible un arreglo molecular cristalino, como en el caso de la celulosa (Gellerstedt, Ek y Henriksson, 2009).

## 2.3. Biorrefinerías

---

### 2.3.1. Productos comercializados a partir de material lignocelulósico

La madera es una materia prima versátil y tiene una inmensa importancia para la humanidad como fuente de energía, material de construcción y los productos obtenidos a partir de pulpa de celulosa como el papel. El uso de madera (y otra biomasa) para la obtención de productos químicos es, sin embargo, una industria incipiente con un volumen de producción bastante moderado ya que el petróleo constituye hasta hoy un material de partida excelente y versátil para la industria química y de polímeros. Solo en algunas áreas específicas, los productos químicos a base de biomasa lignocelulósica han podido competir exitosamente con los derivados del petróleo. El más importante de estos es el Lyocell, es el nombre genérico de una fibra de celulosa que se utiliza para realizar prendas de vestir. Se obtiene mediante un proceso de disolución de la fibra de celulosa, en un disolvente (mezcla de agua y otros productos químicos como N-metilmorfolina), posteriormente esta solución se filtra y se hila en un baño de coagulación para formar las fibras. En el proceso se recupera el solvente para su posterior uso (Ramawat y Mérillon, 2015). En algunas fábricas donde se utilizan los procesos sulfito y kraft, la lignina disuelta se recupera por evaporación o precipitación y se procesa en productos como agentes dispersantes. De las fábricas con proceso kraft de madera blanda, los extractivos volátiles se recuperan como trementina, mientras que la parte restante de los extractivos forman el llamado tall oil.

Se desprende entonces que debido a su estructura química, de la biomasa lignocelulósica, se podrían obtener una infinidad de posibles productos químicos (Isikgor y C. Remzi Becer, 2015). A pesar de los posibles beneficios del uso de lignocelulósicos, la conversión de la biomasa es un gran desafío. El material lignocelulósico ha evolucionado para resistir la degradación enzimática y química. Por lo que para cambiar las propiedades físicas y químicas de la matriz lignocelulósica, es necesario realizar pretratamientos sobre este material. Estos procesos son costosos económica y energéticamente, entonces en la actualidad se están llevando a cabo extensas investigaciones en todo el mundo para abordar estas dificultades (Isikgor y C. Remzi Becer, 2015).

### 2.3.2. Concepto de biorrefinería

El uso de los diferentes componentes de la biomasa para la obtención de distintos productos de alto valor comercial ha sido reconocido como la estrategia más promisoría para maximizar el valor derivado de dicha materia prima y para crear nuevas industrias. Este enfoque integrado surge a finales del siglo XX, se conoce como biorrefinería y

representa una pieza clave hacia la sustentabilidad (Mussatto, 2016). Según la Agencia de Energía Internacional (IEA) la biorrefinería se define como el procesamiento de manera sustentable de biomasa para lograr su conversión en una variedad de productos bio-compuestos (comida, sustancias químicas, materia prima) y bioenergía (biocombustibles, calor) (International Energy Agency, 2009). Con el fin de identificar los productos más prometedores, o con mayor potencial económico para una biorrefinería, se deben considerar varios factores, por ejemplo, precio, composición y disponibilidad de materia prima; precio de la energía; el pretratamiento de biomasa elegido; necesidades del mercado; y condiciones regulatorias, entre otras.

A lo largo de su corta historia, se ha intentado clasificar a las biorrefinerías de diferentes formas, pero hoy día la más aceptada es la de dividirla en dos categorías, dependiendo del tipo principal de producto (energético o no energético) obtenido a partir de la biomasa (Jungmeier *et al.*, 2015; Kumar y Sani, 2017).

Biorrefinería **DIRIGIDA A LA ENERGIA**: donde la biomasa se usa principalmente para producir biocombustibles de transporte, energía y / o calor, y los subproductos del proceso se venden como alimento o se modifican mínimamente a productos de mayor valor agregado para proporcionar un beneficio ambiental y económico adicional.

Biorrefinería **DIRIGIDA A LOS PRODUCTOS**: donde la biomasa se fracciona en múltiples sustancias químicas o materiales con alto valor agregado, y los subproductos resultantes se procesan o utilizan para proporcionar calor y / o energía (para la venta o para uso interno de la fábrica). A través de este enfoque en cascada, es posible obtener el mayor valor económico de la biomasa.

En la Figura 10 se muestra una representación de la pirámide de valor de los productos que se podrían obtener de la biomasa. Aquellos dirigidos a la salud humana van a ser los de mayor valor agregado. Por otro lado, la producción de energía, si bien se pueden obtener grandes cantidades, es menos rentable económicamente.

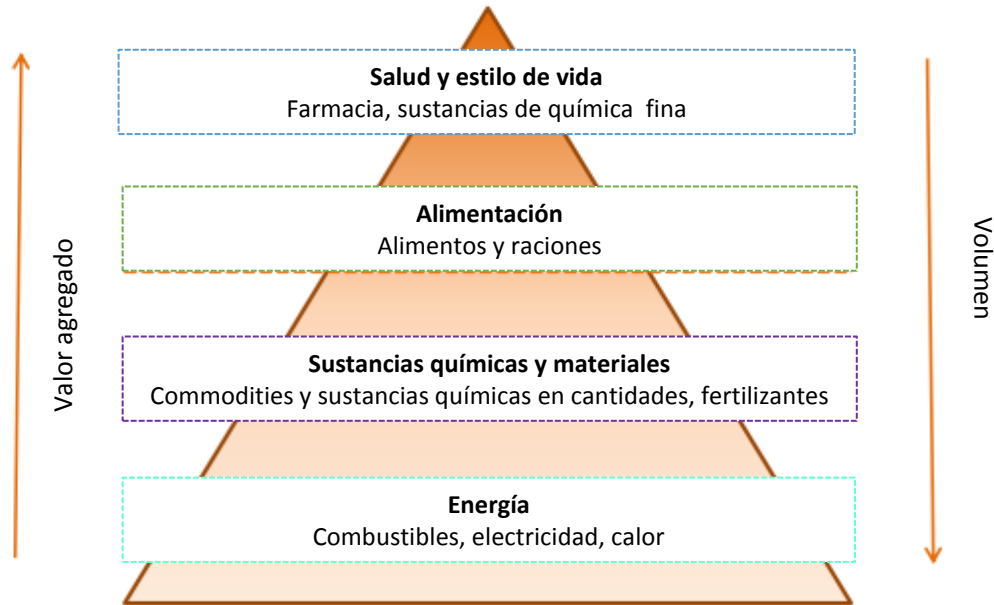


Figura 10- Pirámide de valor de diferentes aplicaciones de la biomasa (International Energy Agency, 2009).

El enfoque en la investigación para cada tipo de biorrefinería es diferente (Figura 11). Por un lado, la investigación en la biorrefinería dirigida a la producción de combustibles tiende a evaluar un gran número de tecnologías distintas para producir pocos o un único producto previamente identificado, es decir, la investigación de biocombustibles es convergente. La tecnología para un proceso de producción de combustible se estudia y se descarta o no en favor de procesos más económicos. Por lo tanto, la identificación del producto conduce a la elección de la tecnología.

Si los productos químicos se incluyen como parte de la cartera de la biorrefinería, la cantidad de productos posibles aumenta, lo que se explica cómo un estudio divergente.

Esta elección de productos químicos a producir en la biorrefinería enfrenta dos desafíos principales (1) la falta de tecnologías de conversión universales que se adapten a las diferentes biomásas. (2) La producción de bio-productos es cuestionada por un exceso de objetivos. Esto significa que, como se explicó anteriormente, el potencial de productos posible a obtener es muy grande, por lo tanto se deben evaluar cuáles son los productos más beneficiosos y las necesidades para su desarrollo.

Entonces el desafío consiste en identificar las estructuras que se obtendrían más fácilmente a partir de un proceso de conversión determinado, en lugar de intentar obligar a un proceso de conversión a ajustarse a una estructura previamente identificada (Figura 11). Varias agencias como el departamento de energía de Estados Unidos o la Comisión Europea (Bozell & Petersen, 2010; E4tech, Re-Cord, & Wur, 2015; Werpy & Petersen,



2004) han realizado la selección de productos y tecnologías teniendo en cuenta diferentes criterios que se listan en la tabla 2.

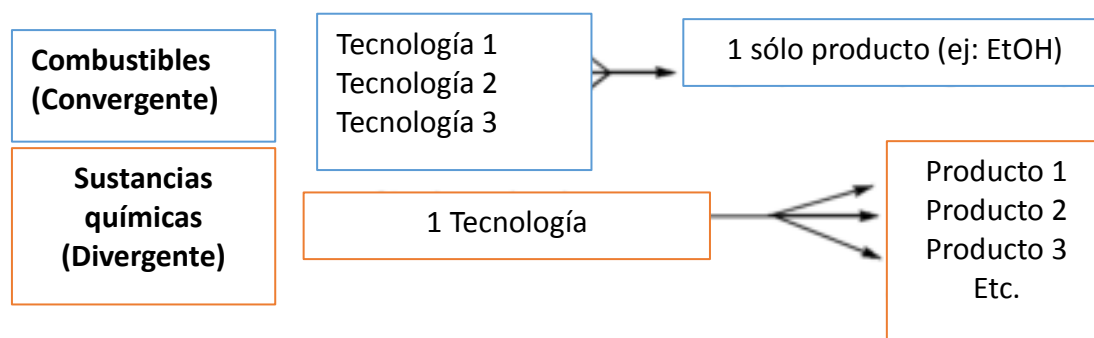


Figura 11- Investigación en combustibles y sustancias químicas a partir de biomasa

Tabla 2- Criterios de evaluación de oportunidades para el desarrollo de tecnologías y productos de interés en biorrefinerías a partir de carbohidratos. Adaptado de (Bozell & Petersen, 2010).

Criterios de selección
El compuesto o tecnología ha recibido una atención significativa en la literatura.
El compuesto se obtiene a partir de una tecnología aplicable a múltiples productos.
La tecnología proporciona sustitutos directos para sustancias petroquímicas existentes.
La tecnología es aplicable a productos que se obtienen en grandes cantidades.
El compuesto sirve como material de partida para la producción de variados derivados ofreciendo una gran flexibilidad y amplitud a la biorrefinería.
Está en vías de desarrollo el pasaje a escala piloto, demostración o comercial del producto o la tecnología.
La investigación conduciría a mejoras en la producción o nuevos usos de productos existentes mejorando su utilidad.

Los criterios citados anteriormente se fijaron teniendo en cuenta diferentes factores como los procesos, la economía, la viabilidad industrial, el tamaño de los mercados y la capacidad de un compuesto para servir como plataforma para la producción de derivados (Bozell y Petersen, 2010).

### 2.3.3. Principales productos a obtener a partir de azúcares

En 2004 el Departamento de Energía de Estados Unidos (DOE) seleccionó, en base a los criterios descritos anteriormente, una lista de doce productos químicos derivados de azúcares (Tabla 3). Estos doce “bloques de construcción” o productos intermediarios, son moléculas con múltiples grupos funcionales que se pueden convertir posteriormente en una serie de productos químicos o materiales de alto valor (Werpy y Petersen, 2004).

Esta lista de productos de interés no busca ser una lista invariable, sino que la intención de su realización fue catalizar la identificación y el desarrollo de las tecnologías necesarias para la síntesis de los múltiples productos de la lista.

Tabla 3- Vías actualmente utilizadas o potenciales para obtener los doce productos de mayor interés según la DOE. F = fermentación, Q = química, B = biotransformación. El subíndice <sub>c</sub> = comercializado (en 2004).

Azúcar del que deriva	Producto	Formas de producción (c= Comercializado)
C5, C6	1,4-diácidos (succínico, fumárico y málico)	F
C6	ácido 2,5-furano-dicarboxílico	Q
C5, C6	ácido 3-hidroxiopropiónico	F
C5, C6	ácido aspártico	F / B
C6	ácido glucárico	F / Q
C5	ácido glutámico	F <sub>c</sub>
C5	ácido itacónico	F <sub>c</sub>
C5	ácido levulínico	Q
C5, C6	3-hidroxibutirolactona	Q
C5, C6	glicerol	F / Q <sub>c</sub>
C6	sorbitol	F / Q <sub>c</sub> / B
C5	xilitol / arabinitol	F / B/Q <sub>c</sub>

Desde el reporte original de la DOE otros autores han incluido un número mayor de productos de interés como el etanol, butanol, acetona, el ácido láctico y furfural. Por otro lado, quitaron de la lista a otros que no lograron en esos años desarrollarse y ganar importancia, como el caso del ácido glucárico (Bozell & Petersen, 2010).

La mayoría de los productos citados en la Tabla 3 son obtenidos en general mediante transformaciones biológicas de los azúcares provenientes de la biomasa, pero las transformaciones químicas predominan en la conversión de estos intermediarios a otros productos de mayor valor (Werpy y Petersen, 2004).

Las principales barreras técnicas existentes en la obtención de los productos intermediarios mediante procesos biológicos son, la necesidad de mejorar el biocatalizador microbiano para reducir los co-productos de fermentación como los ácidos orgánicos, aumentar los rendimientos y las productividades y por otro lado, reducir los costos del proceso de recuperación de los productos. Por último, sería necesario también solucionar problemas de escalado e integración de las diferentes etapas de los procesos (Werpy y Petersen, 2004; E4tech, Re-Cord y Wur, 2015; Kumar y Sani, 2017).

Aparte de los posibles “bloques de construcción” que se pueden obtener de los monosacáridos provenientes de los polímeros de celulosa y hemicelulosa, se ha estudiado la funcionalización de esos polímeros, (Vega, 2017; Gabova, 2018), con aplicaciones en campos como la medicina, biotecnología y embalaje. Además se ha estudiado el desarrollo de la nanocelulosa, (fibras de celulosa de micrómetros de largo funcionalizadas o no) que se utilizan para modificar la reología de diversos materiales, la formación de nuevos materiales compuestos y como estabilizantes de emulsiones (Arola, 2015). Estos materiales son obtenidos por combinación de métodos químicos, físicos y enzimáticos.

Por último, otros productos que han atraído la atención en las últimas décadas, son los xilooligosacáridos (XOS) obtenidos a partir de la degradación química o enzimática o una combinación de ambas, de diferentes materiales lignocelulósicos. Originalmente este término estaba reservado para aquellos oligosacáridos obtenidos de la hidrólisis del xilano con un grado de polimerización (DP) de entre 3 a 10 unidades de xilosa pero en otros estudios se extiende la definición a todos aquellos fragmentos solubles en agua obtenidos de la degradación del xilano (en general con un DP < 20) (Moure *et al.*, 2006). Se ha reportado que estos productos son utilizados principalmente como prebióticos ya que al ser consumidos en la dieta mejoran el desarrollo de la flora bacteriana del intestino (principalmente bifidobacterias y lactobacillus) (Driss *et al.*, 2014). Además se han reportado otras actividades ya que pueden actuar como, sustancias antioxidantes y antiinflamatorias por lo que al consumirse en la dieta, pasan a ser parte de los llamados alimentos funcionales. El mercado de estos productos crece anualmente y se reporta a Japón como uno de los principales productores de XOS, aproximadamente 650 toneladas por año que se venden a 24 dólares / kg (Taniguchi, 2004).

### 2.3.4. Procesos para la obtención de azúcares a partir de lignocelulósicos

La biomasa se puede dividir en productos forestales (como leña de los árboles o arbustos, corteza, ramas), residuos agrícolas (como biomasa no leñosa como paja, cáscara, rastrojo), cultivos energéticos (como sorgo y caña de azúcar) y desechos animales (como estiércol). La diferencia principal entre ellas es que los cultivos energéticos como los azucareros y los ricos en almidón, son más simples en su procesamiento para la obtención de azúcares que los residuos formados por lignocelulosa, ya que los azúcares están libres o en el caso de los almidones, solamente se necesita una hidrólisis previa utilizando una mezcla de  $\alpha$ -amilasa y glucoamilasa (Kawa-Rygielska y Pietrzak, 2014; Costa *et al.*, 2018). Los cultivos energéticos, hoy en día, son la biomasa más utilizada en las biorrefinerías instaladas, para la producción de energía. Sin embargo son muy criticados ya que este tipo de biomasa podría utilizarse como alimento. Actualmente se exige que toda nueva práctica de biorrefinería que se vaya a desarrollar debe evaluarse a través de toda la cadena de valor para asegurar la sostenibilidad ambiental, económica y social (Kumar y Sani, 2017).

La biomasa lignocelulósica, a diferencia de los cultivos energéticos, necesita una gama relativamente grande de tecnologías de procesamiento para el tratamiento de la misma. De hecho, la mayoría de estas tecnologías aún se encuentran en la etapa pre-comercial. Por lo tanto, uno de los objetivos de investigación más importantes es fraccionar el material en sus tres componentes principales: celulosa, hemicelulosas y lignina (Mupondwa *et al.*, 2017).

En la conversión del material lignocelulósico en los azúcares para luego obtener diferentes productos químicos como los descritos anteriormente están involucrados una multiplicidad de pasos. Los principales se ilustran en la Figura 12.

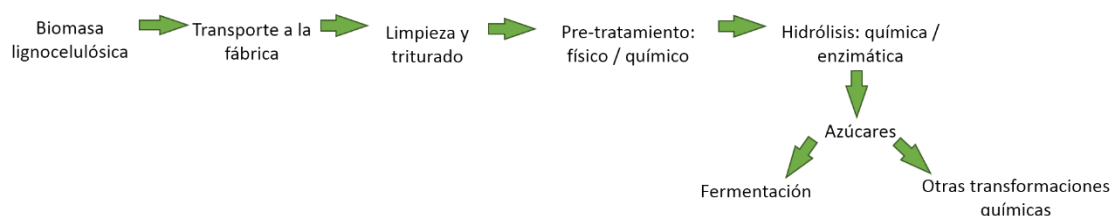


Figura 12- Pasos involucrados en el procesamiento de la biomasa lignocelulósica.

De ellos, el pretratamiento, etapa en la que se cambian las características de unión natural de los componentes del material lignocelulósico mediante la modificación de la

estructura supramolecular de la matriz celulosa-hemicelulosa-lignina, es el paso más importante (Arenas-Cárdenas *et al.*, 2017; Mupondwa *et al.*, 2017).

Después del pretratamiento, la celulosa liberada y las hemicelulosas se hidrolizan a azúcares monoméricos (hexosas y pentosas) usando métodos químicos o enzimáticos. La hidrólisis enzimática por celulasas y hemicelulasas es el método preferido debido a los mayores rendimientos de conversión y condiciones menos corrosivas y tóxicas en comparación con la hidrólisis ácida. La fermentación de todos los azúcares libres a diferentes productos se lleva a cabo por levaduras, bacterias u hongos filamentosos, genéticamente modificadas o no (Hadar, 2013).

#### 2.3.4.1. Pretratamientos

Se han estudiado y desarrollado diversas técnicas de pretratamiento para modificar la estructura física y química de la biomasa lignocelulósica y separar eficientemente las fracciones de hemicelulosa y lignina de la celulosa sin promover la degradación de los azúcares. Cada uno de estos métodos tiene claras ventajas y desventajas. El paso de pretratamiento es hoy en día el tema de mayor complejidad debido a varios factores estructurales como son los enlaces de hidrógeno intra e intermoleculares en la celulosa, la existencia de múltiples enlaces entre la lignina (polímero aromático) y los polisacáridos. Si se pretende trabajar sobre los polisacáridos, para su conversión en monosacáridos, la lignina permanece sin transformarse porque usualmente requiere altas temperaturas de procesamiento (>250 °C) en comparación con los polisacáridos (<230 °C). Si por otro lado, se intenta despolimerizar la lignina simultáneamente, las reacciones de degradación de los azúcares se vuelven muy importantes. En la mayoría de los casos, la lignina no degradada también es capaz de inhibir los sitios catalíticos de las enzimas que se utilizan en el paso posterior de hidrólisis de los polisacáridos (Kraus, Stankiewicz y Siedl, 2015).

Un pretratamiento entonces, debe presentar los siguientes requisitos para ser utilizado a nivel industrial (Arenas-Cárdenas *et al.*, 2017; Sun y Cheng, 2002):

- mejorar la hidrólisis enzimática
- prevenir la pérdida o degradación de carbohidratos
- evitar la formación de inhibidores para los posteriores procesos de hidrólisis y fermentación
- ser económico
- generar celulosa altamente hidrolizable para la rápida conversión y permitir un bajo uso de enzimas
- que sea aplicable a diferentes residuos lignocelulósicos y de fácil operación.

A nivel industrial hoy en día se utilizan en conjunto la reducción mecánica del tamaño de partícula y la explosión por vapor o el tratamiento con ácido diluido (E4tech, Re-Cord y Wur, 2015). A continuación se presenta una descripción breve de los pretratamientos más importantes y más estudiados.

#### 2.3.4.1.1. Pretratamientos físicos

##### 2.3.4.1.1.1. Reducción mecánica

Se puede reducir el tamaño de partícula y la cristalinidad de la celulosa de los residuos mediante una combinación de corte, trituración y molienda. Esta molienda requiere altas cantidades de energía, determinada por el tamaño final de la partícula, características de la biomasa y el contenido de humedad en el residuo.

La reducción mecánica se puede combinar con otro pretratamiento, logrando que el proceso consuma menos energía y aumentando la recuperación de monosacáridos en etapas posteriores (Ramawat y Mérillon, 2015).

##### 2.3.4.1.2. Pretratamientos termo-químicos

Muchos métodos termoquímicos han sido utilizados para el pretratamiento e hidrólisis de residuos lignocelulósicos agroindustriales. Los métodos termoquímicos más importantes son la explosión por vapor, el tratamiento con álcalis o ácidos y el proceso organosolv. El objetivo de estos pretratamientos es exponer los carbohidratos (celulosa y hemicelulosa) a ser hidrolizados a través de la expansión de la fibra o mediante la digestión de la lignina. Más recientemente diversos procesos como el tratamiento con líquidos iónicos, el uso de dióxido de carbono en condiciones supercríticas o la autohidrólisis con agua a altas temperaturas y presiones se han llevado a cabo (Hadar, 2013).

##### 2.3.4.1.2.1. Explosión por vapor

Es el método más común para el pretratamiento de residuos lignocelulósicos; es una combinación de fuerzas mecánicas y efectos químicos. La biomasa se trata con vapor saturado a alta presión y luego se reduce la presión, provocando una descompresión explosiva, que provoca la evaporación de la humedad contenida en el material, lo que conduce a la separación de la matriz lignocelulósica. A su vez, se da una hidrólisis ácida de los azúcares debido a la hidrólisis de grupos acetilo de la hemicelulosa. Este proceso provoca la eliminación de la hemicelulosa y expone la superficie de la celulosa por lo que aumenta el acceso de las enzimas celulasas a las microfibrillas de celulosa. Es un proceso que se ha probado en una gran variedad de residuos lignocelulósicos como ser madera de olivos, bagazo de caña, residuos de *Eucalyptus*, paja de trigo, entre otros (Mandelli *et al.*, 2014; Chang *et al.*, 2017).

Las ventajas del proceso de explosión por vapor son varias, en primer lugar el bajo requerimiento de energía en comparación con la molienda mecánica; sin impactos ambientales negativos y en términos de costos, es uno de los procesos más efectivos. Sin embargo, las desventajas del proceso son la destrucción de una porción de la fracción de hemicelulosa; rotura incompleta de la matriz de lignina-carbohidrato; generación de inhibidores como derivados de furano, ácidos débiles y compuestos fenólicos (Chen *et al.*, 2017).

#### 2.3.4.1.2.2. Proceso organosolv

En este método, varios solventes orgánicos (metanol, etanol, acetona, etilenglicol, trietilenglicol, alcohol tetrahidrofurfurílico, etc.) o solventes orgánicos con agua en presencia de ácidos minerales u orgánicos ( $H_2SO_4$ , HCl, ácido oxálico, ácido salicílico, ácido acetilsalicílico, etc.) se utilizan para eliminar la lignina. En este proceso ocurre también hidrólisis de las hemicelulosas, lo cual facilita la digestibilidad posterior de la celulosa (Kumar y Sani, 2017). Se requiere que los solventes orgánicos utilizados en este método sean recuperables para que el proceso sea más económicamente viable. Además la producción de lignina de muy alta calidad hace que este método sea competente, ya que esta lignina se puede utilizar para la síntesis de varios productos químicos valiosos (Hadar, 2013).

#### 2.3.4.1.2.3. Pretratamiento alcalino

El método de hidrólisis alcalina consiste en la saponificación de los enlaces éster intermoleculares entre xilano y los otros componentes como la lignina. El tratamiento con NaOH diluido sobre el material lignocelulósico causa separación de las fibras, lo que provoca un aumento del área superficial interna del material, debido a que esas uniones desaparecen. Este pretratamiento se puede realizar a temperatura ambiente y presión atmosférica y en general se degradan menos los azúcares que en el pretratamiento ácido (Chen *et al.*, 2017). En general ha mostrado mejores efectos en residuos agroindustriales (biomasa no leñosa) que en lignocelulósicos (Yan *et al.*, 2015; Heggset, Syverud y Øyaas, 2016).

#### 2.3.4.1.2.4. Hidrólisis ácida

El objetivo principal del pretratamiento ácido es solubilizar la fracción de lignina y la hidrólisis parcial de los polisacáridos. El proceso implica el uso de ácidos concentrados o diluidos. La temperatura es un factor importante; la reacción puede llevarse a cabo a bajas temperaturas con ácidos concentrados o a altas temperaturas con ácidos diluidos. Sin embargo, debido al tratamiento con ácido, algunas porciones de azúcares se transforman posteriormente en furanos (furfural e hidroximetilfurfural) y otros

subproductos ácidos, lo que conduce a la pérdida de azúcares y posible inhibición de las enzimas en el posterior paso de hidrólisis (Hadar, 2013).

El tratamiento con ácido concentrado se refiere al uso de ácido con una concentración superior al 30% para la hidrólisis de los polisacáridos, con la temperatura de reacción dentro de los 100 ° C durante 2 - 10 horas a presión atmosférica. La hidrólisis llevada a cabo en ácido concentrado es relativamente lenta. Además, la mayoría de los ácidos concentrados son altamente tóxicos y corrosivos, por lo que el ácido debe ser recuperado, y el equipo utilizado debe tener resistencia a la corrosión ácida, lo cual ocasiona altos costos de operación y mantenimiento. Lo anteriormente planteado son desventajas importantes de los pretratamientos ácidos concentrados, que reducen el interés de aplicarlo a escala comercial. Sin embargo, la tasa de conversión de azúcares de este método es relativamente alta. Tanto la celulosa como la hemicelulosa pueden alcanzar una tasa de conversión superior al 90% (Arenas-Cárdenas *et al.*, 2017).

El tratamiento con ácido diluido generalmente se refiere a la reacción de hidrólisis con una concentración de ácido igual o menor a 10% como catalizador. La reacción se da a una temperatura entre 140-210 °C con una presión de hasta 10 atm durante unos segundos a varios minutos. El tratamiento con ácido diluido es un proceso rápido que ataca mayoritariamente la porción de hemicelulosa debido a que es más fácilmente hidrolizable por poseer cadenas más cortas y ramificaciones. En general se reportan porcentajes de hasta un 90% de recuperación de hemicelulosa degradada en oligosacáridos y monosacáridos, mientras que el sólido resultante queda rico en lignina y celulosa. La remoción de la hemicelulosa aumenta la porosidad del material, a su vez la estructura de la lignina se degrada levemente (Mussatto, 2016). Además de los azúcares provenientes de la hemicelulosa, en el sobrenadante se puede encontrar ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural (generados por la degradación de las pentosas y hexosas) que son en general tóxicos para los microorganismos y por lo tanto su concentración debe ser la más baja posible. Entre las principales desventajas se encuentra el uso de equipo que sea resistente a la corrosión, que por lo general son costosos. El uso de altas temperaturas y presiones lleva a un gran consumo de energía lo cual tiene un impacto en el costo del proceso, al igual que la necesidad de neutralizar el sobrenadante, y la consecuente generación de sales que se deben separar del medio y disponer de forma adecuada (Chen *et al.*, 2017).

Otra metodología descrita es el uso de ácido acético y peróxido de hidrógeno (método de ácido peracético) para eliminar la lignina antes de la hidrólisis enzimática tanto para la producción de XOS como para la posterior fermentación de los azúcares a etanol. El uso de este método no solo se considera amigable con el medio ambiente, sino que



también es muy eficaz en la escisión de los anillos aromáticos presentes en la lignina (Bragatto, Segato y Squina, 2013; Song *et al.*, 2016).

#### 2.3.4.1.3. Pretratamientos biológicos

El pretratamiento biológico de la biomasa es el método más seguro y amigable con el medio ambiente. Se utiliza la habilidad de un grupo de hongos filamentosos pertenecientes al phylum basidiomycota, (conocidos como hongos de la podredumbre blanca de la madera) los cuales degradan selectivamente la lignina, utilizando un sistema enzimático ligninolítico (García-Torreiro *et al.*, 2016).

Las enzimas responsables de la degradación de la lignina son oxidorreductasas conocidas como lacasa, y lignina y manganeso peroxidasa. Estas son las que oxidan parcialmente las estructuras fenólicas y no fenólicas de la lignina y por lo tanto aumentan la porosidad de la biomasa (Carro *et al.*, 2016).

Es un proceso que se realiza a temperatura ambiente y consume menor energía que los otros pretratamientos anteriormente citados.

Sin embargo la velocidad de degradación es muy baja y requiere un largo tiempo de procesamiento, lo que es una gran desventaja (Kumar y Sani, 2017). En este sentido se pueden acoplar a un pretratamiento biológico otro pretratamiento para disminuir por un lado, los tiempos del tratamiento biológico y por el otro, el uso de energía del proceso fisicoquímico (Ramarajan y Sumathi Manohar, 2017).

#### 2.3.4.2. Despolimerización enzimática de celulosa y hemicelulosa

El paso siguiente al pretratamiento es la hidrólisis de la celulosa y la hemicelulosa para obtener los azúcares y oligosacáridos de interés, según el objetivo buscado. Este paso puede llevarse a cabo mediante hidrólisis ácida, pero este procedimiento genera residuos ácidos que pueden interferir con los pasos subsiguientes como la fermentación. Otra alternativa es la hidrólisis enzimática (Juturu y Wu, 2014).

La degradación enzimática de la celulosa y la hemicelulosa se realiza en la naturaleza a través de la acción colectiva de múltiples enzimas activas sobre carbohidratos, que actúan en conjunto con actividades sinérgicas y modos de acción complementarios (Carro *et al.*, 2016).

Estas enzimas tienen principalmente actividad hidrolítica y son las que rompen los enlaces glicosídicos presentes en celulosa y hemicelulosa. Forman parte de un gran grupo de enzimas llamadas glicosil hidrolasas (GHs) y en el caso de aquellas que hidrolizan los componentes lignocelulósicos se las conoce como celulasas y xilanasas. Las GH son asistidas en su función por otras enzimas auxiliares (AAs) que eliminan los sustituyentes

de la cadena principal presentes en las hemicelulosas, permitiendo que las GHs actúen sobre la cadena principal (Sweeney y Xu, 2012).

La capacidad de deconstruir biológicamente el material lignocelulósico tiene múltiples orígenes y ha evolucionado en diversas ramas más pequeñas, pero es escasamente dispersa en lo que sería todo el Árbol de la Vida. Es decir que si bien encontramos organismos pertenecientes a los dominios eucariota, procariota y arquea, capaces de degradar el material lignocelulósico, esta capacidad está restringida a pocos filos dentro de cada dominio (Figura 13). En la Figura 13 se observan los géneros de los organismos que degradan la lignocelulosa usando enzimas propias mostradas en negrita, aquellos microorganismos que utilizan enzimas propias más derivadas de simbiontes que se muestran en gris y aquellos organismos que degradan la celulosa con enzimas derivadas de simbiontes que se muestran subrayados (Cragg *et al.*, 2015).

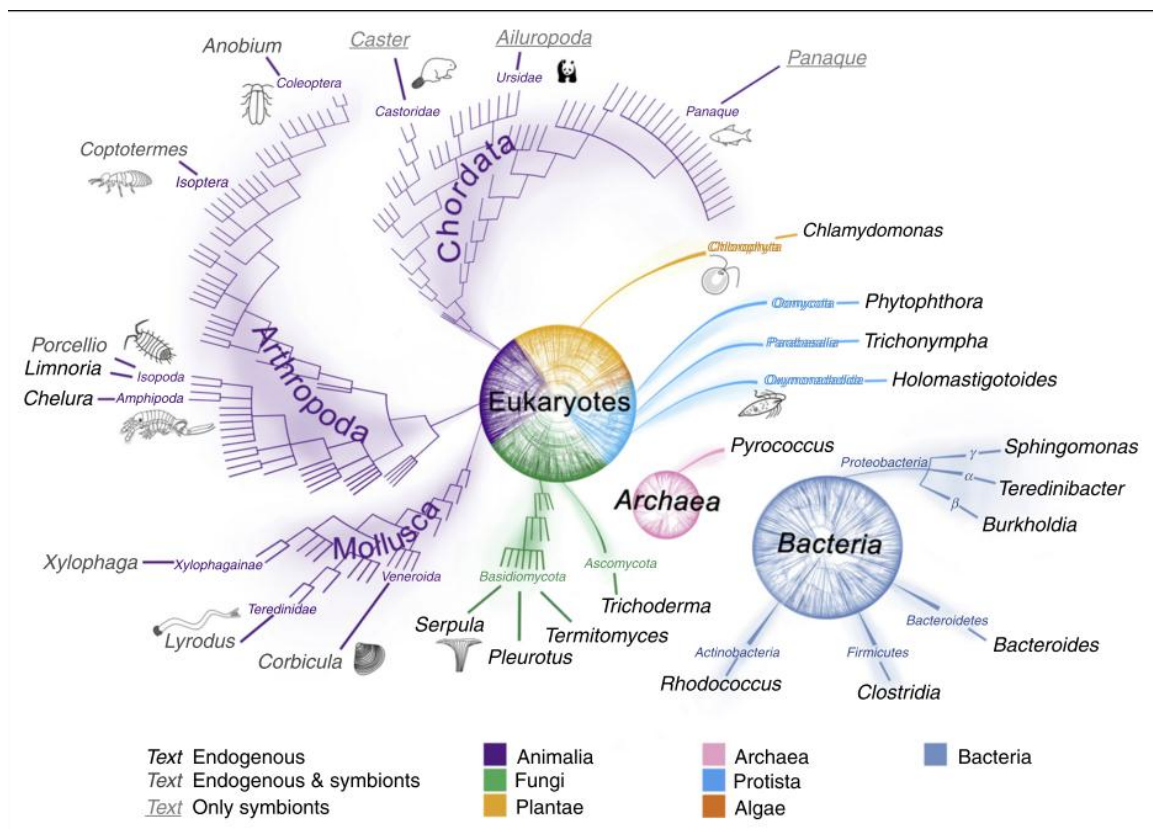


Figura 13- La distribución dispersa y localizada de organismos capaces de degradar lignocelulosa o celulosa en el Árbol de la Vida (Cragg *et al.*, 2015).

Desde el punto de vista industrial las más intensamente estudiadas han sido las enzimas provenientes de bacterias y hongos, en particular el género *Trichoderma* es uno de los más destacados en la producción de celulasas (Bischof, Ramoni y Seiboth, 2016).

## 2.4. Glicosil hidrolasas (GHs)

---

Las glicosil hidrolasas (GHs) constituyen una clase de enzimas que hidrolizan enlaces glicosídicos. Las GH son importantes en el metabolismo de los carbohidratos porque los poli- y oligosacáridos deben dividirse en monosacáridos antes de entrar en la siguiente vía de degradación. Estas enzimas son las más utilizadas en la industria (Eggleston y Vercellotti, 2007).

En general las enzimas se clasifican según una nomenclatura propuesta por la INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY (IUBMB) y se basa en el tipo de reacción que catalizan las enzimas y en su especificidad de sustrato. Para las glicosil hidrolasas (EC 3.2.1.x), los primeros tres dígitos indican enzimas que hidrolizan los enlaces O-glicosídico mientras que el último número indica el sustrato y algunas veces refleja el mecanismo molecular. Esta clasificación es muy útil, especialmente para evitar ambigüedades con el uso de nombres triviales, y proporciona una clasificación única. Sin embargo, al menos en el caso de las glicosil hidrolasas, tal clasificación no refleja necesariamente las características estructurales de las enzimas. De hecho, una clasificación basada principalmente en el sustrato no puede tener en cuenta eventos evolutivos como (i) divergencia (que puede dar lugar a cambios de especificidad y, en ocasiones, de tipo reacción) o (ii) evolución convergente, que puede forzar polipéptidos con diferentes pliegues para catalizar la misma reacción en el mismo sustrato. Otro problema con la clasificación de EC es que no es apropiada para enzimas que muestran amplia especificidad (es decir, que actúan sobre varios sustratos) (Henrissat, Vegetales y Grenoble, 1991). Por lo tanto, Henrissat y col. clasificaron las GHs en familias, según la similitud de la secuencias de aminoácidos de los módulos catalíticos en un intento de obtener una clasificación que fuera complementaria al otro sistema y brindara mayor información (Henrissat, Vegetales y Grenoble, 1991). Las familias de GH se encuentran descritas en una base de datos de Enzimas Activas de Carbohidratos (CAZy) (<http://www.cazy.org/>). En esta base de datos, hasta julio de 2018, hay reportadas unas 153 familias de GH. Algunas de las familias de GH contienen enzimas con un tipo de actividad enzimática, mientras que otras familias contienen enzimas con actividades distintas. En estos casos, se puede aplicar una clasificación adicional en subfamilias. Las subfamilias son subgrupos que se encuentran dentro de una familia que comparten un ancestro más reciente y que, por lo general, son más uniformes en su función catalítica. Las familias de GH se agrupan en clanes cuando entre las familias comparten similitudes significativas en la estructura 3-D, la conservación de residuos catalíticos y el mecanismo catalítico (Henrissat y Bairoch, 1996).

## 2.4.1. Clasificación:

Aparte de clasificar a las GHs en familias, éstas se pueden clasificar teniendo en cuenta otros criterios, algunas de estas posibilidades se detallan a continuación.

### 2.4.1.1. Según configuración anomérica del sustrato:

Los enlaces glicosídicos se pueden clasificar en tipo  $\alpha$  y  $\beta$  en base a la configuración anomérica del C1 del monosacárido que está formando parte del enlace (Wertz, Bédoué y Mercier, 2010). Cada una de las GH conocidas hidrolizan solo una de las formas anoméricas del enlace glicosídico. Las  $\alpha$  - Glicosidasas hidrolizan solo  $\alpha$  - glicósidos y no van a hidrolizar el  $\beta$  -glicósido correspondiente. En la base de datos CAZy, cada familia consta de un solo tipo de GH (ya sea  $\alpha$  o  $\beta$ ) (Grunwald, 2012).

### 2.4.1.2. Según la localización de la unión a hidrolizar:

Las GH se pueden clasificar de acuerdo con su especificidad en exo-activa o endo-activa en función de si hidrolizan desde uno de los extremos (reductor o no reductor) o un enlace interno de la molécula del sustrato. Esta clasificación es especialmente importante en la caracterización de GH que hidrolizan sustratos poliméricos. Las GH exo-activas liberan un monosacárido u oligosacárido con un grado definido de polimerización desde el extremo del polímero. La mayoría de las GH exo-activas actúan sobre el extremo no reductor pero se han encontrado algunas enzimas que actúan sobre el extremo reductor. Las enzimas de acción Endo hidrolizan sustratos poliméricos a nivel interno (Hidaka *et al.*, 2004).

Muchas familias de GH contienen enzimas tanto exo como endo-activas. Por lo tanto, no se consideran evolutivamente distantes. La diferencia entre las acciones de GH endo y exo-activas en determinados casos se explica en términos de la diferencia estructural en el sitio de unión al sustrato. En un estudio realizado por Schubot y colaboradores encontraron que una celulasa de *Clostridium thermocellum* perteneciente a la familia GH9, es exclusivamente exo-activa. Esta familia está compuesta principalmente por endocelulasas, pero por su secuencia se clasifica en esta familia, por lo tanto los autores encontraron por análisis de docking que las enzimas GH9 con actividad interna tienen una ranura continua en el sitio de unión, que está bloqueada en la GH exo-activa como se observa en la Figura 14 (Schubot *et al.*, 2004). Se observa en las imágenes las posiciones del ligando celotetraosa (CTT) y en las Figuras A, B y C se muestran superpuestas a cada estructura las dos regiones de bucle distintivas de GH9\_CbhA de *C. thermocellum* para enfatizar la ausencia de estos elementos estructurales en las otras enzimas y resaltar la topología del sitio activo diferente de la exocelulasa. A diferencia de otros representantes de la familia GH 9 que solo poseen actividad endo y, en algunos casos, actividades endo / exocelulasa, la enzima CbhA de *Clostridium thermocellum* es

exclusivamente una exocelulasa. El análisis detallado de estas estructuras revela que, aunque los residuos catalíticos clave y el pliegue global se conservan en esta enzima y en las de otras glicosido hidrolasas de la familia 9, el sitio activo de GH9\_CbhA se bloquea después del subsitio -2. Esta característica explica la incapacidad del sitio activo de CbhA para acomodar una cadena larga de celulosa y cortarla internamente.

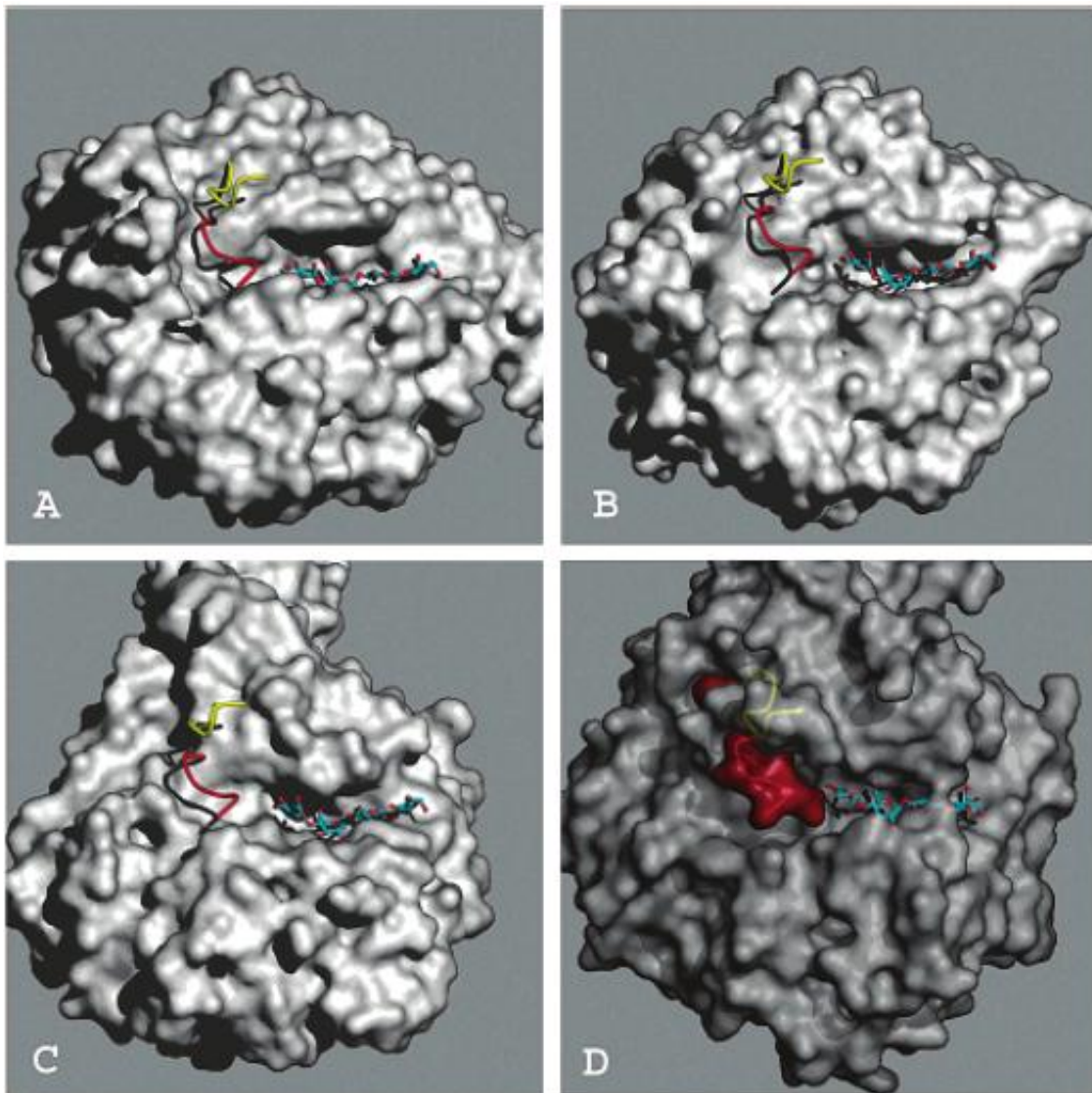


Figura 14- (A-D) Muestra las topologías de la superficie del sitio activo de *T. fusca* Cel9A, *C. cellulolyticum* Cel9M, *C. thermocellum* Cel9A y *C. thermocellum* GH9\_CbhA, todas celulasas pertenecientes a la familia GH9. Las tres primeras son enzimas endoactivas, la última es únicamente exoactiva (Schubot et al., 2004).

Muchas de las enzimas que degradan los polisacáridos de las plantas, son modulares, por lo que tienen un módulo catalítico unido por un péptido pequeño a un módulo de unión a los carbohidratos (CBMs) los cuales en general son cruciales para el reconocimiento y la adhesión al polímero (Boraston *et al.*, 2004).

### 2.4.1.3. Según la retención o inversión anomérica:

Las GH se pueden clasificar en enzimas de retención o inversión de la configuración del carbono anomérico que forma parte del enlace, después de la reacción de hidrólisis. Esta capacidad depende del mecanismo de acción de la enzima en estudio.

#### 2.4.1.3.1. Mecanismo de acción de GHs:

La elucidación del mecanismo de acción se basa en gran medida en el aislamiento y la identificación estructural del intermediario covalente enzima / sustrato. En la mayoría de los casos los residuos implicados en la catálisis enzimática son residuos de ácido glutámico y/o aspártico (Glu o Asp).

##### 2.4.1.3.1.1. Enzimas de retención anomérica:

Generalmente, las enzimas de retención de la configuración catalizan su reacción hidrolítica utilizando dos residuos de aminoácidos ácidos, uno que actúa como el catalizador ácido / base y el otro que actúa como el nucleófilo (McCarter y Withers, 1994). Como se muestra en la Figura 15, el catalizador ácido / base inicialmente actúa como un ácido donando un protón al átomo de oxígeno del carbono anomérico, el nucleófilo entonces, ataca el carbono anomérico para liberar el alcohol y forma un intermediario unido covalentemente con inversión anomérica. Luego, el intermediario se hidroliza mediante una molécula de agua previamente desprotonada por el catalizador ácido / base, que actúa como base para finalizar la reacción de hidrólisis, y forma un nuevo extremo reductor con la misma configuración anomérica que tenía antes de la reacción. Se producen dos inversiones anoméricas durante la reacción de las GH de retención de configuración.

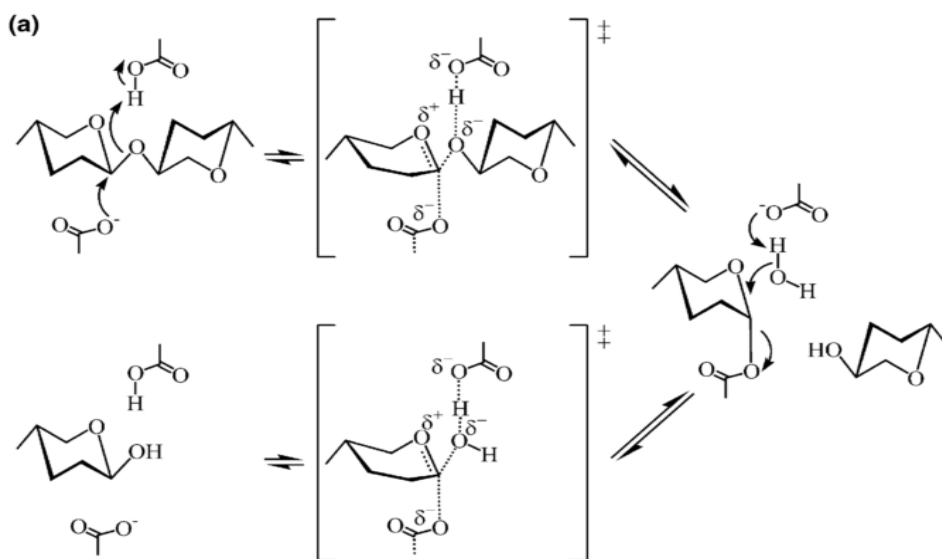


Figura 15- Mecanismo de acción de GH con retención anomérica (Collins, Gerday y Feller, 2005).

### 2.4.1.3.1.2. Enzimas de inversión anomérica:

Las GHs de inversión anomérica catalizan su reacción con dos residuos de aminoácidos ácidos, uno que actúa como ácido y el otro como base (McCarter y Withers, 1994) (Figura 16). El mecanismo se parece a la primera mitad del mecanismo de acción de retención típica de GH. El residuo ácido dona un protón al oxígeno del carbono anomérico del glicósido para ser hidrolizado. Una molécula de agua desprotonada por el residuo básico ataca al carbono anomérico (actuando como nucleófilo) para terminar la hidrólisis con inversión anomérica (Nagae *et al.*, 2007).

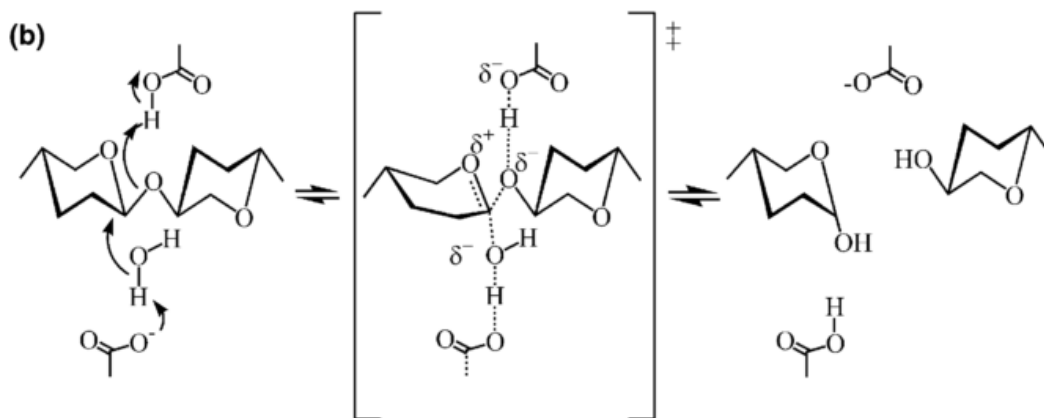


Figura 16- Mecanismo de acción de GH con inversión anomérica (Collins, Gerday y Feller, 2005).

## 2.4.2. GHs que degradan celulosa – CELULASAS

En comparación con otros polímeros vegetales, la estructura de la celulosa es relativamente simple. Sin embargo, la degradación enzimática de la celulosa no es fácil debido a su estructura cristalina, y su capacidad de formar microfibrillas estrechamente empaquetadas evitando el acceso a las enzimas hidrolíticas. Pero aun así, existen microorganismos que viven de la celulosa como fuente de carbono, esto es posible gracias al sistema enzimático celulolítico conocido como celulasas (Wertz, Bédué y Mercier, 2010).

Las celulasas incluyen tres clases de enzimas: endoglucanasas (EG), exoglucanasas / celobiohidrolasas (CBH) y  $\beta$ -glucosidasas (BGL). Las EG hidrolizan los enlaces glicosídicos internos de la celulosa, mientras que las exoglucanasas actúan en los extremos de la cadena de la celulosa. Después de esta hidrólisis endo y exo inicial, los oligosacáridos restantes, principalmente la celobiosa, se hidrolizan a moléculas de glucosa individuales por  $\beta$ -glucosidasas (Ramawat y Mérillon, 2015).

Mientras que algunos microorganismos producen enzimas libres con unidades catalíticas únicas capaces de difundir y actuar de forma independiente (Figura 17), otros pueden

organizar las enzimas celulolíticas en estructuras de múltiples dominios. Por ejemplo, algunas bacterias y hongos del rumen emplean una estructura conocida como celulosoma grande y multimodal con muchas unidades catalíticas ancladas en un “andamio” que está adherido a la célula (Figura 18) (Bayer *et al.*, 2004). Algunas enzimas usan una estrategia intermedia entre estas 2 opciones en donde una sola proteína es multimodular, contiene más de un dominio catalítico y de unión como es el caso encontrado en la bacteria del rumen *Caldicellulosiruptor bescii* (Brunecky *et al.*, 2013)



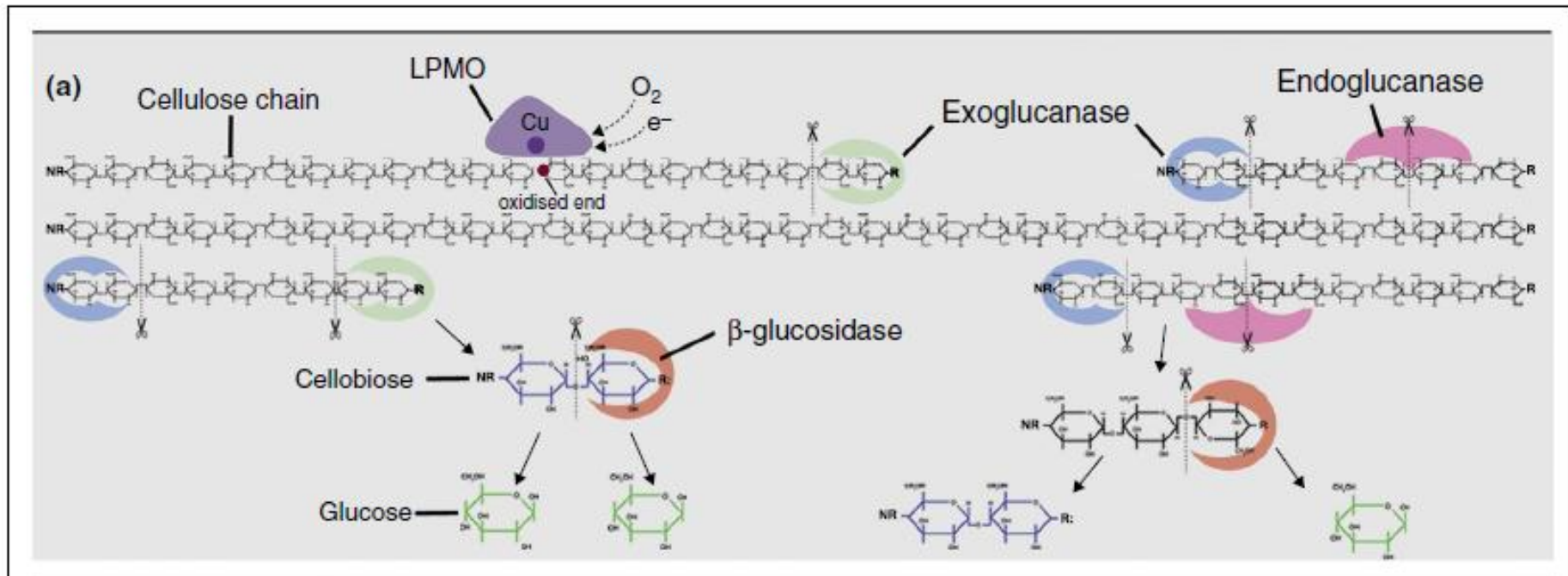


Figura 17- Esquema de mecanismos microbianos de degradación de celulosa. Sistema de celulasa libre de microorganismos aerobios. La celulosa se hidroliza a través de la interacción sinérgica de enzimas secretadas individuales. NR-, extremos no reductores; -R, extremos no reductores (Cragg *et al.*, 2015).

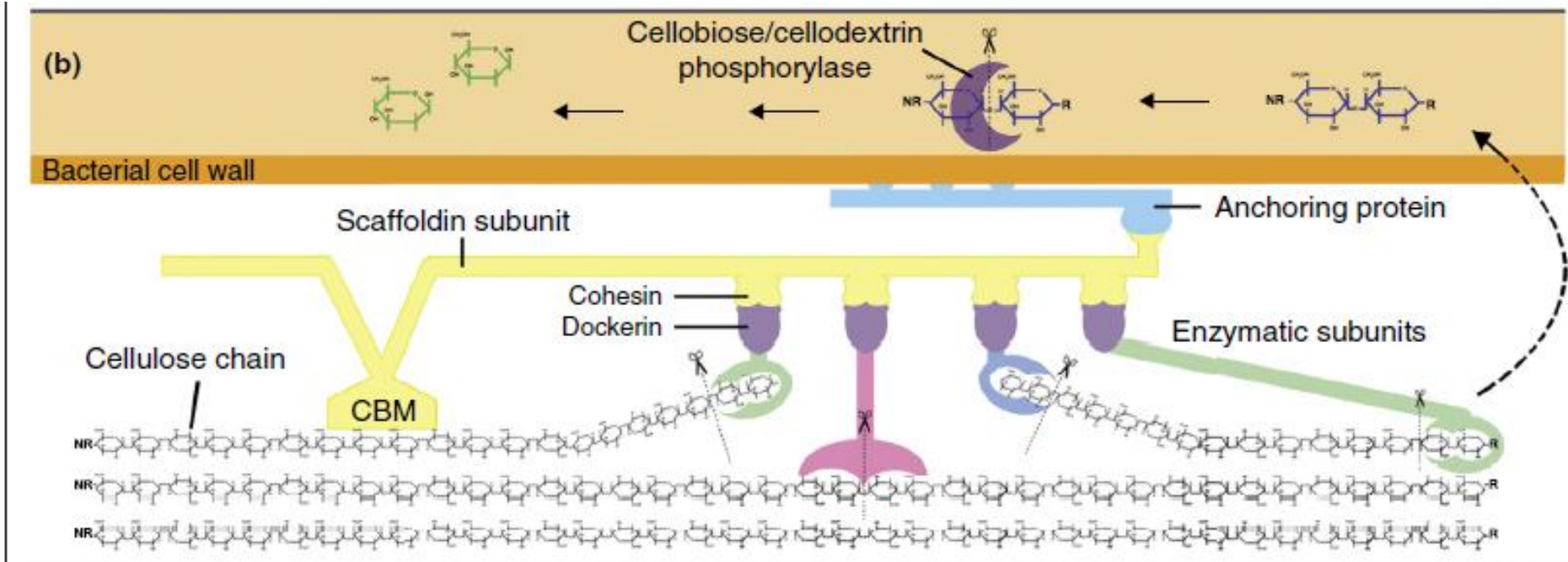


Figura 18- Esquema de mecanismos microbianos de degradación de celulosa. Mecanismo anaeróbico 'celulosoma' es un complejo unido a la pared celular microbiana a través de una subunidad de anclaje. El complejo consiste en enzimas capaces de hidrolizar la celulosa, unidas a una subunidad de andamio que ancla la célula bacteriana y las enzimas al sustrato a través de un módulo de unión de carbohidratos (CBM) (Cragg *et al.*, 2015).

Los géneros en los cuales se han reportado sistema de celulasa libre incluyen *Bacillus* spp. (Hero *et al.*, 2017), *Paenibacillus* spp. (Talia *et al.*, 2012), *Thermobifida fusca* (anteriormente *Thermomonospora*) (Quiroz-Castañeda y Folch-Mallol, 2013) y *Cellulomonas* spp. (Kane, 2015). Dentro de los hongos más utilizados a nivel industrial que producen celulasas extra-celulares se encuentran *Trichoderma reesei* y *Aspergillus nidulans* (Cragg *et al.*, 2015; Bischof, Ramoni y Seiboth, 2016).

#### 2.4.2.1. Endoglucanasas

Endo- $\beta$ -1,4-glucanasas (EC 3.2.1.4) hidrolizan al azar los enlaces glicosídicos  $\beta$ -1,4 entre dos moléculas de D-glucosa dentro de las regiones amorfas de cadenas de celulosa. Esto genera oligosacáridos más cortos de diferentes longitudes, lo que la hace más accesible para las diferentes exoglucanasas al proporcionar nuevos extremos de cadena libre (Grunwald, 2012). La mayoría de los hongos y bacterias celulolíticos producen numerosas EG. Los sitios activos de la mayoría de las EGs tienen forma de hendidura o ranura, dentro de los cuales un segmento de celulosa puede unirse e hidrolizarse por la enzima (Sweeney y Xu, 2012). A pesar de que todas las EG que pueda producir un microorganismo actúan sobre el mismo sustrato, la existencia de un gran número se debe a que actúan según diferentes mecanismos sobre la celulosa (reteniendo o invirtiendo la configuración) o que pueden tener más de una actividad, por ejemplo, degradar hemicelulosa (Vlasenko *et al.*, 2010).

En la base de datos de enzimas activas sobre carbohidratos (CAZy [www.cazy.org](http://www.cazy.org)) (Henrissat, Vegetales y Grenoble, 1991), las endoglucanasas se encuentran en las familias GH 5-8, 12, 16, 44, 45, 48, 51, 64, 71, 74, 81, 87, 124 y 128. En particular, las endo- $\beta$ -1,4-glucanasas fúngicas pertenecen a familias 5, 7, 12, 45 y 61 (Coutinho *et al.*, 2009).

#### 2.4.2.2. Exoglucanasas / Celobiohidrolasas

La exoglucanasas o celobiohidrolasas (CBH), actúan en los extremos de las cadenas de celulosa y liberan glucosa y celobiosa como productos principales. Actúan unidireccionalmente en los oligómeros de cadena larga, ya sea desde los extremos reductores (E.C. 3.2.1.176) o no reductores (E.C. 3.2.1.91) liberando celobiosa. Estas enzimas son capaces de actuar en las regiones cristalinas de la celulosa.

La estructura del módulo catalítico es de tipo túnel, formada por dos bucles de superficie que pueden cubrir la totalidad o parte del sitio activo. Durante la catálisis enzimática, la cadena de celulosa se desliza a través del túnel de unión al sustrato y cada dos enlaces glicosídico el polímero, se coloca correctamente sobre el sitio catalítico ubicado en el extremo del túnel para liberar progresivamente unidades de disacáridos (celobiosa) de la celulosa. En general un módulo de unión a los carbohidratos (CBM) asiste al módulo

catalítico en su función (Sweeney y Xu, 2012). Las CBH se encuentran en las familias de GH 5-7, 9, 48 y 74 (Carro *et al.*, 2016).

#### 2.4.2.3. $\beta$ -Glucosidasas (BGL)

Las  $\beta$ -glucosidasas son las enzimas finales en la degradación de la celulosa. Después de las hidrólisis endo y exo- de las cadenas de celulosa, las BGL (EC 3.2.1.21) degradan los oligosacáridos restantes a glucosa (Carro *et al.*, 2016). La mayoría de las BGLs son enzimas intracelulares. Sin embargo, se han reportado asociadas a la membrana, como en el caso de la BGL de la arquea *Pyrococcus horikoshii* bgl (GH1). Esto se demostró al expresar el gen que codifica esta enzima en una cepa de *E. coli* (Matsui *et al.*, 2000). Otras pueden encontrarse en el espacio periplásmico, como la enzima bifuncional (bglA GH1) con actividad BGL y CBH, proveniente del genoma de *Bacillus subtilis* y expresada y estudiada en una cepa de *E. coli* (Srivastava, Verma y Srivastava, 1999). Algunas BGLs pueden ser extracelulares como las del hongo *Aspergillus niger* bgl1 (GH1) (Dan *et al.*, 2000), *Trichoderma reesei* bgl1 (GH3) bgl2 (GH1) (Barnett, Berka y Fowler, 1991). Estas enzimas extracelulares son de particular interés porque sus costos de producción son menores (Carro *et al.*, 2016).

A diferencia de las EGs y las CBHs, las BGLs en general no son modulares, les falta el módulo de unión de carbohidratos, y tienen un sitio catalítico con forma de bolsillo (Langston, Sheehy y Xu, 2006).

#### 2.4.2.4. Otros mecanismos de degradación de la celulosa

Estudios recientes han demostrado la existencia de enzimas que realizan un proceso oxidativo para la escisión de enlaces de polisacáridos (Vaaje-Kolstad *et al.*, 2010); estas enzimas se han denominado monooxigenasas degradadoras de polisacáridos (LPMO en inglés). Las mismas actuarían aumentando la accesibilidad de las otras enzimas hidrolíticas a la celulosa. Las LPMO que degradan la celulosa se asignan a la familia de enzimas auxiliares AA 9, (enzimas fúngicas), y la familia AA10 enzimas predominantemente bacterianas. Las LPMO pueden actuar sobre la celulosa cristalina (Beeson *et al.*, 2015), y también sobre las hemicelulosas (Agger *et al.*, 2014). Actúan por ataque oxidativo directo sobre las cadenas de polímero (Figura 17) a través de un sitio activo plano con un átomo de cobre ubicado en el centro.

Se han estudiado las modificaciones de la estructura de la celulosa a diferentes escalas y se ha descubierto que la LPMO crean puntos de corte que desencadenan la desintegración de la estructura fibrilar de la celulosa con la ruptura de cadenas y la liberación de nanofibrillas. La rotura de las cadenas probablemente induce modificaciones de la red de celulosa y debilita la cohesión de las fibras promoviendo su

disrupción y por lo tanto, favoreciendo la formación de nuevos sitios de iniciación para las celulasas convencionales (Villares *et al.*, 2017).

También se ha demostrado la deconstrucción no enzimática de la celulosa, incluidas las reacciones de oxidación de Fenton dependientes del hierro que se han reportado en los hongos de la pudrición marrón de la madera (Baldrian y Valášková, 2008). Varios autores han propuesto el modelo del mecanismo de degradación que estos hongos utilizan para degradar el material lignocelulósico (Figura 19).

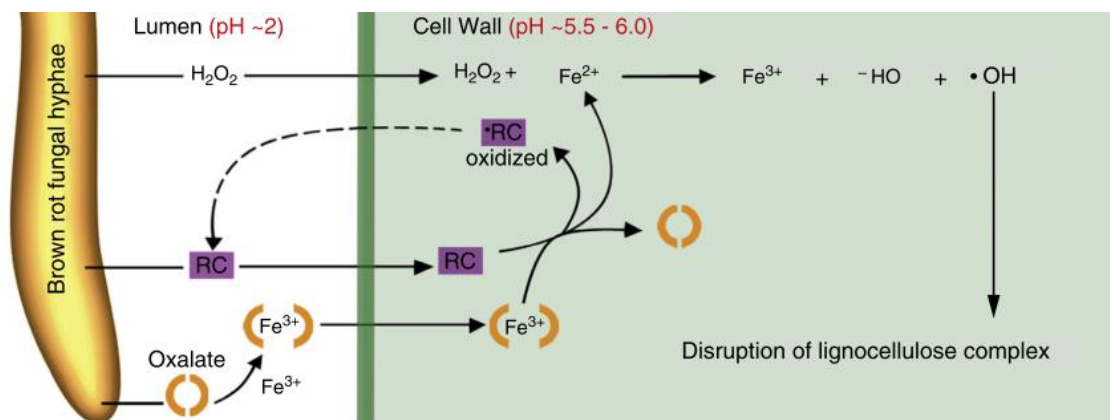


Figura 19- Ruptura del material lignocelulósico por hongos de pudrición marrón usando el sistema Fenton mediado por quelante (Cragg *et al.*, 2015).

De forma simplificada se podría explicar que las hifas fúngicas en la luz de las células vegetales producen compuestos aromáticos reductores de hierro de bajo peso molecular (RC), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y ácido oxálico. El ácido oxálico se une al  $Fe^{3+}$  formando un complejo que difunde por la pared celular vegetal junto con  $H_2O_2$  y RC. Con el cambio de pH, RC secuestra  $Fe^{3+}$  del complejo Fe-oxalato y lo reduce a  $Fe^{2+}$ . El  $Fe^{2+}$  luego reacciona con  $H_2O_2$  (reacción de Fenton) y produce radicales hidroxilo ( $\bullet OH$ ). Tras el ataque de radicales OH, la matriz de lignocelulosa se rompe. Estos compuestos a diferencia de las enzimas, son de bajo peso molecular y por lo tanto pueden ingresar a la matriz de la pared celular vegetal. En la descomposición, los principales cambios son la ruptura de enlaces glicosídicos en la celulosa y hemicelulosa y la desmetilación de la lignina y posterior (Kerem, Jensen y Hammel, 1999; Arantes y Goodell, 2014).

#### 2.4.2.5. Otras aplicaciones industriales de las celulasas

Aparte del uso de celulasas en la hidrólisis de residuos lignocelulósicos bajo el paradigma de la biorrefinería, estas enzimas tienen un amplio espectro de aplicaciones en la producción de alimentos ya sea para humanos o animales, la industria cervecera, producción de detergentes, procesamiento de textiles y fabricación de pasta de papel (Juturu y Wu, 2014).

En el caso de la industria textil, las celulasas son efectivas para eliminar la vellosidad de los hilos de celulosa que se usan en la producción de textiles desarrollando una apariencia lisa y brillante de la tela e impartiendo brillo. En la producción de detergentes, la adición de celulasas al cóctel enzimático que contiene, lipasas y proteasas es una tendencia utilizada en los últimos años (Kuhad, Gupta y Singh, 2011). Las celulasas alcalinas (con actividad óptima a pH alcalino) presentes en los detergentes pueden atravesar fácilmente los espacios interfibrilares y ayudar a eliminar eficazmente las manchas de las telas (Souza *et al.*, 2016; Ben Hmad y Gargouri, 2017).

Las celulasas tienen amplias aplicaciones en la industria de alimentos. En combinación con otras enzimas (xilanasas y pectinasas), conocidas colectivamente como enzimas de maceración, se han usado en la extracción y clarificación de jugos de frutas y vegetales para aumentar sus rendimientos de maceración y mejoran la clarificación y filtrado de los jugos (Kallel *et al.*, 2016). Las enzimas utilizadas en la maceración reducen la viscosidad; mejoran la estabilidad de la suspensión y las propiedades aromáticas de los jugos de fruta y sus pulpas durante el procesamiento (Eggleston y Vercellotti, 2007).

Las celulasas junto con las hemicelulasas se usan en la producción de alimentos para animales y aves de corral. La adición de enzimas durante el procesamiento del alimento produce la hidrólisis parcial de los componentes de celulosa y hemicelulosa presentes en el ensilado. El alimento parcialmente digerido después de entrar en la vía digestiva de los animales es digerido de manera más completa, proporcionando más nutrientes y, por lo tanto, un mejor crecimiento de los animales (Gilbert y Hazlewood, 1993).

### 2.4.3. Sistema xilanolítico

Para la hidrólisis eficiente de la biomasa lignocelulósica, se requieren además de las celulasas otras enzimas con acción sinérgica para eliminar la hemicelulosa. Gran parte de las hemicelulosas consiste en estructuras con una cadena principal de D-xilosa unida por enlace  $\beta$ -1,4 conocidas como xilano. La degradación de estas cadenas principales de xilano requiere dos clases de enzimas. Las endoxilanasas (XLN) (EC 3.2.1.8) que hidrolizan cadenas de D-xilosa en oligosacáridos pequeños, que luego son hidrolizados a moléculas de D-xilosa por  $\beta$ -xilosidasas (BXL) (Figura 19) (Ali El Enshasy *et al.*, 2016). Sin embargo, la mayoría de las estructuras de xilano en las plantas están muy sustituidas y, por lo tanto, se necesita un conjunto de diferentes enzimas accesorias para lograr una degradación eficiente. En el caso del xilano del *Eucalyptus*, el mismo está acetilado y tiene como sustituyente ácido 4-O-metil-glucurónico (MeGlcA), por lo tanto, deberán actuar enzimas de tipo acetil esterasas (EC 3.1.1.72) y glucuronidasas (EC 3.2.1.131) (Grunwald, 2012).

Al igual que el resto de las glicosilhidrolasas, las xilanasas se clasifican según la estructura primaria del dominio catalítico, y en general se reportan endo-xilanasas de las familias

GH 10 y GH 11. Sin embargo se encuentran enzimas con actividad xilanasas pertenecientes a las familias GH 3, 5, 8, 9, 12, 16, 26, 30, 43, 44, 51, 62, 98, 141 dentro de las cuales se incluyen enzimas con actividad glucosidasa, carragenasa (enzima que hidroliza el carragenano un polisacárido sulfatado encontrado en las algas rojas), arabinofuranosidasa, fucosidasa, entre otras (Collins, Gerday y Feller, 2005; Lombard *et al.*, 2014). Se han reportado  $\beta$ -xilosidasas en las familias GH 1, 3, 5, 30, 39, 43, 51, 52, 54, 116 y 120 (Lombard *et al.*, 2014). Dada la complejidad de las distintas hemicelulosas se evidencia la necesidad de todo un complejo enzimático para poder degradar el polímero completo. Se han propuesto distintos modelos de degradación enzimática, el más aceptado es el propuesto por Biely y colaboradores en el 2016 (Biely, Singh y Puchart, 2016).

El modo de hidrólisis de glucuronoxilano por las enzimas GH10 y GH11 difiere principalmente en la forma de aceptar y reconocer los sustituyentes MeGlcA en el proceso de formación de los complejos enzima-sustrato. Las xilanasas GH10 requieren dos restos Xilp no sustituidos consecutivos para atacar la cadena principal de xilano, y además son capaces de escindir el enlace glicosídico del residuo de Xilp sustituido con MeGlcA. Se ha reportado también que las GH10 pueden liberar xilosa a partir de oligosacáridos más pequeños producto de hidrólisis anteriores (Collins, Gerday y Feller, 2005; Kolenová, Vrsanská y Biely, 2006). Las xilanasas de GH11 requieren tres restos de Xilp no sustituidos en la cadena de Xilano e hidrolizan el enlace glicosídico un residuo de Xilp antes del Xilp sustituido con MeGlcA (Figura 20). Por estas razones, las xilanasas GH10 generan productos con un residuo menos de Xilp que las xilanasas GH11.

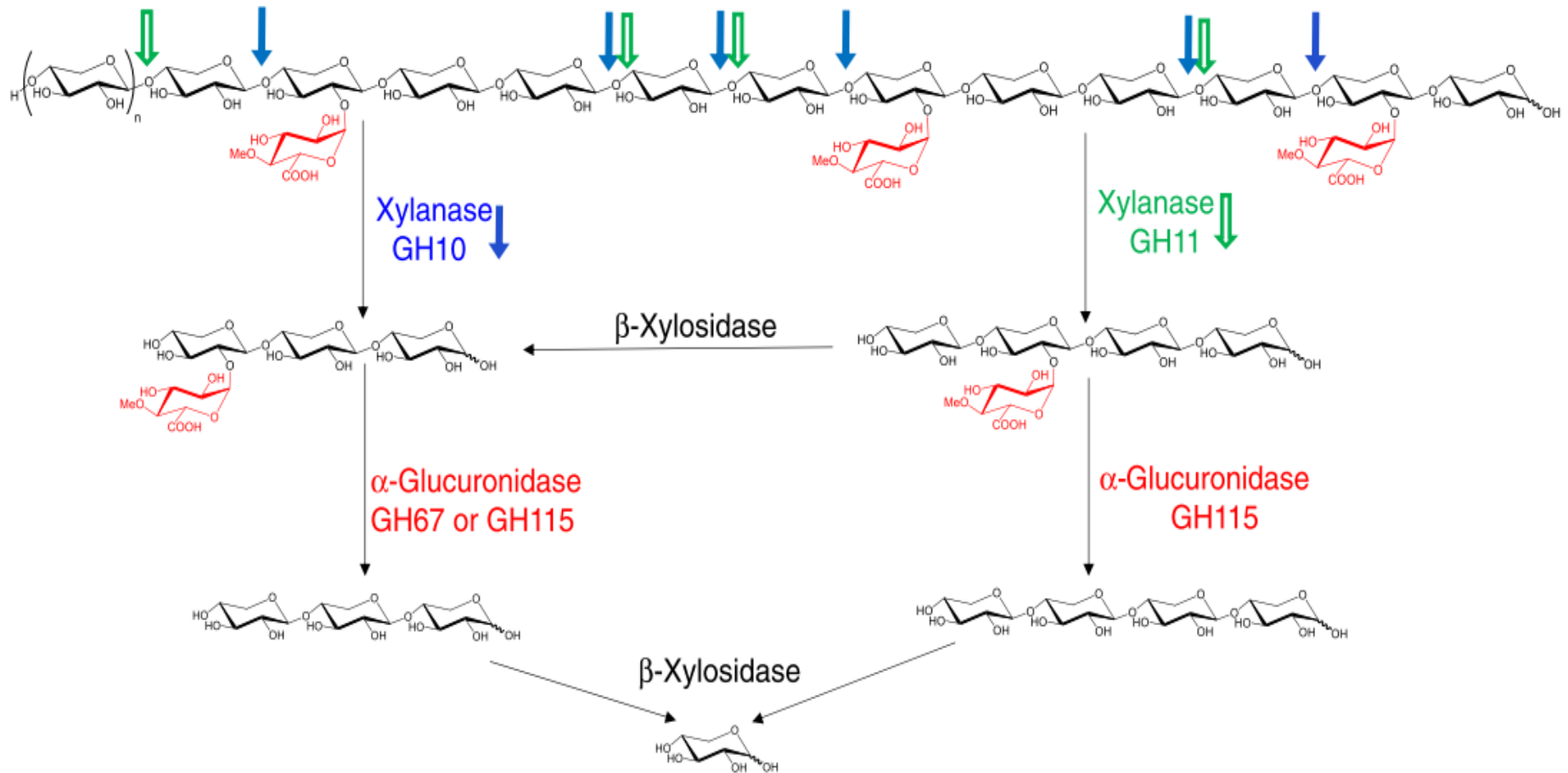


Figura 20- Modelo propuesto de despolimerización de glucuronoxilano (Biely, Singh y Puchart, 2016).



El enlace  $\alpha$ -1,2 de MeGlcA a la cadena principal de Xilp es uno de los enlaces glicosídicos más estables en las paredes celulares de la planta. La unión MeGlcA- $\alpha$ -1,2-Xyl persiste en el hidrolizado ácido del glucuronoxilano. Afortunadamente, las enzimas que cortan este enlace se han encontrado en sistemas xilanolíticos de microorganismos (Dekker, 1983). Se conocen como  $\alpha$ -glucuronidasas y hasta ahora se han reconocido dos tipos de  $\alpha$ -glucuronidasas microbianas. Las más conocidas son las clasificadas en la familia GH67. Los miembros de esta familia pueden liberar MeGlcA solo de oligosacáridos que tienen el ácido urónico sobre el residuo Xilp en el extremo no reductor. Estas enzimas no pueden desramificar polisacáridos u oligosacáridos en los que MeGlcA está unido a restos internos de Xilp (Biely *et al.*, 2000; Zaide *et al.*, 2001). El segundo tipo de  $\alpha$ -glucuronidasa se encuentra clasificada en la familia GH115. Estas además de la capacidad de catalizar la misma reacción que las enzimas GH67, también liberan MeGlcA unido a residuos internos de Xilp en oligo y polisacáridos (Tenkanen y Siika-aho, 2000). Las enzimas GH115, a diferencia de las enzimas GH67, poseen una hendidura que puede acomodar residuos de Xilp a ambos lados del sustituyente lateral MeGlcA (Wang *et al.*, 2016) (Figura 20).

La acetilación del xilano (como ocurre en el caso del *Eucalyptus*) hace que el polisacárido sea más resistente al ataque de las xilanasas. Algunas estructuras en las que la sustitución de MeGlcA se combina con la acetilación del grupo hidroxilo vecino, parecen ser las más recalcitrantes. Las xilanasas atacan al polisacárido solo en las regiones que no están sustituidas, algunas xilanasas toleran el grupo acetilo en la posición 2 o 3 (este aspecto del modo de acción de las xilanasas queda aun por elucidar). La xilanasas GH10 puede tolerar los grupos acetilo en el subsitio + 1 y también en el subsitio -2, pero solo si se encuentra en la posición O-3 (Fujimoto *et al.*, 2004) (Figura 21).

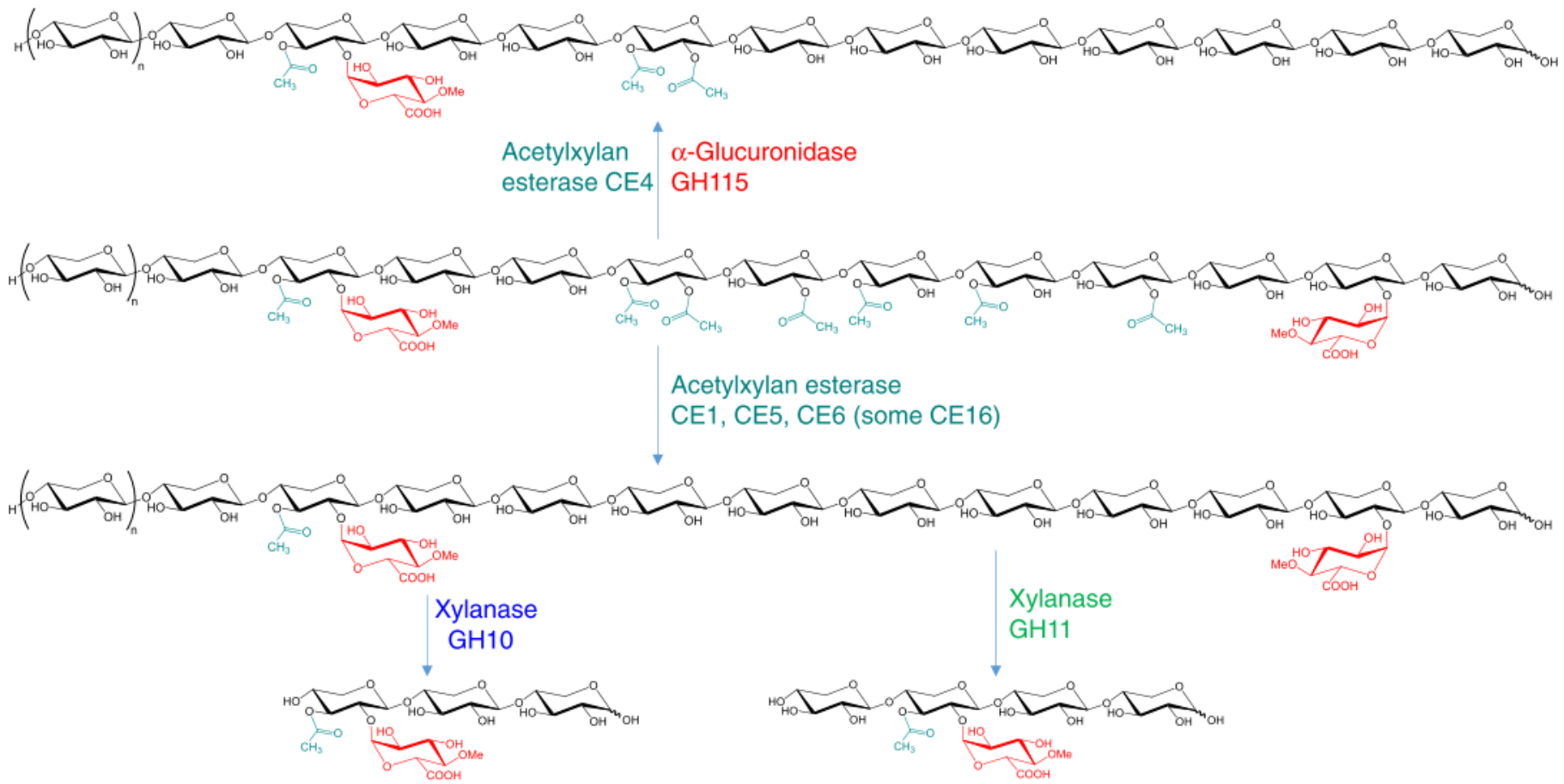


Figura 21- Modelo propuesto para la despolimerización de acetil glucuronoxilano (Biely, Singh y Puchart, 2016).

Los xilooligosacáridos lineales no se pueden hidrolizar a fragmentos más cortos porque la presencia del grupo acetilo en cualquiera de las tres posiciones del resto Xilp del extremo no reductor bloquea la acción de la  $\beta$ -xilosidasa. Entonces ambos tipos de xilanasas (GH 10 y GH11) generan a partir de glucuronoxilano acetilado una serie de oligosacáridos ácidos largos con un número diferente de grupos acetilo que alcanza casi el número de residuos Xilp.

Con excepción de una pequeña cantidad de xilobiosa, los hidrolizados esencialmente no contienen fragmentos no acetilados (Biely *et al.*, 2004). La adición de  $\alpha$ -glucuronidasa de GH67 o GH115 a una mezcla de xilanasas y  $\beta$ -xilosidasa provocaría solo pequeños cambios en el rendimiento de sacarificación de acetilglucuronoxilano, ya que los fragmentos de xilano permanecerían todavía esterificados con ácido acético. Por lo tanto, en oligosacáridos desglucuronilados, la acción de la  $\beta$ -xilosidasa se detendría en el primer residuo de Xilp acetilado del extremo no reductor. Resulta claro que la sacarificación enzimática no puede proceder hasta el final sin la desacetilación de xilooligosacáridos por las enzimas acetilxilanoesterasas (Biely, Singh y Puchart, 2016)..

Estas son las enzimas que liberan las posiciones 2 y 3 que están esterificadas con ácido acético en residuos de Xilp mono y di-O-acetilados en polisacáridos y oligosacáridos. Estas enzimas hacen que la cadena principal de xilano sea accesible para xilanasas y  $\beta$ -xilosidasa. Las enzimas que muestran esta capacidad se han clasificado mayoritariamente en familias de esterasas de carbohidratos (CE) 1, 4, 5 y 6 (Biely *et al.*, 2013; Neumuller *et al.*, 2015). Las acetilxilano esterasas de la familia CE4 difieren del resto al requerir la desacetilación de la posición 2 o 3 y un grupo hidroxilo vecinal libre, lo que significa que las acetilxilano esterasas CE4 no atacan los residuos de Xilp doblemente acetilados. Ninguna de las enzimas en las cuatro familias mencionadas (CE1, CE4, CE5 y CE6) puede desacetilar la posición 3 en residuos de Xilp sustituidos con MeGlcA, éste representa una barrera estérica para las esterasas (Uhliarikova *et al.*, 2013) (Figura 21).

Recientemente se observó una nueva actividad en un sustrato polimérico, capaz de desacetilar estos XOS de Xilp sustituidos con MeGlcA, es la acetil esterasa clasificada en una nueva familia, CE16 de *Trichoderma reesei* (Puchart *et al.*, 2016).

Por lo tanto para lograr la despolimerización de los xilanos similares a los encontrados en el *Eucalyptus* es necesario que la endoxilanasas se acompañe de la acción de  $\beta$ -xilosidasa,  $\alpha$ -glucuronidasa, acetil xilano esterasas actuando todas de manera sinérgica (Biely, Singh and Puchart, 2016).

El sistema xilanolítico se ha reportado en una gran diversidad de organismos incluyendo plantas como en el caso de la semilla de la cebada y el polen del maíz (Banik, Garrett y Fincher, 1996; Bih *et al.*, 1999) y animales (Ni y Tokuda, 2013). Sin embargo las más reportadas han sido en bacterias (Chakdar *et al.*, 2016), actinobacterias (Pennacchio *et al.*, 2018), hongos filamentosos y levaduras (Sharma y Kumar, 2013).

#### 2.4.3.1. Endoxilanasas (EC 3.2.1.8)

Se ha reportado que una cepa puede producir múltiples xilanasas. Estas pueden tener diferentes propiedades fisicoquímicas, estructura, actividad específica, para mejorar la eficiencia y el grado de hidrólisis (Gilbert y Hazlewood, 1993). Además de la multiplicidad de las xilanasas, varias presentan más de un dominio que apoyan a su actividad, por ejemplo presentan dominios de unión al xilano, dominio de unión a la celulosa y dominio de unión a los celulosomas. Estos dominios se pliegan y funcionan de forma independiente y están unidos mediante regiones cortas (Irwin, Jung y Wilson, 1994; Black *et al.*, 1996, 1997; Hayashi *et al.*, 1997). La mayoría de las XLN son extracelulares debido a que su sustrato es demasiado grande para ingresar a la célula.

Dentro de la familia GH10, se incluyen principalmente endo- $\beta$ -1,4-xilanasas, y en menor medida  $\beta$ -1,3-xilanasas y celobiohidrolasas. El espectro de sustratos que aceptan las enzimas de esta familia es amplio, ya que pueden hidrolizar varias formas de xilano diferentes, con variables grados de ramificación y sustituciones y cadena principal formada por monosacáridos distintos a la xilosa (Kolenová, Vrsanská y Biely, 2006). En general estas enzimas tienen un peso molecular alto y su dominio catalítico tiene forma cilíndrica y lateralmente tiene forma de bowl (Collins, Gerday y Feller, 2005) esto generaría mayor flexibilidad conformacional y explicaría la menor especificidad de sustrato de las GH10 sobre las GH11 (Sharma y Kumar, 2013).

En el caso de la familia GH11, únicamente compuesta por endoxilanasas, su versatilidad catalítica es menor que las de la familia GH10 y son mayoritariamente activas en xilooligosacáridos de cadena larga. Preferiblemente escinden las regiones no sustituidas de la cadena principal, como se describió anteriormente. Las endo-1,4- $\beta$ -xilanasas de GH11 son más pequeñas y están bien empaquetadas con una organización de láminas  $\beta$  y forman una hendidura en la que se acomoda una cadena de cinco a siete residuos de xilosa y los productos principales son xilobiosa y xilotriosa que pueden ser posteriormente hidrolizados por las xilanasas de la familia GH10 o por  $\beta$ -xilosidasas (Hakulinen *et al.*, 2003).

Las xilanasas siguen los mecanismos catalíticos, ya explicados, de retención o inversión de la configuración. La mayoría de las xilanasas estudiadas son de origen fúngico o bacteriano y en la mayoría de los casos en general son activas a temperaturas de 40 – 60

°C y a pH neutro (en el caso de las de origen bacteriano) o ácido (particularmente en las de origen fúngico) (Borges *et al.*, 2014; Bagewadi, Mulla y Ninnekar, 2016; Liu *et al.*, 2018). Sin embargo se han reportado xilanasas que son estables y activas en condiciones extremas de pH (Akhavan Sepahy, Ghazi y Akhavan Sepahy, 2011) y temperatura (Liebl *et al.*, 2008; Duarte *et al.*, 2018).

#### 2.4.3.2. $\beta$ -xilosidasas (BXS)

Las  $\beta$ -xilosidasas son glicosilhidrolasas que catalizan la hidrólisis de la xilobiosa y otros pequeños xilooligosacáridos con la liberación de xilosa. Estas enzimas son de suma importancia en la hidrólisis del xilano, debido a que las endoxilanasas son inhibidas por los pequeños xilooligosacáridos formados por ellas mismas (de Vargas Andrade *et al.*, 2004). Las  $\beta$ -xilosidasas (EC 3.2.1.37) purificadas usualmente no hidrolizan el polímero de xilano y su afinidad por los XOS es inversamente proporcional a la complejidad de éstos y se encontró que la xilobiosa es el mejor sustrato para estas enzimas (Carro *et al.*, 2016).

Tienen pesos moleculares altos de 60 a 260 kDa, y dependiendo de su origen, el pH óptimo es entre 4.0 y 5.0 con temperaturas óptimas de 40 a 80 °C en el caso de las enzimas fúngicas (Rizzatti *et al.*, 2001; Mhetras, Liddell y Gokhale, 2016; Terrasan, Guisan y Carmona, 2016). Por otro lado aquellas  $\beta$ -xilosidasas de origen bacteriano muestran actividades óptimas a pH más neutros alrededor de pH 6 y 6.5 y temperaturas mayores (70–90 °C) (Shao *et al.*, 2011; Shi *et al.*, 2013; Bhalla, Bischoff y Sani, 2014; Li *et al.*, 2018). Muchas BXS tienen además actividad  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa (Sweeney y Xu, 2012).

En los hongos filamentosos en general estas enzimas se encuentran en el micelio o en menor medida liberadas al medio de cultivo, las BXS de bacterias y levaduras en general están asociadas a las membranas (Polizeli *et al.*, 2005). Sin embargo se reportó una BXS extracelular en una cepa de *Pseudozyma hubeiensis* (Mhetras, Liddell y Gokhale, 2016).

#### 2.4.3.3. Otras aplicaciones de las xilanasas

Al igual que las celulasas, las xilanasas son de interés en varias industrias. Se utilizan en conjunto con celulasas y pectinasas en la industria alimentaria y agrícola. En la industria papelera, para la etapa del blanqueo de la pulpa, permitiendo un importante ahorro de las sustancias químicas empleadas en el proceso y disminuyendo la producción de contaminantes (Harris y Ramalingam, 2010; Valls *et al.*, 2011).

Otras aplicaciones incluyen su uso en productos de panificación como el pan, con el fin de degradar las hemicelulosas del trigo, lo que aumenta la absorción de agua por la masa en el momento del leudado. Este efecto ayuda a la redistribución del agua y por lo tanto deja a la masa más suave y manejable para amasar (Harris y Ramalingam, 2010). Las xilanasas se usan generalmente en la producción del pan para mejorar formación de la

miga, mejorando las propiedades reológicas de la masa y la calidad total del pan (Messia *et al.*, 2016). Otros estudios muestran que la incorporación de las xilanasas en la masa aumenta la vida útil del pan formado y el volumen (Butt *et al.*, 2008; Serventi, Skibsted y Kidmose, 2016). La aplicación de las xilanasas en la industria farmacéutica, hasta la actualidad es bastante limitada, sin embargo se han utilizado en algunos suplementos dietéticos en combinación con otras enzimas (Moure *et al.*, 2006).

#### 2.4.4. Producción de celulasas y xilanasas

Al procesar grandes cantidades de biomasa lignocelulósica, los costos de los pasos de conversión de biomasa, especialmente el pretratamiento y la degradación enzimática de la materia prima, se transforman en un factor muy importante. Hoy en día, la baja rentabilidad de la conversión de celulosa a un hidrolizado fermentable es una importante barrera para la utilización de la biomasa celulósica a nivel industrial (Hahn-Hagerdal *et al.*, 2006). Se deben entonces optimizar los pasos de pretratamiento por un lado, pero por el otro se debe trabajar en disminuir los costos por el uso de las enzimas. Para lograr este cometido, varios enfoques se desarrollan a lo largo del mundo, uno de ellos es disminuir los costos de producción de las enzimas (Grunwald, 2012).

Se han estudiado la producción de celulasas y xilanasas por diferentes microorganismos y también la influencia de diferentes factores nutricionales y condiciones ambientales (Singhania *et al.*, 2010).

Entre ellos la fuente de carbono es de gran importancia para la producción de ambas enzimas. En general, al comenzar el estudio de la producción de las enzimas en una cepa determinada (que no sea genéticamente modificada), se utilizan los polímeros comerciales, en el caso de la celulasa se utiliza carboximetilcelulosa (CMC) o celulosa microcristalina (AVICEL) (Asha *et al.*, 2012; Qaisar *et al.*, 2014; Rong *et al.*, 2015; Hero *et al.*, 2017), mientras que en el caso de las xilanasas, diferentes xilanos de haya, de avena, y otros orígenes disponibles comercialmente (Amore *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2018). En general luego de realizada esta etapa inicial se estudia los medios de cultivo para conocer la capacidad de las cepa de producir la enzima en diversas situaciones.

Se han probado diferentes residuos agroindustriales, para encontrar uno que sea capaz de sustentar el crecimiento del microorganismo así como estimular la producción de la enzima de interés. Las fuentes de carbono utilizada en la mayoría de los cultivos para producir celulasa son biomasa lignocelulósica que van desde paja, cáscaras de cereales y legumbres, salvado de arroz o trigo, bagazo, desechos de la industria papelera, entre otros (Singh *et al.*, 2014; Yoon *et al.*, 2014; Kshirsagar *et al.*, 2016). En el caso de las xilanasas, residuos con altos contenidos de hemicelulosa se han probado como salvado de trigo, salvado de arroz, harina de soja, paja de sorgo, bagazo de caña de azúcar. Se

han encontrado altas producciones de xilanasas tanto en bacterias como en hongos (Adhyaru, Bhatt y Modi, 2014; Zhang y Sang, 2015; Florencio *et al.*, 2016).

Otro factor que influye en la producción enzimática y que se investiga intensamente es la diferencia de producción en estado líquido (o fermentación sumergida SmF de sus siglas en inglés) o en estado sólido (SSF). Ambas formas tienen sus ventajas y desventajas. La fermentación sumergida se ha definido como fermentación en presencia de exceso de agua. Casi todas las instalaciones de producción de enzimas a escala industrial utilizan la tecnología de SmF debido a una mayor facilidad en el manejo y control de los parámetros operacionales (Singhania *et al.*, 2010). En el caso de los hongos filamentosos, durante las últimas dos décadas, la SSF ha tomado interés debido a la producción de grandes cantidades de enzimas. La fermentación en fase sólida se define como la fermentación en ausencia de agua libre. En este caso el tipo de sustrato lignocelulósico es el parámetro de mayor impacto en la producción de celulasas y xilanasas. La optimización de las condiciones de SSF, puede mejorar aún más la economía de producción general (Yoon *et al.*, 2014). Ofrece ventajas sobre SmF en relación a una mayor productividad volumétrica, una mayor concentración de productos, un menor volumen de efluentes y una baja represión catabólica por los productos enzimáticos. Sin embargo, la variabilidad de la composición del material vegetal, la contaminación microbiana, la dificultad en la medición de parámetros y el diseño de reactores eficientes son las principales desventajas de esta tecnología (Hansen *et al.*, 2015).

Otros parámetros como la temperatura y el pH, también influyen en la producción y estabilidad de la enzima (Polizeli *et al.*, 2005; Chakdar *et al.*, 2016). Es importante también la consideración del tiempo de la fermentación y el tamaño inicial del inóculo (Yoon *et al.*, 2014).

#### 2.4.5. Búsqueda de biocatalizadores

La exploración de los diversos nichos ecológicos en búsqueda de nuevos microorganismos reveló la gran diversidad de especies que viven en hábitats bien distintos (Ceccato-Antonini, Brito Codato, *et al.*, 2017). Entre las numerosas especies descubiertas en hábitats específicos e inusuales, es probable que muchas posean enzimas, rutas metabólicas y exhiban propiedades fisiológicas valiosas para aplicaciones biotecnológicas (Deak, 2009). Por lo tanto, una estrategia útil, que se utiliza desde finales del siglo XX, en la obtención de los sistemas enzimáticos, es la búsqueda de microorganismos productores de los mismos a partir de diferentes hábitats naturales.

Como ejemplo de esta estrategia, el caso del hongo *Trichoderma reesei*. Es uno de los microorganismos más importantes para la industria de la biorrefinería debido a la variedad de celulasas que produce. El mismo fue aislado de los equipos de algodón en

descomposición del Ejército de EE. UU. en las Islas Salomón durante la Segunda Guerra Mundial hace poco más de setenta años (Bischof, Ramoni y Seiboth, 2016). Nuevos y numerosos intentos de obtener cepas innovadoras se han realizado desde esa fecha.

En la degradación de las paredes celulares de plantas participan diversos microorganismos, entre ellos los hongos constituyen un grupo importante debido a que pueden colonizar los tejidos vegetales usando diferentes estrategias, pueden ser patógenos, saprófitos o simbioses. Mediante el aislamiento de estos microorganismos y los posteriores estudios genéticos se han descubierto los sistemas enzimáticos adquiridos por los diferentes tipos de hongos filamentosos que se usan para degradar los polímeros en fuentes de carbono asimilables (Bertrand *et al.*, 2016). Se han aislado hongos filamentosos aerobios degradadores de plantas a partir de diferentes ambientes donde hay madera y plantas en descomposición. En este sentido, se aislaron a partir de madera apilada en descomposición, algunas especies como son *Pleurotus ostreatus*, *Ganoderma lucidum*, *Agrocybe aeregita* y *Lepista nuda*, los cuales presentaron actividad xilanasa (Menezes, da Silva y Záchia, 2017). También se han reportado aislamientos del género *Aspergillus* con actividad xilanasa y libres de actividad celulasa a partir de muestras de suelo, compost de hojas y desechos de la industria papelera (Kalim y Mazhar, 2016). Por otro lado, se han aislado a partir de ambientes acuáticos como sedimentos de manglares y arena de coral las especies *Inonotus tropicalis* y *Cerrena unicolor* con actividad ligninolítica y *Chaetomium globosum* y *Chaetomium brasiliense* que mostraron excepcional actividad celulolítica. Estos hongos se cultivaron en conjunto con la finalidad de degradar el material lignocelulósico como paja de trigo y bagazo de caña de azúcar (Ramarajan y Sumathi Manohar, 2017).

Dentro del reino fungi también las levaduras son de gran interés biotecnológico. Estos microorganismos son capaces de hidrolizar celulosa y/o hemicelulosa y se han reportado aislamientos tanto de especies endófitas como de muestras de suelo o desechos ricos en material lignocelulósico. Se puede citar la producción de biosurfactantes a partir de paja de trigo pretratada por una levadura del género *Pseudozyma* (Faria *et al.*, 2014) lo que indica la presencia de enzimas hidrolíticas capaces de degradar los polímeros del material lignocelulósico y convertirlo en otros productos. Una levadura identificada como *Cystobasidium oligophagum* aislada de suelo rico con material lignocelulósico en descomposición produjo lípidos a partir de carboximetilcelulosa (Vyas y Chhabra, 2017). Otros productos que se han obtenido del uso de lignocelulósicos como fuente de carbono en un sistema de sacarificación y fermentación simultáneas utilizando enzimas comerciales y fermentado por levaduras aisladas como *Saccharomyces* sp. y *Cándida* sp. son xilitol y etanol (Latif y Rajoka, 2001; Ceccato-Antonini, Brito Codato, *et al.*, 2017).



En la mayoría de los ambientes naturales, tanto de condiciones extremas como no, se han aislado bacterias capaces de degradar el material lignocelulósico. Por lo tanto pueden ser consideradas como una importantísima fuente de enzimas degradadoras (Ahmed, Babalola y McKay, 2017). Las bacterias aerobias, de las cuales se han aislado enzimas celulasas, xilanasas y lignino peroxidadas y lacasas se encuentran generalmente en el suelo cerca de material lignocelulósico. Un ejemplo de esto es el estudio realizado en El Chaco, en Argentina, donde analizaron la diversidad bacteriana de los suelos cercanos a un bosque en el que encontraron al menos diez filos distintos de bacterias, varias de las cuales son conocidas productoras de celulasas como *Acidothermus*, *Micromonospora*, *Streptomyces*, *Paenibacillus* y *Pseudomonas* (Talia *et al.*, 2012). Otro ejemplo son las pilas de compost, de la que aisló una bacteria *Bacillus altitudinis*, con capacidad de producir altas concentraciones de xilanasas en un medio con paja de sorgo (Adhyaru, Bhatt y Modi, 2014).

Los endófitos son un grupo muy diverso de microorganismos presentes en la mayoría de las plantas (si no todas) sin causar síntomas externos y se han estudiado intensamente debido a su relación simbiótica con las plantas y también debido a su potencial biotecnológico como agentes de control de plagas y como fuentes de metabolitos secundarios, incluidas sustancias bioactivas (Saikonen *et al.*, 1998). Estos microorganismos, al igual que los hongos patógenos de plantas, deben degradar la pared celular vegetal para infectar y también para competir con una multitud de otros organismos. Se han reportado microorganismos endófitos productores de enzimas que degradan el material vegetal, incluidas hidrolasas, como celulasas, xilanasas, amilasas y pectinasas, y enzimas ligninolíticas oxidativas (Bischoff *et al.*, 2009; Procópio *et al.*, 2009; De Almeida *et al.*, 2011; Rajesh y Ravishankar Rai, 2013). Mediante la producción de estas enzimas, invaden y colonizan los tejidos vegetales y también obtienen nutrientes (Marques *et al.*, 2018). Estos microorganismos resultan interesantes para la búsqueda de enzimas con actividad hidrolítica.

## 2.5. Justificación de la investigación

---

El consenso de que los seres humanos están causando el calentamiento global es compartido por el 90% -100% de los científicos que estudian el clima (Cook *et al.*, 2016). Continuando con la tendencia de calentamiento a largo plazo del planeta, las temperaturas promedio en 2017 fueron 0.90 grados Celsius más cálidas que el promedio de 1951 a 1980, según los científicos del Instituto Goddard de Estudios Espaciales (GISS) de la NASA (Goddard Institute for Space Studies, 2018) (ver Figura 22).

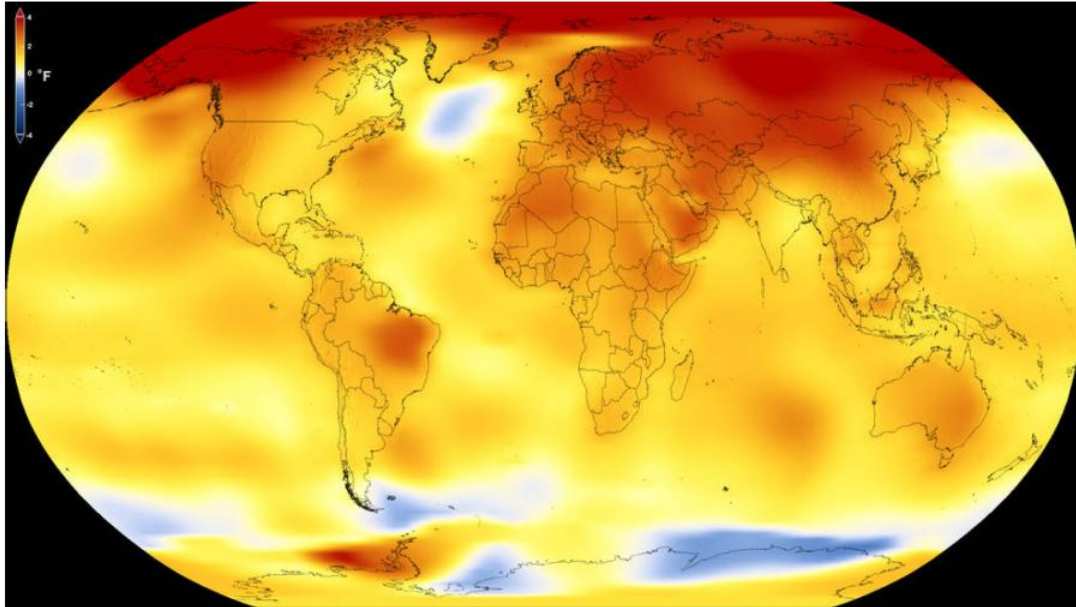


Figura 22- Distribución de diferencias de temperatura terrestre entre promedios 2013-2017 (T final) y promedios de referencia 1951-1980 (T inicial), según un análisis del Instituto Goddard de Estudios Espaciales de la NASA. Los rojos muestran regiones de mayor calentamiento en el polo norte (NASA / GSFC / Scientific Visualization Studio).

Este cambio climático es impulsado en gran medida por el aumento de dióxido de carbono y otras emisiones en la atmósfera (National Oceanic and Atmospheric Administration, 2018). Estas alteraciones a nivel global han forzado a nuestra sociedad a demandar entre otras cosas, productos sostenibles. Es en esta búsqueda de soluciones que surge la idea de obtener estos nuevos productos a partir de recursos naturales renovables y así disminuir la dependencia actual de los recursos fósiles y fijar la tasa de producción de CO<sub>2</sub> a su tasa de consumo.

En este sentido, el uso de la biomasa lignocelulósica es una de las alternativas más prometedoras (Mussatto, 2016). La biomasa se genera a partir del CO<sub>2</sub> atmosférico disponible, el agua y la luz solar a través de la fotosíntesis. Por lo tanto, se ha considerado que la biomasa es la única fuente sostenible de carbono orgánico en la tierra y el equivalente perfecto al petróleo para la producción de combustibles y nuevos productos con emisiones netas de carbono iguales a cero. Además, es una materia prima renovable en abundancia y está disponible en todo el mundo (Hadar, 2013).

El desarrollo de la biorrefinería tiene dos objetivos estratégicos: el desplazamiento del uso del petróleo a favor de las materias primas renovables (objetivo energético) y el establecimiento de una industria robusta a partir de la biomasa (objetivo económico). El objetivo energético se aborda mediante el esfuerzo actual dirigido a la producción de etanol, biodiesel y la producción de otros biocombustibles (butanol) para desplazar parte del petróleo actualmente utilizado. Pero a pesar de su gran volumen, el combustible es un producto de bajo valor económico, por lo que el retorno de la inversión en

operaciones sólo con biocombustibles presenta una barrera significativa para lograr el objetivo económico de la biorrefinería. Para cambiar esta realidad, se deben desarrollar otros productos de mayor valor agregado (Bozell y Petersen, 2010; Isikgor y C. Remzi Becer, 2015).

El Uruguay es un país netamente agro-productor, por lo que la existencia de fuentes renovables es una realidad, a este hecho se suma la necesidad de desarrollar tecnologías innovadoras, amigables con el medio ambiente y adaptables a estos recursos locales. Bajo estas premisas se enmarcan los objetivos de esta tesis, los cuales intentan acercarse desde una óptica multidisciplinaria, al estudio del uso de enzimas xilanasas y celulasas obtenidas a partir de microorganismos aislados de fuentes naturales, para obtener azúcares fermentables y otros productos de alto valor agregado a partir materiales renovables (biomasa lignocelulósica) como la corteza de *Eucalyptus dunnii*.

## 3. Objetivos de la tesis

### 3.1. Objetivo general

---

Obtener microorganismos productores de xilanasas y celulasas para contribuir al proceso de degradación de desechos forestales lignocelulósicos con el fin de obtener azúcares para su potencial uso en la producción de bioetanol.

### 3.2. Objetivos específicos

---

- 3.2.1 Aislar microorganismos a partir de hábitats naturales ricos en celulosa y hemicelulosa.
- 3.2.2 Seleccionar microorganismos con actividad celulasa y xilanasas, a partir de los microorganismos aislados en 3.2.1, mediante un cribado cualitativo.
- 3.2.3 Seleccionar microorganismos, a partir de aquellos elegidos en 3.2.2, con buena actividad celulasa y xilanasas mediante un cribado cuantitativo.
- 3.2.4 Identificar los microorganismos seleccionados en 3.2.3.
- 3.2.5 Seleccionar el medio de cultivo apropiado y el tiempo óptimo para la mayor producción de celulasa y xilanasas mediante los microorganismos seleccionados en 3.2.3.
- 3.2.6 Caracterizar las enzimas celulasa y xilanasas mediante sustratos modelo.
- 3.2.7 Estudiar la posible aplicación de las enzimas celulasa y xilanasas obtenidas.

## 4. Aislamiento de microorganismos a partir de hábitats naturales ricos en celulosa y hemicelulosa.

### 4.1. Metodología

---

Los aislamientos de microorganismos se realizaron a partir de: a) tejidos vegetales internos con la finalidad de aislar microorganismos endófitos; b) superficies vegetales para el aislamiento de microorganismos epífitos. Los órganos vegetales utilizados fueron ramas, corteza y hojas de un árbol de *Eucalyptus globulus* que se encuentra en la Facultad de Agronomía, Montevideo, Uruguay. Se recolectaron las muestras de un árbol que no mostrara signos de enfermedad.

Los aislamientos se realizaron en los meses de marzo de 2015 y febrero de 2016. Un esquema de la metodología seguida se muestra en la Figura 23.

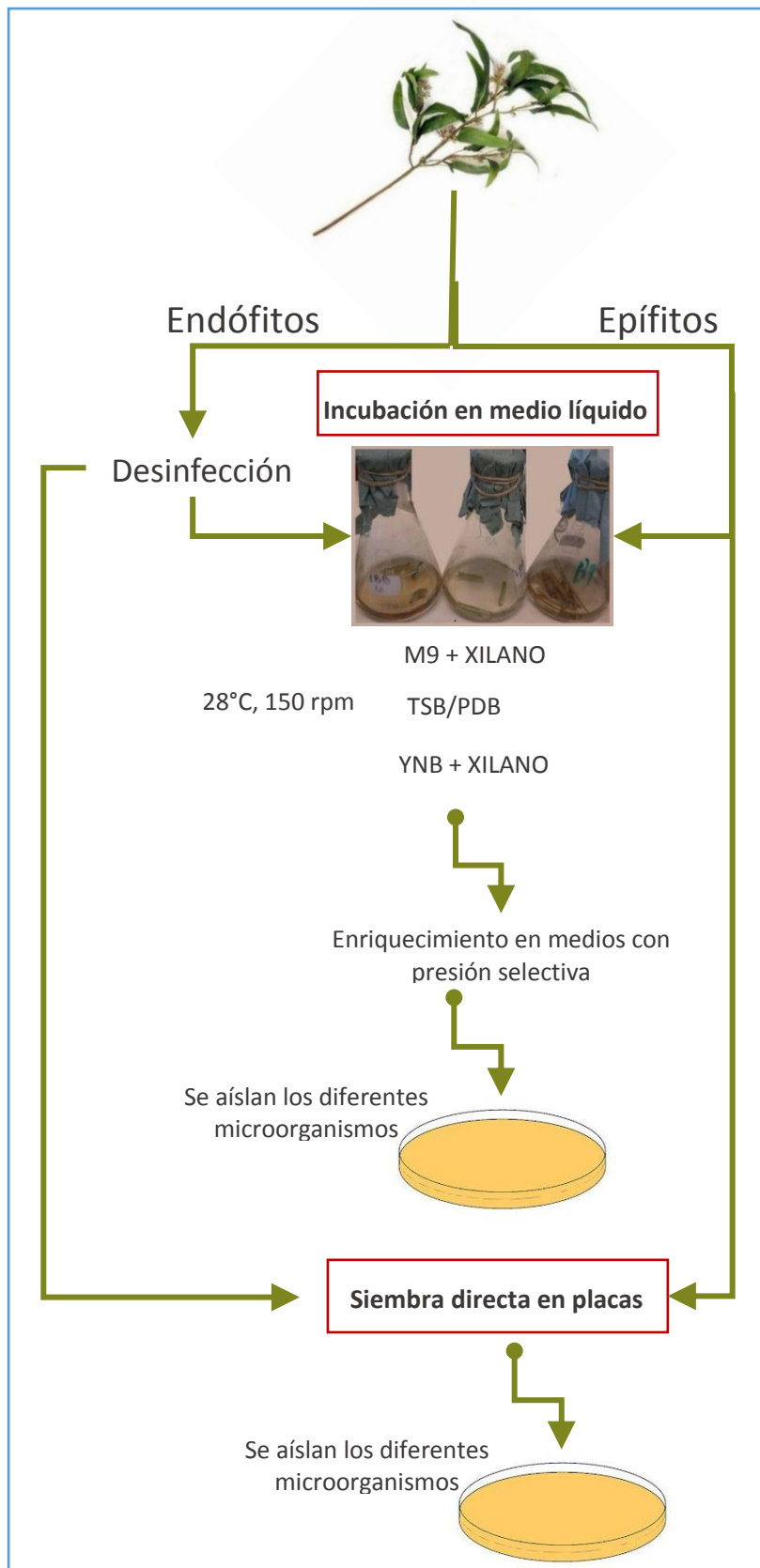


Figura 23 - Esquema de aislamiento de microorganismos a partir de diferentes tejidos de *E. dunnii*

### 4.1.1. Aislamiento de microorganismos endófitos

La metodología que se empleó para el aislamiento de microorganismos endófitos fue la desarrollada por nuestro grupo de trabajo en el Laboratorio de Biocatálisis y Biotransformaciones (LBB) de Facultad de Química, UdelaR. La misma consiste en un procedimiento de desinfección del tejido vegetal y manipulación aséptica con material estéril (Rodríguez *et al.*, 2007; Rodríguez, Gonzalez y Rodríguez Giordano, 2016).

El procedimiento seguido para la desinfección del material vegetal se detalla a continuación (en el caso de las ramas previamente fueron peladas con cuchillo estéril, corteza y hojas se siguió directamente el procedimiento):

- 1) Se sumergieron en una solución de Hipoclorito de sodio 10% durante 3 minutos
- 2) Se enjuagaron dos veces con agua destilada estéril
- 3) Se sumergieron en etanol 70% durante 3 minutos
- 4) Se enjuagaron dos veces con agua destilada estéril
- 5) Se secaron con papel de filtro estéril

Para verificar que el proceso de desinfección fue adecuado se llevó a cabo el control del mismo mediante la impresión del material vegetal desinfectado en los medios de cultivo Tryptic Soy Agar (TSA) (Sigma-Aldrich) y Potato Dextrose Agar (PDA) (Difco<sup>®</sup>). Las placas se incubaron a 28 °C durante 96 horas. No se observó crecimiento luego de transcurrido el tiempo de incubación en ninguno de los ensayos de procedimientos de desinfección, lo que significa que el proceso de desinfección de la superficie del tejido vegetal fue satisfactorio.

Posteriormente, el material vegetal se cortó con cuchillo estéril y trozos de material desinfectados se incubaron de forma tal de aislar el máximo número de microorganismos posibles. Para ello se realizó, por un lado, la siembra del material vegetal en medios líquidos y por otra parte en medios sólidos. En ambas estrategias se utilizaron medios de cultivo nutrientes y medios de cultivos mínimos utilizando como fuente de carbono en estos últimos carboximetilcelulosa (CMC) (comercial) o xilano de haya (Sigma-Aldrich). A continuación se describe la metodología seguida en cada caso.

- Enriquecimiento en los medios de cultivos líquidos Tryptic Soy Broth, (TSB) (Sigma-Aldrich) y M9, para el aislamiento de bacterias y Potato Dextrose Broth (PDB) (Difco<sup>®</sup>) e Yeast Nitrogen Base (YNB) (Difco<sup>®</sup>) para el aislamiento de hongos. Se agregaron 2 g de trozos del material vegetal desinfectado a cada uno de los caldos de enriquecimiento y se incubaron a 28 °C y 150 rpm en Shaker (IKA KS 4000 ic). Cuando se evidenció turbidez en los caldos debido al crecimiento microbiano desarrollado se procedió a realizar un subcultivo (dilución 1/10) de los mismos en los medios de cultivo M9, para la

recuperación de bacterias, e YNB, para hongos, adicionados con carboximetilcelulosa (CMC) o xilano de haya como fuente de carbono y energía. Esta metodología de subcultivo en medio mínimo, se llevó a cabo 2 veces, de forma de seleccionar microorganismos con las actividades hidrolíticas buscadas.

Al evidenciar crecimiento por turbidez en los caldos, en cada una de las etapas, se procedió a realizar un aislamiento en superficie (se sembraron 100  $\mu$ l del cultivo de diluciones apropiadas) en los medios de cultivo nutrientes: TSA y PDA. Las placas se incubaron a 28°C y se observaron cada 24 horas hasta las 96 horas re-aislando los microorganismos que crecieron en nuevas placas.

- Siembra directa del material vegetal en los medios sólidos TSA y M9 agar con CMC / Xilano para el crecimiento de bacterias; PDA e YNB agar con CMC / Xilano para la recuperación de hongos. Las placas se incubaron a 28 °C y se observaron diariamente. Las colonias desarrolladas se reaislaron mediante estrías en placas de TSA y PDA para obtener cultivos puros.

#### 4.1.2. Aislamiento de microorganismos epífitos

Se llevó a cabo de igual forma que seguida para endófitos pero sin la etapa de desinfección del tejido vegetal. En este caso en los medios líquidos se agregó 1 g de material.

#### 4.1.3. Conservación de cepas microbianas

Los crecimientos microbianos obtenidos en ambas estrategias se aislaron y se conservaron. En el caso de bacterias y levaduras el procedimiento empleado fue el de crioconservación, para lo cual se realizaron suspensiones microbianas en glicerol (Sigma-Aldrich) al 17 % y se conservaron en freezer a -70 °C. Los hongos filamentosos se crecieron en tubos de PDA y se les adicionó vaselina estéril para conservarlos en atmósfera carente de oxígeno. Se conservaron además trozos de agar con crecimiento en viales con agua estéril. Ambos métodos se conservan a temperatura de 4 °C realizando subcultivos de los mismos cada 8 meses.



## 4.2. Resultados y discusión

---

En los últimos años, la producción competitiva de biocombustibles renovables alternativos ha estimulado la investigación de nuevos microorganismos como fuente de celulasas y xilanasas altamente activas y específicas. Se pueden enumerar varias ventajas de estas nuevas cepas tales como presentar una tasa de crecimiento rápida, producción de enzimas que a menudo son más efectivas debido a una menor inhibición por producto y producción de un sistema completo multienzimático para una conversión eficiente de la lignocelulosa en azúcares fermentables (Ventorino *et al.*, 2015). En este contexto, se debe prestar especial atención a la exploración de la biodiversidad de nichos naturales de donde estos microorganismos productores de celulasas y xilanasas puedan aislarse y caracterizarse. Desde el punto de vista microbiológico, la biomasa lignocelulósica representa un ecosistema complejo en el que las condiciones ambientales influyen en los organismos vivos y en particular, los factores químicos (pH y salinidad) y físicos (temperatura, presión y radiación) pueden ejercer una presión selectiva sobre la biodiversidad de los microorganismos (van den Burg, 2003). Como consecuencia, las comunidades microbianas autóctonas pueden prevalecer sobre otros microorganismos porque han evolucionado para adaptarse a estas condiciones (Suto *et al.*, 2002; Ghio *et al.*, 2012; Robledo *et al.*, 2015; Vyas y Chhabra, 2017).

Existen diversos trabajos en donde se describe el aislamiento de microorganismos a partir de árboles de *Eucalyptus*. Estos estudios fueron realizados con diferentes objetivos como ser conocer la distribución de los microorganismos en los diferentes niveles del árbol. En nuestro país, el equipo de Bettucci del Laboratorio de Micología de la Facultad de Ciencias, Udelar, ha realizado el estudio de hongos endófitos de diferentes partes de *Eucalyptus*, centrándose por un lado en el rol de los hongos de la pudrición blanca de la madera mediante el estudio del sistema enzimático ligninolítico presente en los mismos y por otra parte en el estudio de la distribución de los diferentes géneros fúngicos a lo largo del árbol (Bettucci y Saravay, 1993; Bettucci y Alonso, 1997; Bettucci, Alonso y Tiscornia, 1999; Simeto *et al.*, 2005).

También se describen aislamientos de microorganismos de *Eucalyptus* para analizar si juegan un rol al momento de la descomposición del vegetal, es así que el grupo de Ventorino exploró la diversidad bacteriana en diferentes estados de degradación de un *Eucalyptus* y otras especies de árboles y señalaron que se encontró una comunidad altamente compleja de bacterias, de las cuales fueron aisladas aquellas que degradan eficientemente la celulosa y hemicelulosa (Ventorino *et al.*, 2015). Estos antecedentes muestran la posibilidad de obtener microorganismos con diferentes actividades enzimáticas a partir de *Eucalyptus*.

En esta tesis se propuso conseguir la mayor cantidad de aislamientos con el objetivo de poder obtener microorganismos productores de enzimas xilanasas y celulasa. Fue por esta razón que se realizaron los aislamientos siguiendo diferentes estrategias de cultivo y empleando tejidos vegetales externos e internos para aislar microorganismos epífitos y endófitos del árbol de *Eucalyptus globulus*.

Se logró un total de 143 aislamientos microbianos, de los cuales 37 fueron aislamientos a partir de hojas, 54 de ramas y 52 de corteza. Los microorganismos se dividieron en bacterias (B), levaduras (L) u hongos filamentosos (HF), de acuerdo a la observación de caracteres morfológicos macro y microscópicos. Los datos de los aislamientos se encuentran en la Tabla 4 y se muestran junto con el origen, el tipo de aislamiento y si provino de alguna etapa de enriquecimiento.

Inicialmente se recuperaron todos los microorganismos, aunque tuvieran características morfológicas similares y se los trató como aislamientos distintos. La mayoría de los hongos provino del aislamiento inicial (83 %), sin etapa posterior de enriquecimiento, mientras que las bacterias y levaduras provinieron en su mayoría de los medios con sucesivas etapas de presión selectiva (84 %).

Tabla 4- Aislamientos. Código: dado al aislamiento para su identificación, Tipo de aislamiento: Epífito o endófito, Origen: ramas, corteza u hojas, Enriquecimiento: si provino del aislamiento inicial o algún subcultivo

BACTERIAS				LEVADURAS			
Código	Tipo de aislamiento	Origen	Etapas de enriquecimiento	Código	Tipo de aislamiento	Origen	Etapas de enriquecimiento
EBV10_1	Epif	Ramas	Aislamiento inicial	EBV12_15A	Epif	Ramas	1er subcultivo
EBV10_2	Epif	Ramas	Aislamiento inicial	EBV13_37	Epif	Ramas	1er subcultivo
EBV10_3	End	Ramas	Aislamiento inicial	EBV16_44	Epif	Ramas	Aislamiento inicial
EBV10_4	End	Ramas	Aislamiento inicial	EBV96_64	Epif	Corteza	2do subcultivo
EBV10_5	End	Ramas	Aislamiento inicial	EBV96_86	Epif	Hojas	2do subcultivo
EBV10_7	End	Ramas	Aislamiento inicial	EBV97_87	Epif	Hojas	2do subcultivo
EBV11_12	Epif	Ramas	Aislamiento inicial				

BACTERIAS			
Código	Tipo de aislamiento	Origen	Etapas de enriquecimiento
EBV12_13 A	End	Ramas	1er subcultivo
EBV12_13 B	End	Ramas	1er subcultivo
EBV12_14	End	Ramas	1er subcultivo
EBV12_15B	Epif	Ramas	1er subcultivo
EBV12_16	End	Ramas	2do subcultivo
EBV12_17	End	Ramas	1er subcultivo
EBV12_18	Epif	Ramas	1er subcultivo
EBV12_19_A	End	Ramas	1er subcultivo
EBV12_19_B	End	Ramas	1er subcultivo
EBV12_21_A	End	Ramas	2do subcultivo
EBV12_21_B	End	Ramas	2do subcultivo
EBV12_21_C	End	Ramas	2do subcultivo
EBV12_22	End	Ramas	1er subcultivo
EBV12_23_A	Epif	Ramas	2do subcultivo
EBV12_23_B	Epif	Ramas	2do subcultivo
EBV12_24	End	Ramas	2do subcultivo
EBV13_32	End	Ramas	Aislamiento inicial
EBV13_34	End	Ramas	1er subcultivo
EBV13_35	Epif	Ramas	1er subcultivo
EBV13_36	Epif	Ramas	1er subcultivo
EBV14_41	End	Ramas	2do subcultivo
EBV14_42	End	Ramas	2do subcultivo
EBV17_45	End	Ramas	2do subcultivo
EBV17_46	End	Ramas	2do subcultivo
EBV17_47	End	Ramas	2do subcultivo
EBV17_48	End	Ramas	Aislamiento inicial
EBV17_49	End	Ramas	Aislamiento inicial
EBV94_1	Epif	Corteza	1er subcultivo
EBV94_2	Epif	Corteza	1er subcultivo
EBV94_3	End	Corteza	1er subcultivo

HONGOS FILAMENTOSOS			
Código	Tipo de aislamiento	Origen	Etapas de enriquecimiento
EBV11_10_A	Epif	Ramas	Aislamiento inicial
EBV11_10_B	Epif	Ramas	Aislamiento inicial
EBV11_11	Epif	Ramas	Aislamiento inicial
EBV11_8	Epif	Ramas	Aislamiento inicial
EBV11_9	Epif	Ramas	Aislamiento inicial
EBV13_25	Epif	Ramas	Aislamiento inicial
EBV13_26	End	Ramas	Aislamiento inicial
EBV13_27	End	Ramas	Aislamiento inicial
EBV13_28	Epif	Ramas	Aislamiento inicial
EBV13_29	Epif	Ramas	Aislamiento inicial
EBV13_30	Epif	Ramas	Aislamiento inicial
EBV13_31	End	Ramas	Aislamiento inicial
EBV14_43	End	Ramas	1er subcultivo
EBV14_50	Epif	Ramas	Aislamiento inicial
EBV15_38	End	Ramas	Aislamiento inicial
EBV15_39	End	Ramas	Aislamiento inicial
EBV15_40	End	Ramas	Aislamiento inicial
EBV94_10	End	Corteza	Aislamiento inicial
EBV94_11	End	Corteza	Aislamiento inicial
EBV94_12	End	Corteza	Aislamiento inicial
EBV94_6	End	Corteza	Aislamiento inicial
EBV94_7	End	Corteza	Aislamiento inicial
EBV94_9	End	Corteza	Aislamiento inicial
EBV95_13	End	Corteza	1er subcultivo
EBV95_14	End	Corteza	1er subcultivo
EBV95_16	Epif	Corteza	Aislamiento inicial
EBV95_17	Epif	Corteza	Aislamiento inicial
EBV95_18_A	Epif	Corteza	Aislamiento inicial

BACTERIAS			
Código	Tipo de aislamiento	Origen	Etapas de enriquecimiento
EBV94_4	End	Corteza	1er subcultivo
EBV94_5	Epif	Corteza	1er subcultivo
EBV94_8	End	Corteza	Aislamiento inicial
EBV96_21_A	Epif	Corteza	Aislamiento inicial
EBV96_40	Epif	Corteza	1er subcultivo
EBV96_41	Epif	Corteza	1er subcultivo
EBV96_42	Epif	Corteza	1er subcultivo
EBV96_43A	Epif	Corteza	2do subcultivo
EBV96_43B	Epif	Corteza	2do subcultivo
EBV96_44	End	Corteza	1er subcultivo
EBV96_45	End	Corteza	2do subcultivo
EBV96_46	End	Corteza	2do subcultivo
EBV96_47	End	Corteza	1er subcultivo
EBV96_49	End	Corteza	2do subcultivo
EBV96_51	End	Corteza	2do subcultivo
EBV96_52	End	Corteza	1er subcultivo
EBV96_53	End	Corteza	1er subcultivo
EBV96_54	End	Corteza	2do subcultivo
EBV96_55	End	Corteza	2do subcultivo
EBV96_57	End	Corteza	2do subcultivo
EBV96_60	Epif	Corteza	2do subcultivo
EBV96_61	Epif	Corteza	2do subcultivo
EBV96_62	Epif	Corteza	1er subcultivo
EBV96_63	Epif	Corteza	1er subcultivo
EBV96_65	Epif	Corteza	2do subcultivo
EBV96_67	Epif	Corteza	2do subcultivo
EBV96_68	Epif	Corteza	2do subcultivo
EBV97_34	Epif	Hojas	Aislamiento inicial
EBV97_72	End	Hojas	1er subcultivo
EBV97_74	Epif	Hojas	1er subcultivo
EBV97_75	Epif	Hojas	2do subcultivo
EBV97_76	Epif	Hojas	2do subcultivo

HONGOS FILAMENTOSOS			
Código	Tipo de aislamiento	Origen	Etapas de enriquecimiento
EBV95_18_B	Epif	Corteza	Aislamiento inicial
EBV95_19	Epif	Corteza	Aislamiento inicial
EBV95_20	Epif	Corteza	Aislamiento inicial
EBV95_21_C	Epif	Corteza	Aislamiento inicial
EBV95_22	Epif	Corteza	Aislamiento inicial
EBV96_15	End	Corteza	1er subcultivo
EBV96_23	End	Hojas	Aislamiento inicial
EBV96_24	End	Hojas	Aislamiento inicial
EBV96_25	End	Hojas	Aislamiento inicial
EBV96_26	End	Hojas	Aislamiento inicial
EBV96_27	Epif	Hojas	Aislamiento inicial
EBV96_28	Epif	Hojas	Aislamiento inicial
EBV96_29	Epif	Hojas	Aislamiento inicial
EBV96_30_A	Epif	Hojas	Aislamiento inicial
EBV96_31	Epif	Hojas	Aislamiento inicial
EBV96_32	Epif	Hojas	Aislamiento inicial
EBV96_33_A	Epif	Hojas	Aislamiento inicial
EBV96_33_B	Epif	Hojas	Aislamiento inicial
EBV96_34_B	Epif	Hojas	Aislamiento inicial
EBV96_35	Epif	Hojas	Aislamiento inicial
EBV96_36	Epif	Hojas	Aislamiento inicial
EBV96_37	Epif	Hojas	Aislamiento inicial
EBV96_38	Epif	Hojas	Aislamiento inicial
EBV96_39	End	Corteza	2do subcultivo
EBV96_50	End	Corteza	1er subcultivo
EBV96_56	End	Corteza	2do subcultivo
EBV96_58	Epif	Corteza	2do subcultivo
EBV99_80_B	Epif	Hojas	1er subcultivo
EBV99_83	Epif	Hojas	1er subcultivo
EBV99_94	Epif	Hojas	Aislamiento inicial

BACTERIAS			
Código	Tipo de aislamiento	Origen	Etapas de enriquecimiento
EBV97_79	Epif	Hojas	1er subcultivo
EBV97_80_A	Epif	Hojas	1er subcultivo
EBV97_81	Epif	Hojas	2do subcultivo
EBV97_82	Epif	Hojas	2do subcultivo
EBV97_84	Epif	Hojas	1er subcultivo
EBV97_89	Epif	Hojas	1er subcultivo
EBV97_90	Epif	Hojas	2do subcultivo
EBV97_91	Epif	Hojas	1er subcultivo
EBV97_92	Epif	Hojas	1er subcultivo
EBV97_78	End	Hojas	1er subcultivo
EBV97_79	Epif	Hojas	1er subcultivo
EBV97_80_A	Epif	Hojas	1er subcultivo
EBV97_81	Epif	Hojas	2do subcultivo
EBV97_82	Epif	Hojas	2do subcultivo
EBV97_84	Epif	Hojas	1er subcultivo
EBV97_89	Epif	Hojas	1er subcultivo
EBV97_90	Epif	Hojas	2do subcultivo
EBV97_91	Epif	Hojas	1er subcultivo
EBV97_92	Epif	Hojas	1er subcultivo

En la Figura 24 se observa el árbol de *E. globulus* del cual se realizaron los aislamientos y el enriquecimiento de los microorganismos presente en las ramas del árbol en los diferentes medios de cultivo líquidos. En la Figura 25 se muestra el número de aislamientos obtenidos en cada caso así como el porcentaje de microorganismos endófitos aislados.



Figura 24- Aislamientos. Izq: árbol de *Eucalyptus globulus* del cual se realizaron los aislamientos. Der: aislamientos en matraces.

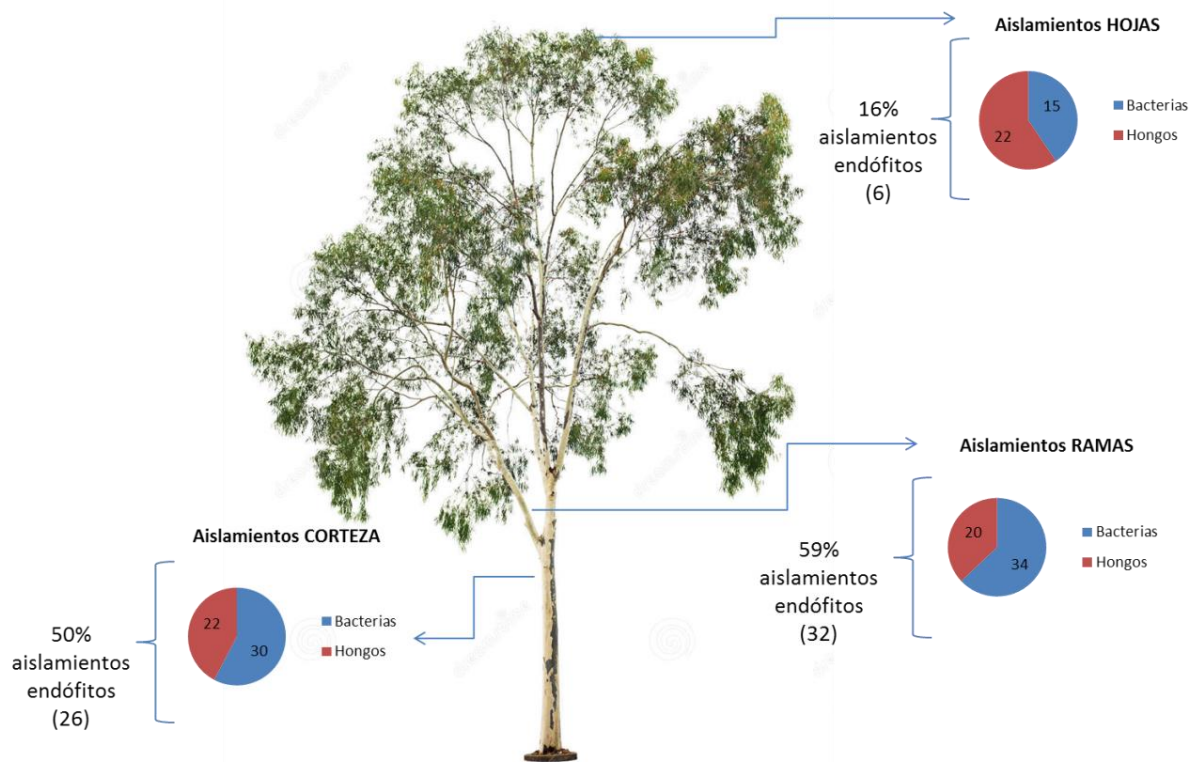


Figura 25- Detalle de los aislamientos obtenidos de cada órgano vegetal.

Los aislamientos de microorganismos endófitos obtenidos en la tesis fueron de 16, 50 y 59% de las cepas aisladas de hojas, corteza y ramas, lo cual muestra la cantidad de estos microorganismos que están presentes en *Eucalyptus*. Dentro de los endófitos aislados, no se recuperó ninguna levadura. En ramas y corteza, la mayoría de los endófitos fueron bacterias, mientras que aquellos obtenidos de las hojas, la mayoría fueron hongos filamentosos.

Estos datos junto con los reportes anteriores, apoyan la hipótesis desarrollada en esta tesis para la búsqueda de biocatalizadores diversos en un árbol de *Eucalyptus*.

### 4.3. Conclusiones

- La estrategia utilizada en los aislamientos fue adecuada dado que se logró obtener un amplio espectro de microorganismos a partir de las ramas, hojas y corteza del árbol de *Eucalyptus globulus* estudiado.

# 5. Cribado cualitativo y cuantitativo de actividades xilanasa y celulasa

## 5.1. Metodología

En la Figura 26 se muestra un esquema de los cribados realizados.

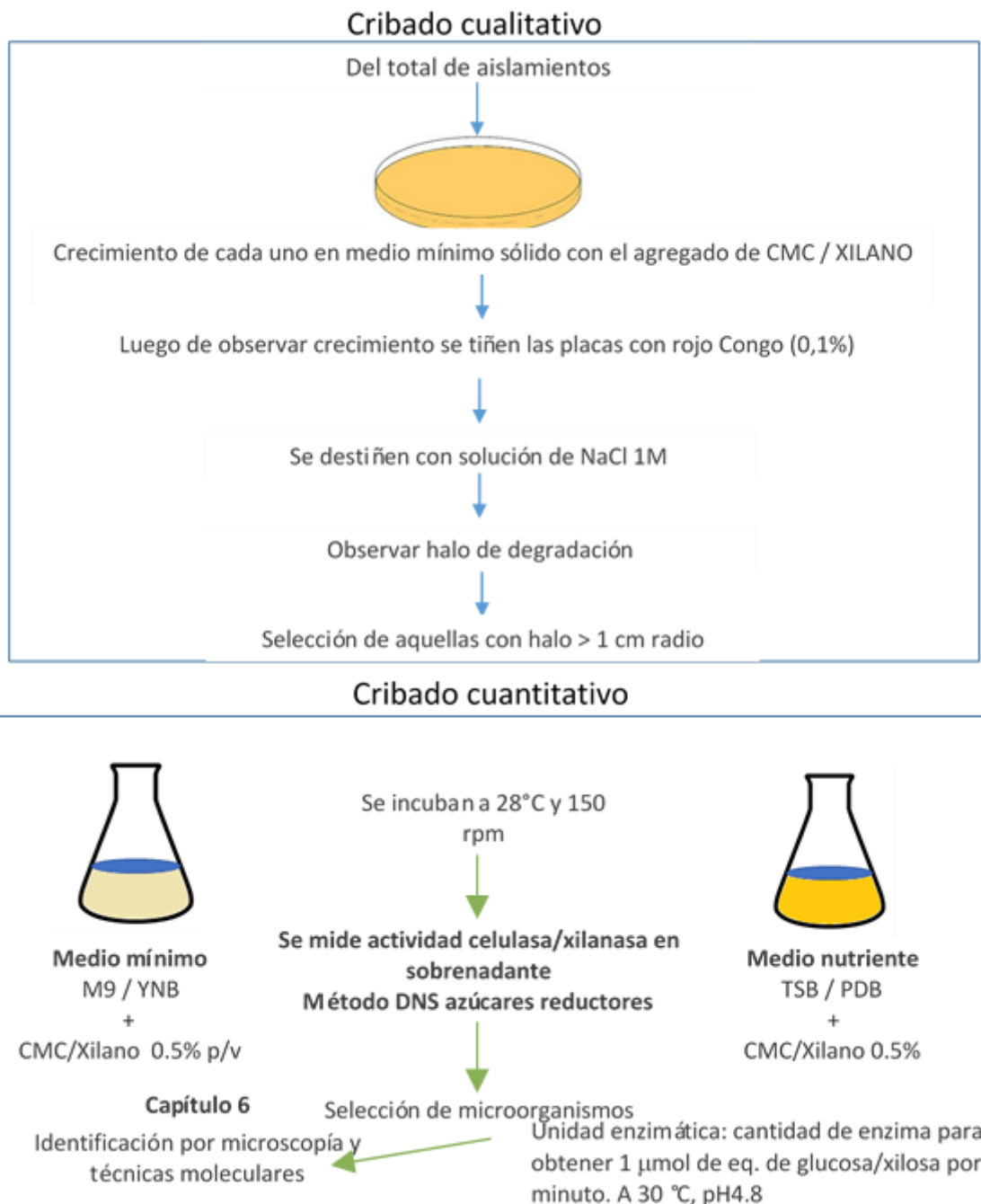


Figura 26 - Esquema de los cribados realizados

### 5.1.1. Cribado cualitativo de actividades celulasa y xilanasas

Todos los microorganismos aislados se sembraron en placas de Petri conteniendo los medios de cultivo mínimos M9 / YNB + agar 15 % + CMC o xilano de haya 0,5 %. Las placas se incuban en estufa a 28 °C, durante 48 y 72 horas en el caso de bacterias y levaduras y 5 días en el caso de los hongos filamentosos. Al observar crecimiento las placas fueron teñidas con una solución acuosa al 0,1 % del colorante Rojo Congo (Sigma-Aldrich) durante 20 minutos. Se descartó el sobrenadante y se lavó la placa dos veces, con una solución de NaCl 1M durante 20 minutos cada vez (Teather y Wood, 1982; Meddeb-Mouelhi, Moisan y Beauregard, 2014). Se midió el radio del halo de degradación observado.

### 5.1.2. Cribado cuantitativo de actividades celulasa y xilanasas

Para realizar la cuantificación de estas enzimas, los microorganismos seleccionados a partir del cribado cualitativo. Se crecieron cada uno de ellos, en dos medios líquidos uno nutriente y uno mínimo, usando xilano de haya o CMC como inductor o fuente de carbono. En esta etapa, se realizaron medidas enzimáticas a diferentes tiempos según el microorganismo en estudio. En el caso de las bacterias, se midió actividad a las 24 horas, las levaduras a las 48 horas y 5 días en los hongos filamentosos. A continuación se describe la metodología empleada según los microorganismos evaluados.

#### 5.1.2.1. Bacterias

Cada una de las bacterias seleccionadas se sembró mediante estrías en una placa de Petri con el medio de cultivo TSA y se incubó a 28 °C. Se inoculó una colonia en un tubo de ensayo con 5 ml de TSB y se incubó a 28 °C y con una agitación de 150 rpm. Al cabo de 24 horas, se inoculó en una proporción 1/10 un matraz Erlenmeyer de 50 ml con 9 ml de los medios TSB o M9 + xilano o CMC 0,5 %. Los medios se incubaron a 28 °C, 150 rpm durante 24 horas. Se tomó 1 ml del cultivo, se centrifugó en microcentrífuga (miniStar Personal Centrifuge TOMOS Life Science Group) y del sobrenadante se midieron las actividades enzimáticas correspondientes.

#### 5.1.2.2. Levaduras

Las levaduras seleccionadas se sembraron mediante estrías en una placa de Petri con el medio PDA y se incubaron durante 48 horas a 28 °C. Luego de observar colonias aisladas, se realizó un inóculo con una colonia en un tubo de ensayo con 5 ml de medio PDB. Los tubos se incubaron a 28 °C y 150 rpm. Luego de 24 horas de crecimiento, se inoculó en una proporción 1/10 un matraz Erlenmeyer de 50 ml con 9 ml de medio PDB o YNB +



xilano o CMC 0,5 %. Los cultivos se incubaron a 28 °C, 150 rpm durante 48 horas. Se tomó 1 ml del cultivo, se centrifugó en microcentrífuga y del sobrenadante se midieron las actividades enzimáticas correspondientes.

### 5.1.2.3. Hongos filamentosos

Los hongos filamentosos seleccionados se sembraron en placas de Petri con el medio de cultivo PDA y se incubaron a 28 °C durante 7 días. Para realizar el inóculo se utilizó un sacabocado y se cortó con él discos de 1 cm de diámetro de micelio crecido en el medio PDA. Se tomaron 5 discos de micelio y se traspasaron a matraces Erlenmeyer de 50ml con 10 ml de medios PDB o YNB + xilano / CMC 0,5 %. Los cultivos se incubaron durante 5 días a 28 °C y con agitación orbital a 150 rpm. Al finalizar el periodo se midió actividad xilanasa o celulasa en los sobrenadantes.

### 5.1.3. Medida de actividad xilanasa

*Procedimiento modificado de Bailey (Bailey, Biely y Poutanen, 1992)*

En un tubo de ensayo se agregaron:

- 0.5 ml solución de extracto enzimático
- 1.0 ml solución de xilano 2 % en buffer citrato 0.05 M, pH 4.8

Se dejó en baño de agua termostatzado (LAB-LINE, Modelo 18102A-1CEQ, Thermo Scientific) a 30 °C durante 60 minutos. Al finalizar se tomaron 0.375 ml de medio de reacción a otro tubo y se agregaron 0.750 ml de solución de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (descrito en el anexo 12.2), se hirvieron los tubos de ensayo en baño a 100 °C durante 5 minutos, luego se enfriaron con un baño de agua - hielo. Se agregaron 5 ml de agua destilada y se midió la absorbancia a 540 nm.

Se realizaron los siguientes blancos:

- Blanco buffer (1.5 ml buffer citrato 0.05 M pH 4.8)
- Blanco xilano (1.0 ml solución de xilano 2 % + 0.5 ml buffer citrato 0.05 M pH 4.8)
- Blanco enzima (1.0 ml buffer citrato 0.05 M pH 4.8 + 0,5 ml extracto enzimático)

*Curva de calibración de xilosa*

Los resultados obtenidos de las mediciones se calcularon mediante una curva de calibración de xilosa que se construyó cada vez que se preparó DNS. Las curvas realizadas y la metodología de las mismas se muestran en el anexo 12.3.1.

*Unidades de actividad xilanasa*

Las unidades se expresan como la cantidad de enzima que libera un  $\mu\text{mol}$  de equivalentes de xilosa por minuto por mililitro de solución de enzima en las condiciones del ensayo.

$$\frac{U}{ml} = \left( \frac{mg \text{ eq. xilosa}}{(tiempo * volumen solución de enzima * PM xilosa)} \right) * FD$$

- mg eq. Xilosa = [(obtenidos a partir de la curva de calibración (mg)) \* 1.5(ml)] / 0.375(ml)
- Tiempo= 60 minutos de reacción
- Volumen solución de enzima o volumen de la dilución = 0.5 ml agregados al tubo de reacción
- PM xilosa = 0,150 mg/ $\mu\text{mol}$
- FD = factor de dilución

#### 5.1.4. Medida de actividad celulasa (FPasa)

*Procedimiento* (Adney y Baker, 2008)

En un tubo de ensayo se agregaron:

- 0.5 ml de extracto enzimático.
- 1.0 ml de buffer citrato 0.05 M pH 4.8
- Tira de papel de filtro de aproximadamente 50 mg Whatman N°1 (5 cm de largo y 1 cm de ancho)

Se dejan los tubos de ensayo en baño de agua termostatizado durante 60 a 30 °C. Al finalizar se agregan 3 ml de solución de DNS, se hierven los tubos de ensayo en baño a 100 °C durante 5 minutos, luego se enfrían con un baño de agua - hielo. Se toma 1 ml de solución (previa homogenización) y se agregan 4 ml de agua destilada y se mide la absorbancia a 540 nm.

Blancos:

- Blanco buffer (1.5 ml buffer citrate 0.05 M pH 4.8)
- Blanco papel de filtro (1.5 ml buffer citrato 0.05 M pH 4.8 + tira de papel)

- Blanco enzima (1.0 ml buffer citrato pH 4.8 0.05 M + 0.5 ml solución de enzima)

#### *Curva de calibración de glucosa*

Los resultados obtenidos de las mediciones se calcularon mediante una curva de calibración de glucosa que se construyó cada vez que se preparó DNS. Las curvas realizadas y la metodología de las mismas se muestran en el anexo 12.3.1.

#### *Unidades de actividad celulasa*

Las unidades se expresan como la cantidad de enzima que libera un  $\mu\text{mol}$  de equivalentes de glucosa por minuto por mililitro de solución de enzima en las condiciones del ensayo.

$$\frac{U}{ml} = \frac{mg \text{ eq. glucosa}}{(tiempo * volumen solución de enzima * PM glucosa)}$$

- mg eq. Glucosa = [(obtenidos a partir de la curva de calibración (mg/ml))\*1.5(ml)]
- Tiempo de reacción = 60 min
- Volumen solución de enzima= 0.5 ml agregados al tubo
- PM glucosa= 0.180 mg/ $\mu\text{mol}$

## 5.2. Resultados y discusión

---

Luego del aislamiento de microorganismos a partir de diferentes tejidos de un árbol de *E. globulus*, se llevó a cabo un análisis cualitativo de la habilidad de cada aislamiento de producir enzimas celulasa y xilanasas. Con ese objetivo se sembraron placas con medio mínimo más el agregado de CMC o de xilano de haya y luego de observar crecimiento, se procedió a teñir la placa con una solución de rojo Congo. Se ha reportado que este colorante se une a los polímeros como la CMC y el xilano (Teather y Wood, 1982), en el caso que el microorganismo presente actividad celulasa o xilanasas, degrada el polímero y por lo tanto en la zona de hidrólisis el colorante no quedará adherido.

Del total de resultados positivos, 52 resultaron tener ambas actividades, 22 mostraron únicamente actividad celulasa y 17 xilanasas (resultados positivos en Tablas 5, 6 y 7). Del conjunto de microorganismos, que presentaron alguna de las actividades enzimáticas evaluadas, se seleccionaron aquellos que mostraron un halo de degradación mayor a 1

cm de radio, se trata de 18 aislamientos bacterianos, 14 hongos filamentosos y 4 levaduras.

En la Figura 27 se muestran ejemplos de los halos de degradación que se obtuvieron en este cribado cualitativo cuando existió actividad hidrolítica de interés.



Figura 27- Placas en las que se observa halo de degradación de los polímeros en estudio mediante tinción con colorante rojo Congo indicando actividad hidrolítica. Ejemplos de actividad xilanasas y celulasas en bacterias a la izquierda y hongos a la derecha en cada caso.

Una vez seleccionados los microorganismos, se llevó a cabo el cribado cuantitativo en dos medios líquidos para cada cepa, uno que fuera un medio nutriente y otro un medio mínimo. Estos medios se seleccionaron dependiendo de si se trató de un aislamiento procariota o eucariota. Como medio rico se utilizaron TSB o PDB, junto con el agregado de xilano o CMC, y los medios mínimos usados fueron M9 y YNB también con el agregado de los polímeros como fuente única de carbono y energía. Se ensayó la actividad xilanasas o celulasas al medir los azúcares reductores producidos por el sobrenadante del medio de cultivo sobre xilano o papel de filtro (para xilanasas y celulasas respectivamente), por el método del ácido dinitrosalicílico (DNS). El DNS en medio alcalino, al calentarse, es reducido al ácido 3-amino,5-nitrosalicílico, mientras que los carbonilos libres presentes en el medio de reacción (extremo reductor), se oxidan y se desarrolla un color anaranjado que es proporcional directamente a la cantidad de extremos reductores presentes (Vermelho y Couri, 2013).

A continuación se detallan los resultados obtenidos, se dividieron entre bacterias, levaduras y hongos filamentosos para facilitar la comprensión y discusión.

### 5.2.1. Cribados cualitativo y cuantitativo de actividad celulasas y xilanasas en las bacterias seleccionadas

En esta tesis, en total se aislaron 79 bacterias de los diferentes tejidos vegetales, un 53% mostró alguna actividad enzimática de las evaluadas y el 30% mostraron ambas actividades.

A partir del análisis de los resultados del cribado, se seleccionaron 18 bacterias (según mostraran un halo mayor a 1 cm de radio) para proseguir con el estudio de la producción enzimática en medio líquido (Tabla 5). Fueron seleccionadas 11 por ambas actividades, 5 por actividad celulasa y 2 cepas por actividad xilanasa. El porcentaje de bacterias seleccionado fue similar al reportado por Amore y colaboradores, en que se realizó un aislamiento a partir de muestras de distinta naturaleza (suelo húmico, tierra, superficie de roca entre otras) y se obtuvieron 93 bacterias. El cribado mediante el ensayo de xilanasa y celulasa en placa utilizando rojo Congo, permitió seleccionar 7 microorganismos xilanolíticos y 14 celulolíticos que mostraron halos de actividad con un diámetro mayor de 5 mm (Amore *et al.*, 2015). En este trabajo los investigadores realizaron el aislamiento en medio nutriente, por lo que otros microorganismos sin la capacidad de producir estas enzimas pueden haber crecido, lo que también pudo haber ocurrido en esta tesis.

Tabla 5-Bacterias seleccionadas del cribado cualitativo en placa de actividades xilanasa y celulasa. X =xilanasa / C=celulasa

Código	X	C	Seleccionada por
EBV10_1	-	-	
EBV10_2	-	-	
EBV10_3	-	-	
EBV10_4	-	-	
EBV10_5	-	-	
EBV10_7	+	+	POR ACTIVIDAD XILANASA
EBV11_12	-	+	POR ACTIVIDAD CELULASA
EBV12_13 A	-	+	
EBV12_13 B	-	-	
EBV12_14	-	+	POR ACTIVIDAD CELULASA
EBV12_15B	-	+	POR ACTIVIDAD CELULASA
EBV12_16	-	-	
EBV12_17	+	+	POR AMBAS ACTIVIDADES
EBV12_18	-	-	
EBV12_19_A	+	+	POR AMBAS ACTIVIDADES
EBV12_19_B	+	-	POR ACTIVIDAD XILANASA
EBV12_21_A	+	+	POR AMBAS ACTIVIDADES
EBV12_21_B	+	+	POR AMBAS ACTIVIDADES
EBV12_21_C	-	-	
EBV12_22	+	+	POR AMBAS ACTIVIDADES
EBV12_23_A	-	+	POR ACTIVIDAD CELULASA

EBV12_23_B	-	-	
EBV12_24	-	-	
EBV13_32	-	-	
EBV13_34	-	-	
EBV13_35	-	-	
EBV13_36	-	-	
<b>EBV14_41</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>POR AMBAS ACTIVIDADES</b>
<b>EBV14_42</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>POR ACTIVIDAD CELULASA</b>
EBV17_45	-	-	
<b>EBV17_46</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>POR AMBAS ACTIVIDADES</b>
EBV17_47	-	-	
EBV17_48	-	-	
EBV17_49	-	-	
EBV94_1	-	-	
EBV94_2	-	-	
EBV94_3	+	+	
EBV94_4	-	-	
EBV94_5	-	-	
EBV94_8	-	-	
<b>EBV96_21_A</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>POR AMBAS ACTIVIDADES</b>
EBV96_40	+	-	
EBV96_41	-	+	
EBV96_42	+	+	
EBV96_43A	-	-	
EBV96_43B	-	-	
EBV96_44	+	+	
EBV96_45	+	+	
EBV96_46	+	+	
EBV96_47	+	-	
EBV96_49	+	+	
EBV96_51	+	+	
EBV96_52	-	+	
EBV96_53	-	-	
EBV96_54	-	-	
EBV96_55	+	-	
EBV96_57	-	+	
EBV96_60	+	+	
EBV96_61	-	-	
EBV96_62	+	+	
EBV96_63	+	+	
EBV96_65	-	+	
EBV96_67	-	-	
EBV96_68	-	+	
<b>EBV97_34</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>POR AMBAS ACTIVIDADES</b>
<b>EBV97_72</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>POR AMBAS ACTIVIDADES</b>

EBV97_74	+	+	
EBV97_75	+	+	
EBV97_76	+	-	
<b>EBV97_78</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>POR AMBAS ACTIVIDADES</b>
EBV97_79	-	-	
EBV97_80_A	-	-	
EBV97_81	-	-	
EBV97_82	-	-	
EBV97_84	-	-	
EBV97_89	-	+	
EBV97_90	-	-	
EBV97_91	-	-	
EBV97_92	-	+	

### 5.2.1.1. CELULASA

A partir de las bacterias seleccionadas, se midió actividad en los medios líquidos. En el caso de la actividad celulasa, todas las cepas analizadas mostraron valores bajos de actividad, las mayores se observan en general en los medios nutrientes con CMC (Figura 28).

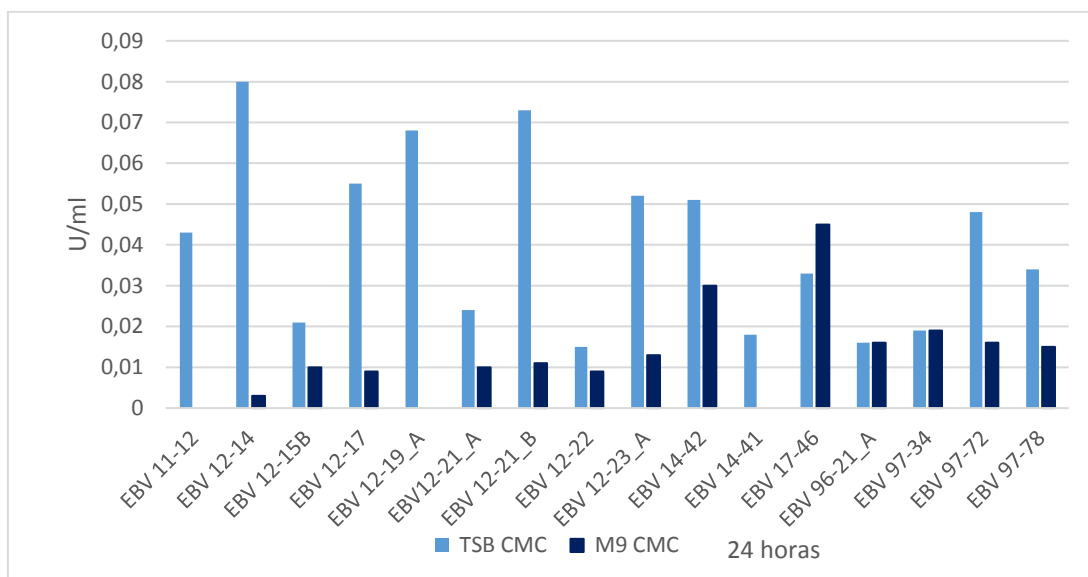


Figura 28- Actividad celulasa medida en las bacterias seleccionadas en los medios de cultivo TSB CMC (medio nutriente más carboximetilcelulosa) y M9 CMC (medio mínimo más carboximetilcelulosa).

En algunos cultivos en medio mínimo con CMC no se detectó actividad, como en el caso de EBV11-12, EBV12-19-A y EBV14-41. Mientras que las mayores actividades alcanzadas fueron de 0.08 U/ml para EBV12-14 en medio nutriente con CMC y de 0.045 para EBV17-46 en medio mínimo con CMC. Los bajos valores de actividad celulasa obtenidos son similares a los reportados por otros investigadores. En el estudio de Ghio y colaboradores en el que aislaron una cepa de *Paenibacillus* sp. A59 se analizó además

de la actividad xilanasa, la actividad celulasa en medios mínimos y nutrientes con el agregado de los polímeros o sustratos lignocelulósicos. La actividad endoglucanasa (medida con CMC) a las 24 horas fue menor a 0.05 U/ml mientras que el máximo de actividad se obtuvo a las 72 horas de crecimiento (0.46 U/ml) en el medio mínimo con el agregado de CMC (Ghio *et al.*, 2016).

Otros reportes de bacterias aisladas, siguieron otros criterios de selección y llegaron a elegir cepas con actividad celulasa máxima en cultivos líquidos con más tiempo de crecimiento. En un estudio en el que se aislaron 32 bacterias del tracto gastrointestinal de un caracol de África (Dar *et al.*, 2015), 18 mostraron actividad en medio sólido pero seleccionaron 5 para seguir trabajando. Una de ellas, identificada como *Ochrobactrum* sp. fue la que mostró la mayor actividad endo-celulasa en medio líquido luego de 14 días de incubación y la mayor actividad exo-celulasa se encontró en una bacteria de la especie *Bacillus subtilis* luego de 10 días de crecimiento.

### 5.2.1.2. XILANASA

Al realizar la medición de actividad xilanasa se pudo determinar que dentro de las cepas bacterianas, 9 mostraron mayor actividad en el medio TSB adicionado con xilano (TSB Xil) y 2 en el medio M9 adicionado con xilano (M9 Xil) (Figura 29).

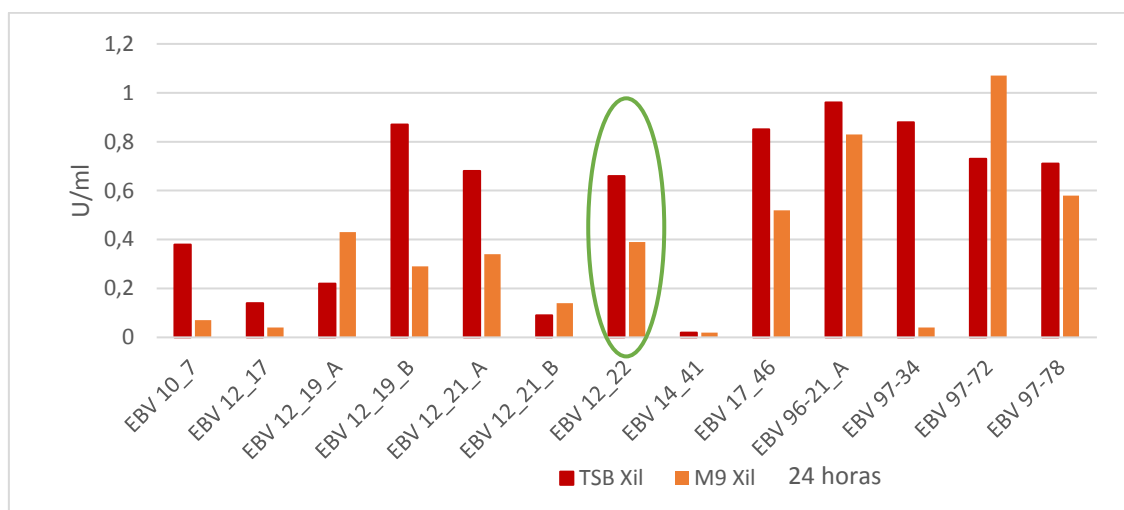


Figura 29- Actividad xilanasa medida en las bacterias seleccionadas, en los medios de cultivo TSB Xil (medio nutriente más xilano) y M9 Xil (medio mínimo más xilano).

Las actividades xilanasa medidas en bacterias estuvieron entre 0.02 y 1.07 U/ml para EBV14-41 y EBV97-72 en los medios mínimos más xilano y la máxima actividad en medio nutriente fue de 0.96 U/ml para EBV96-21-A. Los resultados obtenidos son comparables a otros reportes en los que se estudiaron condiciones similares de producción de xilanasa por bacterias. En el estudio realizado por Amore y su equipo, luego del aislamiento de bacterias, realizaron un cribado cuantitativo de actividades en medio



mínimo líquido, con el agregado de xilano de haya comercial. Las actividades medidas fueron de 0.4 a 0.6 U/ml a las 24 horas de crecimiento (Amore *et al.*, 2015). En otros estudios en los que siguieron la actividad en el tiempo, observaron que la actividad aumentó luego de las 24 horas. Al aislar una cepa de *Paenibacillus* sp. A59 Ghio y colaboradores analizaron la actividad xilanasa en medios mínimos y ricos con el agregado de los polímeros comerciales o sustratos lignocelulósicos. La actividad xilanasa fue de 1.8 U/ml a las 24 horas y el máximo se obtuvo a las 72 horas (3.66 U/ml) en el medio mínimo con xilano de haya comercial (Ghio *et al.*, 2016). De estos datos queda clara la importancia del agregado de xilano al medio de cultivo en la producción de xilanasas.

El xilano comercial es un sustrato caro y que no se obtiene fácilmente, por lo tanto luego de encontrar cepas de interés, es importante evaluar la producción enzimática con medios más baratos. Otros investigadores observaron que las máximas actividades xilanólíticas medidas en bacterias se obtuvieron en los medios con residuos lignocelulósicos. Es el caso de un aislamiento de bacterias a partir de estiércol de diversos rumiantes, donde de un total de 249 bacterias aisladas, se seleccionaron 65 de un cribado cualitativo de xilanasas en placa. Luego estudiaron la producción en medio líquido de tres de estas cepas y observaron que el máximo de actividad se encontró a las 24 horas de crecimiento (3.5 U/ml) en un medio con salvado de trigo (Thite y Nerurkar, 2015). Estos reportes abren la posibilidad de desarrollar nuevos medios de cultivo con las cepas seleccionadas.

En esta tesis se seleccionó para continuar los estudios de actividad xilanasa, la bacteria EBV 12-22 (enmarcada en un círculo verde en la figura 29), endófito de ramas, porque mostró un valor de actividad xilanasa considerable y fue de las que se midió actividad celulasa más baja. Se seleccionó de esta forma para trabajar una actividad enzimática por microorganismo.

### 5.2.2. Cribados cualitativo y cuantitativo de actividad celulasa y xilanasa en las levaduras seleccionadas

En la presente tesis, se aislaron 6 levaduras, 3 mostraron solo actividad xilanasa y 1 celulasa. En este caso todas las que fueron positivas se seleccionaron para su posterior estudio en medio líquido.

En el caso de trabajos sobre levaduras con actividad celulasa, el número de publicaciones es bajo. Algunos géneros como *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Candida*, *Sporobolomyces*, *Aureobasidium*, *Cystobasidium* se reportaron como productores de diferentes tipos de

celulasas, todas aisladas de suelos donde había madera en descomposición (Strauss *et al.*, 2001; Baldrian y Valášková, 2008; Mattam *et al.*, 2016; Vyas y Chhabra, 2017). Los resultados de cantidad de levaduras con actividad celulasa en relación al total de aislamientos obtenidos en esta tesis son mayores que los obtenidos en el trabajo de Jiménez y colaboradores donde en un cribado realizado sobre 51 géneros de levaduras aisladas solo dos mostraron alta actividad celulasa (Jiménez *et al.*, 1991).

La cantidad de estudios sobre aislamientos de levaduras con actividad xilanasas, es un poco mayor que en el caso anterior, pero es baja en comparación con aquellos en los que se estudiaron bacterias y hongos filamentosos. Algunos son de gran interés ya que se describió una nueva especie, como *Pseudozyma brasiliensis* (Oliveira *et al.*, 2014) aislada del tracto gastrointestinal de un coleóptero asociado a las raíces de la caña de azúcar en Brasil, la cual se reportó posteriormente como productora de una endoxilanasas (Borges *et al.*, 2014). Otros géneros obtenidos en aislamientos de levaduras productoras de xilanasas comprenden a *Candida*, *Meyerozyma*, *Scheffersomyces*, *Sugiyamaella*, *Cryptococcus* y *Trichosporon*, aisladas de madera en descomposición y bagazo de caña de azúcar de diferentes regiones de Brasil (Lara *et al.*, 2014). En ese estudio aislaron 358 cepas de levadura, de ellas 75 dieron positivas como productoras de xilanasas en medio sólido (21 % de las cepas). El porcentaje de cepas con actividad xilanasas respecto al total de aisladas es menor que el reportado en esta tesis (50 % positivas en actividad xilanasas).

En la Tabla 6, a continuación, se resumen las actividades obtenidas de las levaduras seleccionadas.

Tabla 6- Levaduras seleccionadas del cribado cualitativo en placa de actividades xilanasas y celulasa. X =xilanasas / C=celulasa

Código	X	C	Seleccionada por
EBV12_15A	-	-	
EBV13_37	+	-	POR ACTIVIDAD XILANASA
EBV16_44	-	-	
EBV96_64	+	-	POR ACTIVIDAD XILANASA
EBV96_86	-	+	POR ACTIVIDAD CELULASA
EBV97_87	+	-	POR ACTIVIDAD XILANASA

### 5.2.2.1. CELULASA

Una cepa de levadura mostró halo de degradación en medio sólido y CMC y se seleccionó para medir su actividad en medio líquido. A las 48 horas, las actividades en los medios nutriente y mínimo fueron de 0.14 y 0.04 U/ml respectivamente (Figura 30). Los resultados en el medio mínimo son similares a los obtenidos por Vyas y Chhabra, que estudiaron entre otras actividades, la actividad celulasa de una cepa de

*Cystobasidium oligophagum* aislada a partir de suelo rico en residuos de celulosa. Midieron la actividad en un medio mínimo con el agregado de CMC y mostró a las 48 horas actividades de FPasa de aproximadamente 0.01 U/ml, siendo máximas a las 72 horas (0.04 U/ml) (Vyas y Chhabra, 2017).

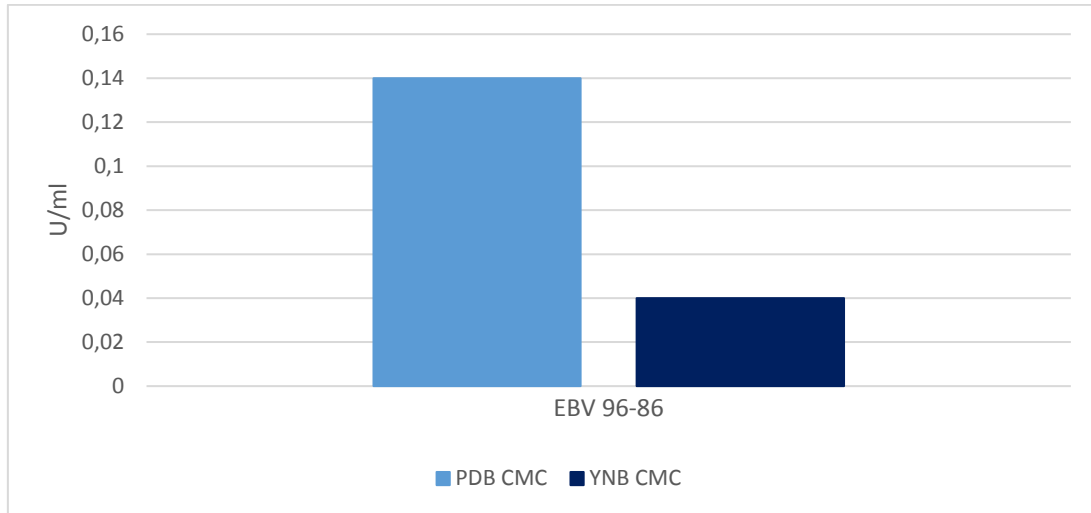


Figura 30- Actividad celulasa de la levadura seleccionada (EBV 96-86) en los medios de cultivo PDB CMC (medio nutriente más carboximetilcelulosa) y YNB CMC (medio mínimo más carboximetilcelulosa).

Al ser la única levadura ensayada y al analizar los resultados cuantitativos obtenidos se seleccionó para continuar los estudios de producción de celulasa.

#### 5.2.2.2. XILANASA

Respecto a las 3 levaduras ensayadas en la actividad xilanasa, EBV 96-64 fue la que mostró actividad más baja. En el caso de EBV 13-37 se midió una actividad de 0.80 U/ml en el medio nutriente (PDB + xilano) y 0.37 U/ml en el medio mínimo (YNB + xilano). Para el caso de EBV 97-87 se invierten los resultados (enmarcada en círculo verde en la Figura 31), siendo mayor la actividad en el medio mínimo (0.42 U/ml en PDB Xil y 0.80 U/ml en YNB Xil).

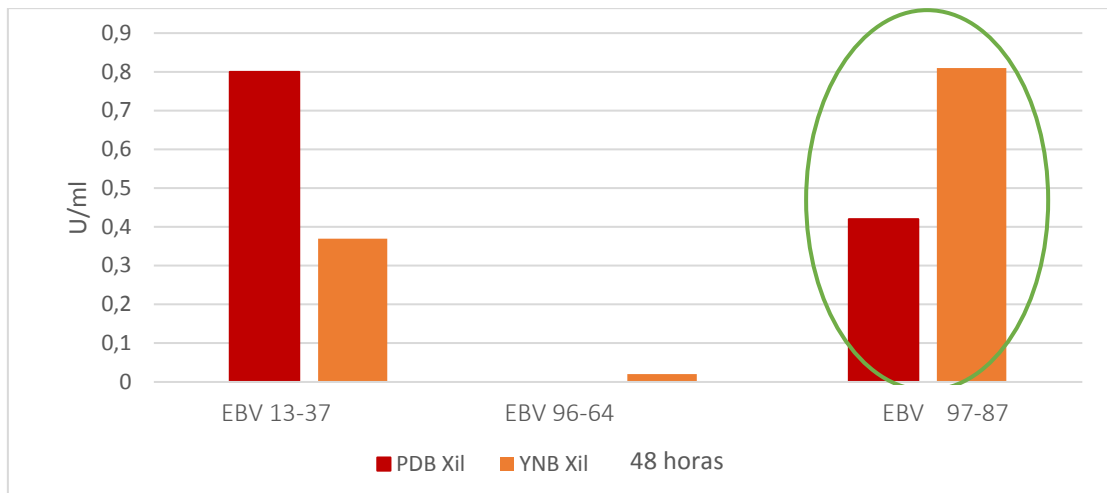


Figura 31 - Actividad xilanasa medida en las levaduras seleccionadas, en los medios de cultivo PDB Xil (medio nutriente más xilano) e YNB Xil (medio mínimo más xilano).

Estos resultados son ligeramente menores que los obtenidos por otros autores que utilizaron un medio mínimo con el agregado de xilano comercial para inducir la actividad xilanasa. En el estudio llevado a cabo por Lara y colaboradores se ensayó la actividad xilanasa sobre 21 cepas de levaduras aisladas de madera en descomposición y bagazo de caña de azúcar, en medio líquido utilizando xilano de haya como fuente de carbono y al cabo de 48 horas, se destacó la actividad de una cepa de *Cryptococcus laurentii* UFMG-HB 48, siendo de 1.4 U/ml (Lara *et al.*, 2014). El grupo de Ali, realizó un aislamiento de levaduras a partir de tracto intestinal de termitas, y se obtuvieron 92 cepas. De ellas 25 se identificaron como productoras de xilanasas, además estudiaron su producción en condiciones similares a las de esta tesis, en el medio mínimo YNB con la adición de xilano y la mayor productora fue una cepa identificada como *Candida pseudorhagii* SSA-1542T (1.73 U/ml) esta actividad se midió luego de tres días de cultivo (Ali *et al.*, 2017).

Las máximas actividades en levaduras, se encontraron en EBV97-87 en medio mínimo YNB más xilano y en el caso de EBV13-37 fue máxima en el medio rico. Se decidió seguir trabajando con EBV97-87 ya que es valioso que la única fuente de carbono sea el polímero a biodegradar y obtener actividades altas en medios mínimos ya que en general estos son más simples en su composición. Por lo tanto llevaría menos pasos de purificación de la enzima y además en general son menos costosos si se puede utilizar un residuo como fuente de carbono y energía (Singhania *et al.*, 2015).

### 5.2.3. Cribados cualitativo y cuantitativo de actividad celulasa y xilanasa en los hongos filamentosos seleccionados

En el presente trabajo se aislaron 58 cepas de hongos filamentosos, de los cuales se encontró que 28 mostraron ambas actividades (48%), 9 xilanasas y 8 celulasa (Tabla 7) es importante señalar que a pesar de que la mayoría de los hongos fueron obtenidos en el aislamiento inicial, sin sucesivas etapas de presión selectiva, el 78 % fue positivo a alguna actividad. Estos resultados varían ligeramente respecto a un estudio realizado sobre hongos endófitos aislados sin presión selectiva de cactus forrajero en la región semi-árida al noreste de Brasil, en el que ensayaron 24 especies de las cuales 14 mostraron ambas actividades en el ensayo en placa (58 %). Mientras que todas fueron productoras de xilanasas, ninguna fue productora únicamente de celulasa (Bezerra *et al.*, 2012). En otro estudio encontraron que de 119 hongos filamentosos aislados, 56 mostraron actividad xilanasas en un ensayo en placa con xilano de haya (Robl *et al.*, 2013). Se desprende de estos resultados que debido a su naturaleza de degradadores de materia orgánica, es de esperar que los hongos filamentosos tengan la capacidad de expresar un amplio repertorio de enzimas hidrolíticas aunque no provengan de un medio con presión selectiva.

Para continuar con los estudios de cribado cuantitativo se seleccionaron 7 cepas por ambas actividades, 6 por actividad celulasa y 1 por actividad xilanasas (Tabla 7).

Tabla 7- Hongos filamentosos seleccionados del cribado cualitativo en placa de actividades xilanasas y celulasa. X =xilanasas / C=celulasa

Código	X	C	Seleccionada por
EBV11_10_A	-	-	
EBV11_10_B	-	-	
<b>EBV11_11</b>	-	+	<b>POR ACTIVIDAD CELULASA</b>
<b>EBV11_8</b>	+	+	<b>POR AMBAS ACTIVIDADES</b>
<b>EBV11_9</b>	+	+	<b>POR AMBAS ACTIVIDADES</b>
<b>EBV13_25</b>	+	+	<b>POR AMBAS ACTIVIDADES</b>
<b>EBV13_26</b>	-	+	<b>POR ACTIVIDAD CELULASA</b>
EBV13_27	-	-	
<b>EBV13_28</b>	-	+	<b>POR ACTIVIDAD CELULASA</b>
<b>EBV13_29</b>	-	+	<b>POR ACTIVIDAD CELULASA</b>
EBV13_30	+	-	
EBV13_31	-	-	
EBV14_43	+	-	
<b>EBV14_50</b>	+	+	<b>POR AMBAS ACTIVIDADES</b>
EBV15_38	-	-	
EBV15_39	+	+	
EBV15_40	-	-	
EBV94_10	+	-	
EBV94_11	+	+	
EBV94_12	+	-	

EBV94_6	+	+	
EBV94_7	+	+	
EBV94_9	+	+	
EBV95_13	+	+	
EBV95_14	+	+	
EBV95_16	-	-	
<b>EBV95_17</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>POR AMBAS ACTIVIDADES</b>
EBV95_18_A	+	+	
EBV95_18_B	+	+	
EBV95_19	-	+	
EBV95_20	+	+	
EBV95_21_C	+	-	
EBV95_22	+	+	
<b>EBV96_15</b>	-	<b>+</b>	<b>POR ACTIVIDAD CELULASA</b>
EBV96_23	+	+	
<b>EBV96_24</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>POR AMBAS ACTIVIDADES</b>
<b>EBV96_25</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>POR AMBAS ACTIVIDADES</b>
EBV96_26	+	+	
EBV96_27	+	+	
EBV96_28	+	+	
EBV96_29	-	-	
EBV96_30_A	+	+	
EBV96_31	-	-	
EBV96_32	-	-	
EBV96_33_A	+	-	
EBV96_33_B	-	-	
EBV96_34_B	+	+	
EBV96_35	+	+	
EBV96_36	+	+	
EBV96_37	+	-	
<b>EBV96_38</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>POR ACTIVIDAD XILANASA</b>
EBV96_39	-	-	
EBV96_50	-	-	
EBV96_56	+	-	
EBV96_58	+	+	
<b>EBV99_80_B</b>	-	<b>+</b>	<b>POR ACTIVIDAD CELULASA</b>
EBV99_83	-	+	
EBV99_94	+	+	

### 5.2.3.1. CELULASA

Se analizó la actividad celulasa a las 13 cepas seleccionadas, dos de ellas, mostraron buena actividad celulasa, EBV96-24 (0.28 U/ml) y EBV96-25 (0.37 U/ml) luego de 5 días de crecimiento en el medio nutriente con CMC (Figura 32). Los valores obtenidos están

dentro del rango de las actividades medidas por otros autores. Ramarajan y su equipo evaluaron la producción enzimática de aislamientos realizados y observaron que utilizando CMC en un medio mínimo para el crecimiento de los hongos, lograron una máxima actividad FPasa de 0.07 U/ml luego de 14 días, pero que aumentó, para algunos aislamientos, cuando utilizaron un residuo lignocelulósico como paja de arroz (Ramarajan y Sumathi Manohar, 2017). La actividad medida en esta tesis fue mayor en un menor tiempo de incubación que el reporte citado. Otros investigadores evaluaron cepas de *Penicillium* aisladas de suelos, en relación a una cepa de *Trichoderma* RUT C30 (una cepa mutante capaz de secretar altos niveles de proteínas) y encontraron que en un medio con AVICEL como fuente de carbono se obtuvo similar actividad FPasa entre la cepa mutante y la aislada, con menos cantidad de proteína en la cepa aislada (0.88 U/ml para *Trichoderma*; 0.90 y 0.91 U/ml para las dos cepas de *Penicillium*) después de 5 a 7 días (Marjamaa *et al.*, 2013). Estas actividades FPasa fueron tres veces mayores que las obtenidas en esta tesis, en un tiempo de crecimiento similar. De estos datos se desprende que la capacidad de los hongos filamentosos de expresar las enzimas de interés, es dependiente del metabolismo de los mismos, y además de la selección de la fuente de carbono en la que crecen.

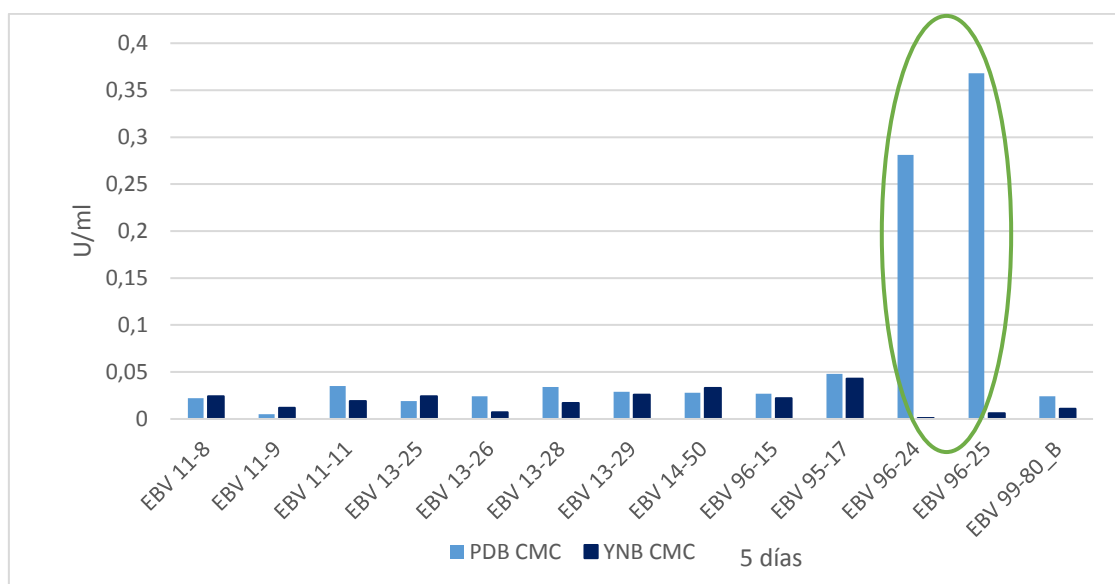


Figura 32 - Actividad celulasa en los hongos filamentosos seleccionados en los medios de cultivo PDB CMC (medio rico más carboximetilcelulosa) y YNB CMC (medio mínimo más carboximetilcelulosa).

Se seleccionó a partir de los resultados obtenidos en el cribado cuantitativo a las cepas con mayor actividad medida, EBV 96-24 y EBV 96-25 (enmarcadas en círculo verde en la figura 32), ambos hongos endófitos de hojas de *E. globulus*, para continuar su estudio de producción de celulasa.

### 5.2.3.2. XILANASA

Al estudiar la actividad xilanasa en los 8 hongos filamentosos seleccionados, los resultados muestran que la cepa EBV 95-17 (enmarcada con círculo verde en Figura 33) mostró la actividad xilanasa más importante dentro de este grupo, alcanzando las 0.86 U/ml en el medio nutriente con xilano. En general en los diferentes reportes de aislamiento y cribado de actividad xilanasa en los hongos se estudia su producción en medio sólido con sustrato lignocelulósico como fuente de carbono y energía, por lo que las unidades enzimáticas no se pueden comparar ya que se expresa como U/g de material usado (Ang *et al.*, 2013; Zhang y Sang, 2015; Marques *et al.*, 2018). Sin embargo, en un estudio de cribado realizado por Robl y colaboradores, sobre 6 cepas de hongos filamentosos en medio líquido con xilano de haya comercial midieron actividad xilanasa luego de 6 días de crecimiento y obtuvieron valores de actividad entre 2.59 y 15.04 U/ml (Robl *et al.*, 2013).

Estos datos indican que los medios, tiempos y el método seleccionado para medir actividad xilanasa fueron eficientes ya que se obtuvieron resultados que permitieron seleccionar una cepa con potencial capacidad de producir enzimas de interés.

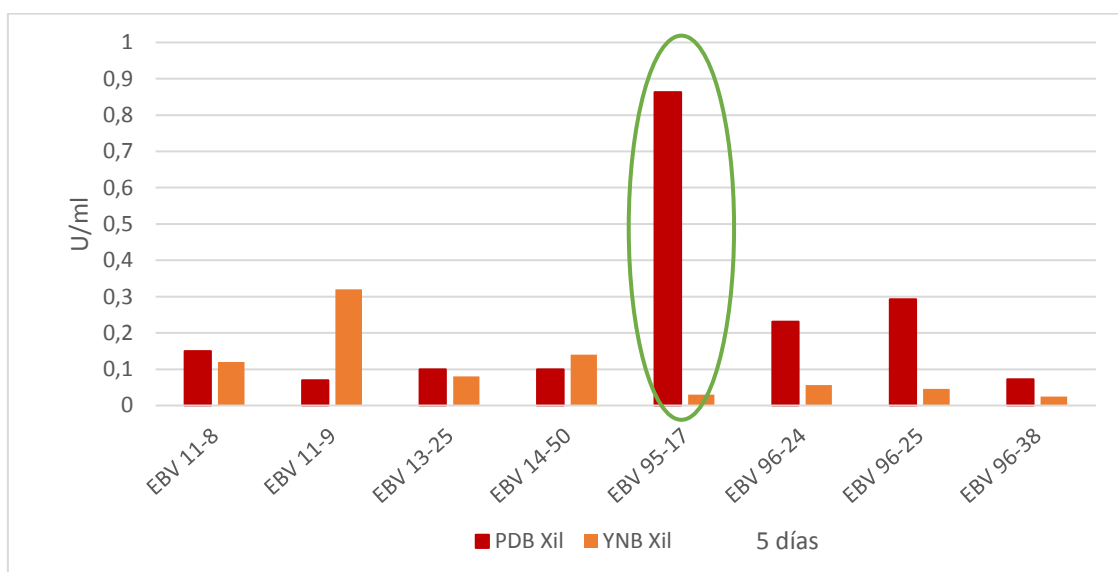


Figura 33 - Actividad xilanasa medida en los hongos filamentosos seleccionados. En PDB Xil (medio rico más xilano) y YNB Xil (medio mínimo más xilano).

La cepa EBV 95-17 se seleccionó como productora de xilanasa para continuar con los estudios de esta enzima.



## 5.3. Conclusiones

---

- Los métodos de cribado fueron útiles para determinar la posibilidad de los aislamientos de producir las enzimas de interés. En todos los casos los resultados estuvieron en los rangos de los valores reportados en bibliografía por lo que apoya el uso de estas técnicas y permite seguir adelante con el resto de los objetivos de la tesis. Los resultados obtenidos en esta etapa afirman la utilidad de aislamiento de microorganismos para obtener actividades enzimáticas de interés.
- El cribado cualitativo resultó rápido para la determinación de las actividades xilanasas y celulasas tanto para bacterias, levaduras y hongos en un periodo corto de tiempo y que disminuye el tiempo que se consumiría al probar todas las cepas en un cribado cuantitativo. Mediante el empleo de esta técnica se logró seleccionar 18 bacterias, 4 levaduras y 14 hongos filamentosos para proseguir con el cribado cuantitativo.
- La evaluación de las actividades en el cribado cuantitativo permitió tener una visión general y más profunda que el cribado cualitativo sobre el comportamiento de crecimiento y producción enzimática de los microorganismos en dos medios de cultivo uno nutriente y uno mínimo. A partir de estas observaciones se realizó una selección de las cepas con las que seguir trabajando enfocada a la producción de estas enzimas.
- Se seleccionaron la levadura EBV 96-86 y los hongos EBV 96-24 y EBV 96-25 para continuar su estudio en la producción de enzima celulasa.
- Se seleccionaron la bacteria EBV 12-22, la levadura EBV 97-87 y el hongo filamentosos EBV 95-17 para continuar su estudio en la producción de enzima xilanasas.

## 6. Identificación de los microorganismos seleccionados

### 6.1. Metodología

---

#### 6.1.1. Bacterias

##### 6.1.1.1. Análisis microscópico: Tinción de Gram

Se preparó un frotis de cada uno de los microorganismos y se procedió a realizar la tinción de Gram. Se incluyeron como controles de la tinción un cultivo puro de una cepa de *Staphylococcus aureus* (coco, Gram positivo) y una cepa de *Escherichia coli* (bacilo, Gram negativo).

##### 6.1.1.2. Identificación taxonómica:

La identificación de la bacteria seleccionada se llevó a cabo mediante la amplificación y el secuenciado del gen del ARN ribosomal 16S. Se utilizaron los cebadores universales para Eubacterias (Weisburg *et al.*, 1991): 27 forward (5'-AGAGTTTGATC(A/C)TGGCTCAG-3') y 1492 reverse (5'-ACGG(C/T)TACCTTGTTACGACTT-3'). Se secuenció con los cebadores 518 forward (5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3') y 1492 reverse (5'-ACGG(C/T)TACCTTGTTACGACTT-3').

##### *Extracción de ADN genómico bacteriano*

A partir de un cultivo de 24 horas en placa de TSA se tomó una colonia y se sembró en 5 ml de TSB. Se incubó a 28 °C a 150 rpm durante 12 horas. Se tomó 1 ml del cultivo y se realizó la extracción de ADN genómico con el kit comercial PureLink™ Genomic DNA Kit (Invitrogen®) y se siguieron los pasos que se describen a continuación.

##### Bacterias Gram positivas:

1. Se centrifugó 1 ml del pre-cultivo overnight ( $2 \times 10^9$  células) a 12000 rpm por 15 minutos a 4 °C.
2. Se suspendió el pellet en 100 µl de una solución de lisozima (10 mg/ml).
3. Se realizó la rotura mecánica de las células agitando en vórtex.
4. Se incubó a 37 °C durante 30 minutos agitando en vórtex cada 30 minutos.
5. Se agregaron 20 µl de proteinasa K (10 mg/ml). Se agitó con vórtex.
6. Se agregaron 200 µL PureLink® Genomic Lysis/Binding Buffer y se mezcló bien utilizando el vórtex.

7. Se incubó durante 30 minutos a 65°C.
8. Se agregó 750 µl de etanol. Se centrifugó a 10000 rpm durante 30 minutos a 4 °C. Se removió el sobrenadante.
9. Se disolvió el ADN en agua miliQ.

Concentración de ADN genómico:

1. Se agregaron 500 µl de etanol 96% y 5 µl de NaCl 4M cada 200 µl de muestra.
2. Se dejó reposar a -20 °C overnight.
3. Se centrifugaron las muestras a 10000 rpm durante 15 minutos a 4 °C.
4. Se descartó el sobrenadante y se suspendió el pellet con 200 µl de etanol 70%.
5. Se centrifugaron las muestras a 10000 rpm durante 15 minutos a 4 °C.
6. Se descartó el sobrenadante y se secó el pellet a temperatura ambiente.
7. Se disolvió el ADN genómico en 30 ml de agua miliQ.

#### *Amplificación por PCR (Polymerase Chain Reaction)*

A partir del ADN genómico obtenido se amplificó por PCR el gen del ARN ribosomal 16S utilizando los cebadores 27 forward y 1492 reverse. Las reacciones de PCR se realizaron de acuerdo con el protocolo provisto por Invitrogen para la enzima Platinum Taq polimerasa.

En la Figura 34 se muestra el programa de PCR empleado para la amplificación del gen del ARN ribosomal 16S de las cepas bacterianas.

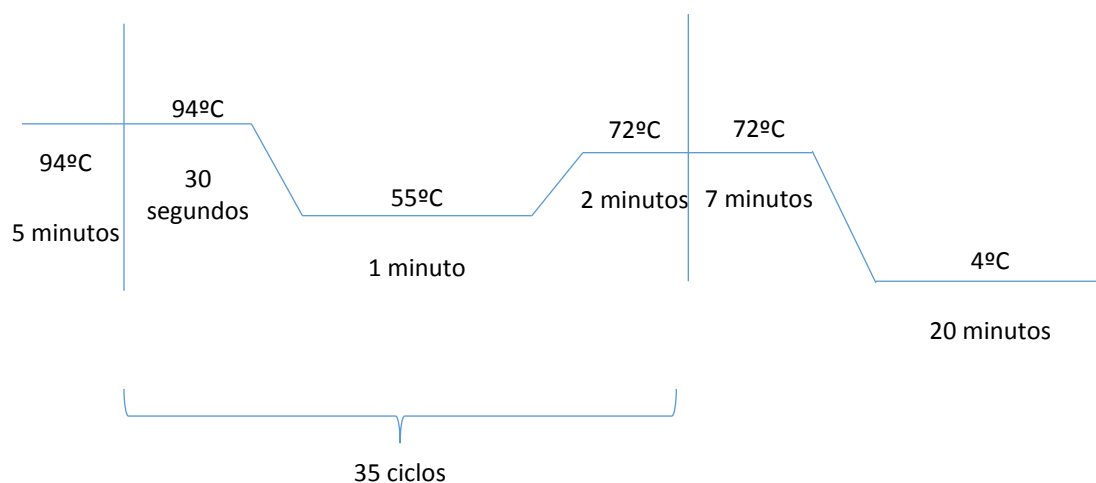


Figura 34 - Programa de PCR utilizado para la amplificación del gen del ARN ribosomal 16S de las cepas bacterianas

### *Visualización y determinación de los tamaños de los productos de amplificación.*

Para determinar tanto la integridad y cantidad de ADN genómico como del producto de amplificación se realizó una electroforesis en gel de agarosa 0.8% p/v en buffer TBE 0.5X y visualizador. Se corrió en paralelo un marcador de peso molecular (Gene Ruler 1Kb DNA LADDER, Fermentas<sup>®</sup>) de forma de determinar el tamaño y poder estimar la concentración de ADN. Se fotografió bajo luz UV con cámara digital Kodak DC120 (Kodak digital Science) y se convirtió a un archivo de imagen usando el Sistema de Análisis y Documentación de Electroforesis 120 de Kodak (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA).

### *Secuenciado de los genes del ARN ribosomal 16S.*

El producto de PCR fue secuenciado con un secuenciador automático ABI 3730XL Applied Biosystems en Macrogen Corp. Seoul, Korea.

Para el secuenciado de las cepas aisladas se emplearon los cebadores 518F y 1492R descritos anteriormente.

### *Identificación mediante comparación de la región amplificada.*

Las secuencias obtenidas fueron analizadas, alineadas y ensambladas utilizando el programa Vector NTI 10.3 Advance TM. La secuencia depurada fue comparada con secuencias relacionadas en la base de datos del GenBank usando BLAST (National Center for Biotechnology Information)(Altschul *et al.*, 1990).

## 6.1.2. Levaduras

### 6.1.2.1. Análisis microscópico: Tinción con cristal violeta.

Se preparó un frotis de cada una de las levaduras obtenidas.

Se observaron los preparados obtenidos al microscopio (40X y 100X) para visualizar la morfología de las células.

### 6.1.2.2. Identificación taxonómica:

Para el caso de las levaduras aisladas se amplificó la región entre ITS1-5.8SrDNA y D1-D2 utilizando los cebadores ITS1 forward (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) y NL4 reverse (TCCTCCGCT TATTGATATGC). Para secuenciar se utilizó NL4 R. Las secuencias se compararon en GenBank.

### *Extracción de ADN genómico de levaduras*

Para la extracción de ADN genómico de las cepas de levadura aisladas se utilizó el protocolo del kit comercial de ZYMO RESEARCH, ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™.

Se tomó con un ansa todas las colonias de una placa de PDA con la cepa de levadura crecida durante 48 horas a 28 °C (aproximadamente entre 100 y 200 mg peso húmedo) y se pasó a un tubo para lisar las células ZR BashingBead™ Lysis Tube.

1. Se agregaron 200 µl de agua miliQ para suspender las células. Al mismo se agregaron 750 µl de la solución para lisar.
2. Se agitó en vórtex durante 15 minutos a máxima velocidad.
3. Se centrifugó en una micro-centrífuga a 10000 x g durante 1 minuto.
4. Se transfirieron hasta 400 µl del sobrenadante a un Zymo-Spin™ IV Spin Filter en un tubo colector y se centrifugó a 7000 rpm durante 1 minuto.
5. Se agregaron 1,200 µl de Fungal/Bacterial DNA Binding Buffer al filtrado en el tubo colector del paso anterior.
6. Se transfirieron 800 µl de la mezcla del paso 5 a un Zymo-Spin™ IIC Column en un nuevo tubo colector y se centrifugó a 10000 x g durante 1 minuto.
7. Se descartó el sobrenadante del tubo colector y se repitió el paso 6.
8. Se agregaron 200 µl de DNA Pre-Wash Buffer a la Zymo-Spin™ IIC Column en un nuevo tubo colector y se centrifugó a 10000 x g durante 1 minuto.
9. Se agregaron 500 µl de Fungal/Bacterial DNA Wash Buffer a la Zymo-Spin™ IIC Column y se centrifugó a 10000 x g durante 1 minuto.
10. Se transfirió la Zymo-Spin™ IIC Column a un eppendorff nuevo, se agregaron 100 µl de DNA Elution Buffer directo a la matriz de la columna. Se centrifugó a 10000 x g durante 30 segundos para eluir el ADN.

*Visualización y determinación de los tamaños de los productos de amplificación.*

Los ADN extraídos de las cepas fúngicas fueron visualizados y cuantificados en gel de agarosa de acuerdo a lo descrito anteriormente.

*Amplificación por PCR (Polymerase Chain Reaction)*

A partir de los ADN genómicos de las cepas fúngicas se llevó a cabo la amplificación mediante PCR de la región comprendida entre ITS1-5.8SrDNA y D1-D2 utilizando los cebadores ITS1 F y NL4 R.

Las reacciones de PCR se realizaron de acuerdo con el protocolo provisto por Invitrogen para la enzima Platinum Taq polimerasa.

El programa de PCR empleado para la amplificación de la región de las cepas fúngicas es el mismo que para bacterias.

*Secuenciado de la región amplificada.*

Los productos de PCR fueron secuenciados con un secuenciador automático ABI 3730XL Applied Biosystems en Macrogen Corp. Seoul, Korea.

Para el secuenciado de las cepas aisladas se empleó el cebador NL4 R.

*Identificación mediante comparación de la región amplificada.*

Las secuencias obtenidas fueron analizadas, alineadas y ensambladas utilizando el programa Vector NTI 10.3 Advance TM. Las secuencias depuradas fueron comparadas con secuencias relacionadas en la base de datos del GenBank usando BLAST (National Center for Biotechnology Information) (Altschul *et al.*, 1990).

### 6.1.3. Hongos filamentosos

#### 6.1.3.1. Análisis microscópico:

A partir de un cultivo de 7 días en placa de PDA se tomó mediante cinta adhesiva, micelio del bode de las colonias, se colocó en el portaobjetos sobre una gota de agua y se observó la morfología al microscopio (40X). Se utilizó el manual de identificación “Fungi and food spoilage” (Pitt y Hocking, 2009) para comparar con las especies conocidas y llegar a una aproximación de género.

#### 6.1.3.2. Identificación taxonómica:

Se llevó a cabo de la misma forma que se realizó para las levaduras, pero con los cebadores ITS1 forward (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) y ITS4 reverse (TCCTCCCGCTTATTGATATGC).

## 6.2. Resultados y discusión

---

Se debe considerar que el nivel de expresión enzimático es género y cepa dependiente, por lo cual la selección de la cepa con la cual trabajar fue uno de los primeros aspectos considerados en la estrategia empleada en este trabajo. Al tener en cuenta la necesidad de conocer las cepas seleccionadas, para poder realizar un estudio en profundidad de la producción de las enzimas de interés, es que se realizó la identificación de los microorganismos.

Para la producción de celulasas se seleccionaron tres cepas EBV96-86, EBV96-24 y EBV96-25. Esta última se contaminó con un hongo esporulado y no se pudo continuar su caracterización debido a que no se logró obtener nuevamente un cultivo puro del microorganismo. En la Tabla 8 se muestran los resultados obtenidos del BLAST realizado.

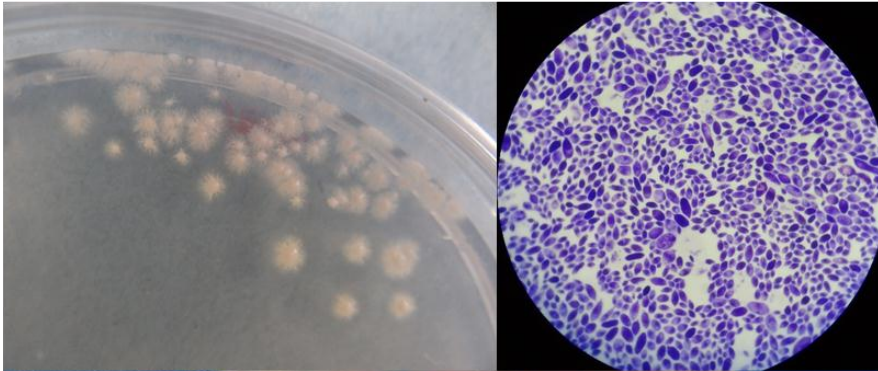
Tabla 8- Identificación de las cepas seleccionadas basada en las secuencias de los genes analizados

Código del m.o.	Origen	Actividad de interés	Principales resultados de búsqueda de BLAST (número de acceso de GenBank)	Identidad (%)	pB analizados
EBV 96-86	Epífita de hojas (2 <sup>do</sup> subcultivo)	Celulasa	<i>Aureobasidium pullulans</i> (KT693733.1)	92	411
EBV 96-24	Endófito de hojas (cultivo inicial)	Celulasa	<i>Preussia</i> sp. (KF128821 1)	92	237
EBV 12-22	Endófito de ramas (1 <sup>er</sup> subcultivo)	Xilanasa	<i>Bacillus safensis</i> (CP010405.1)	100	815
EBV 97-87	Epífita de hojas (2 <sup>do</sup> subcultivo)	Xilanasa	<i>Pseudozyma aphidis</i> (AB089363.1)	100	564
EBV 95-17	Epífita de corteza (cultivo inicial)	Xilanasa	<i>Penicillium oledzkii</i> (NR_138317.1)	100	410

La levadura EBV 96-86, Figura 35, corresponde al género *Aureobasidium* sp. A 28 °C se desarrolla como colonias cremosas o rosa claro. Posteriormente se van ennegreciendo hasta casi ser completamente negras. Al microscopio se observan células elípticas de diversos tamaños.

## EBV 96-86

3 días de crecimiento



14 días de crecimiento

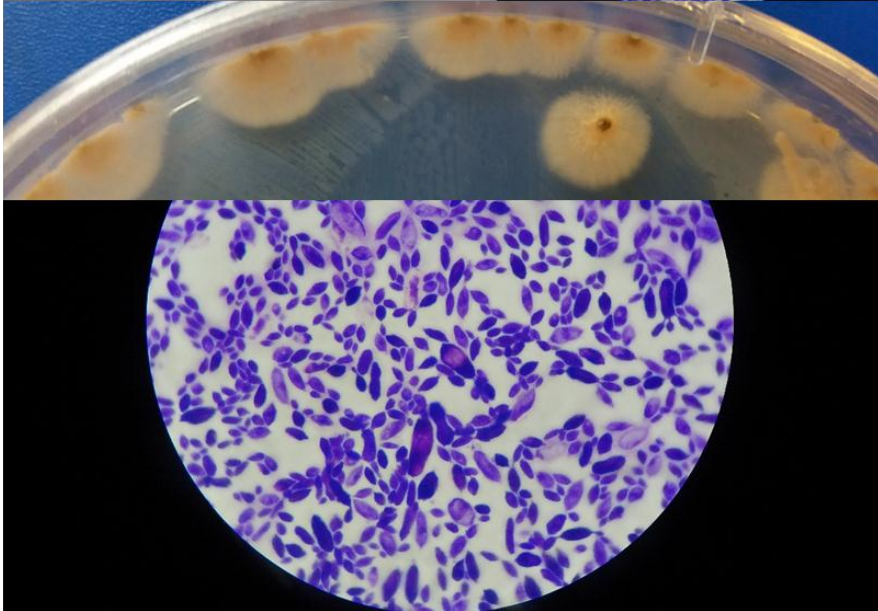


Figura 35- Levadura EBV 96-86. Arriba a la izquierda y medio: observación macroscópica de las colonias, Arriba a la derecha y abajo: Observación al microscopio (aumento 100X) de suspensión de una colonia teñida con azul de metileno.

Este hongo crece como levadura bajo ciertas condiciones de crecimiento, es cosmopolita y popularmente conocido como levadura negra debido a su producción de melanina (Chi *et al.*, 2009). Se lo ha detectado en varios ambientes, principalmente en el suelo, incluidos los suelos antárticos, también en el agua, la madera, otros materiales vegetales y rocas (Urzi *et al.*, 1999). *A. pullulans* tiene muchos usos en diferentes campos biotecnológicos debido a su capacidad para producir pululanos (Duan *et al.*, 2008) y proteína unicelular (Chi *et al.*, 2008). Además este género produce enzimas extracelulares, como lipasas y proteasa, entre ellas, también se ha reportado su capacidad de producir otras enzimas hidrolíticas como xilanasas y celulasas (Jiménez *et al.*, 1991; Leite *et al.*, 2007; Rong *et al.*, 2015).

El hongo EBV 96-24, Figura 36, correspondiente al género *Preussia* sp. la colonia en la placa de PDA a 28 °C, tiene aspecto seco, de color crema, con elevaciones medias, sin la



producción de conidios asexuales en los primeros 10 días de crecimiento. Luego de 15 días se observa la coloración de la colonia hacia un color más amarronado y al microscopio se distinguen conidios (Figura 37 derecha y arriba). Se observa además la formación de un tipo de pseudoparénquima, que se describen como células empaquetadas con forma circular u oval con estructuras en la que las hifas pierden la individualidad y no se distinguen (Figura 37 inferior derecha).

### **EBV 96-24**

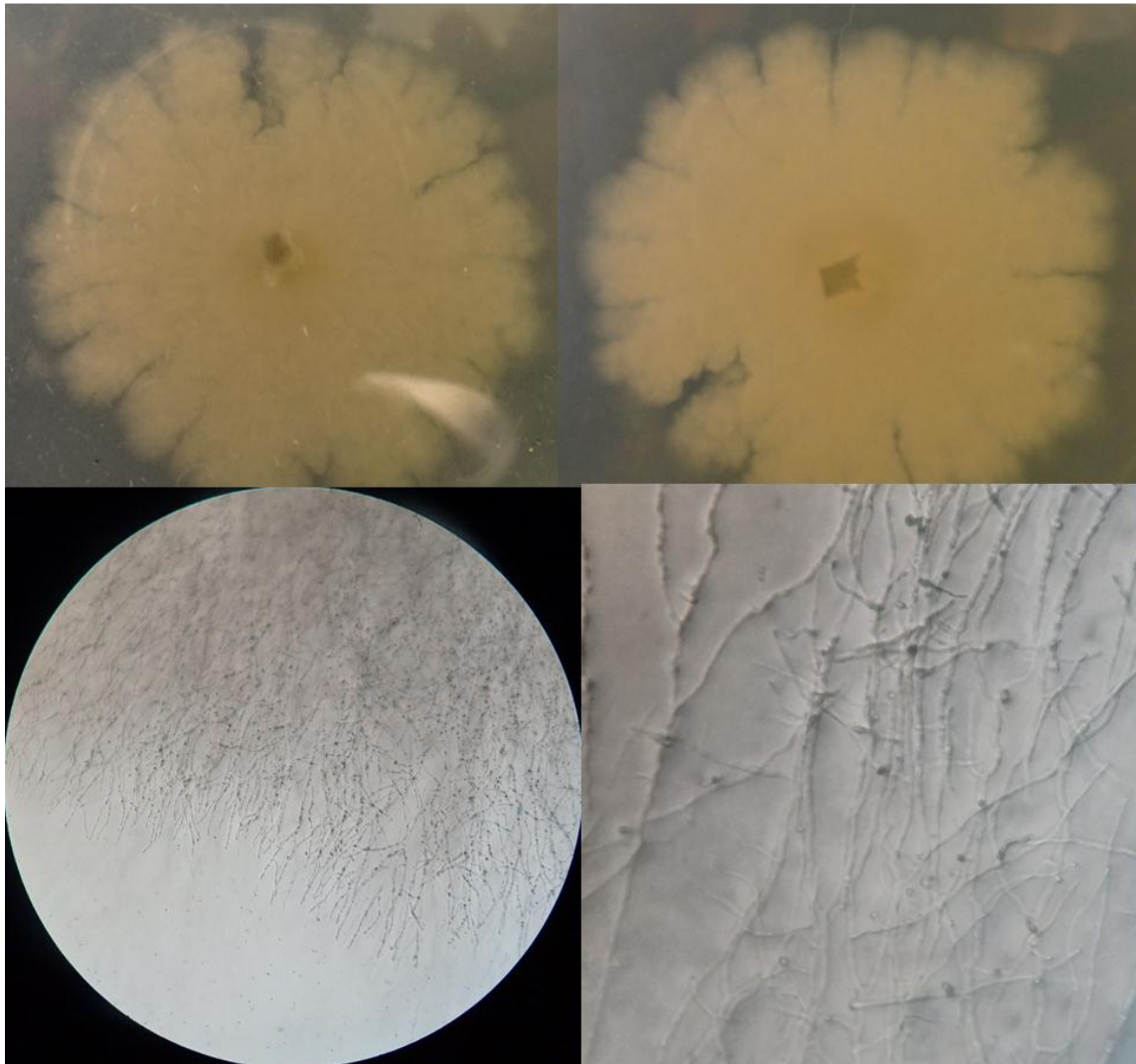


Figura 36 - Hongo filamentoso, EBV 96-24. Arriba: observación macroscópica del micelio (izq: derecho de la placa, der: reverso de la placa). Abajo: Observación al microscopio del micelio izq: aumento 10X Der: aumento 40X.

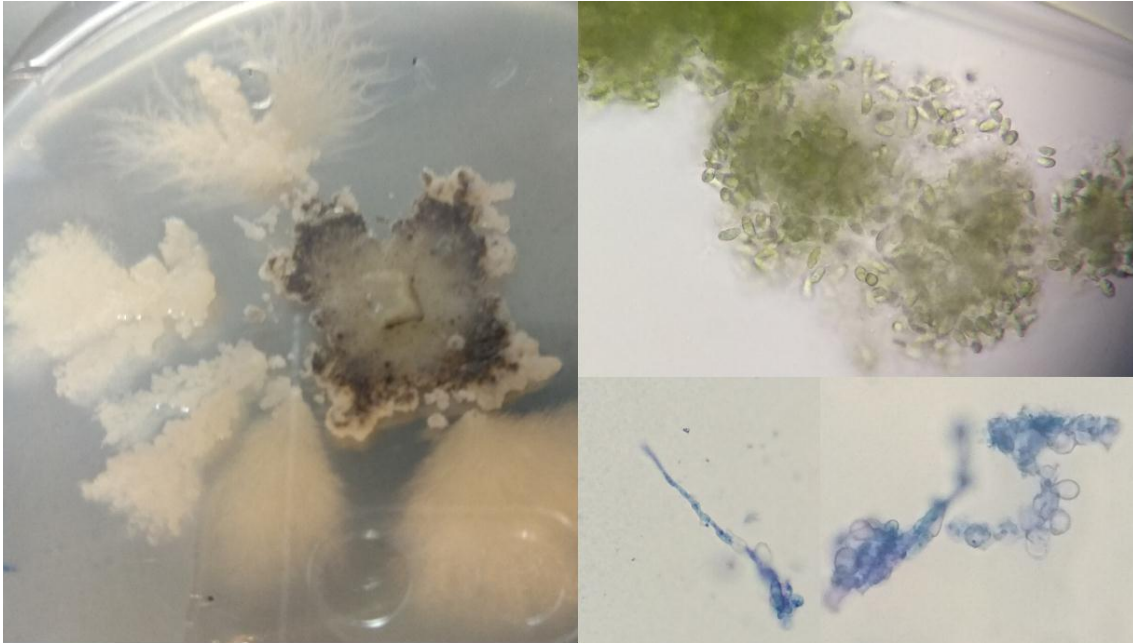


Figura 37 – Izquierda: Colonia en placa de PDA luego de 15 días. Observación de los conidios arriba a la derecha y del pseudoparénquima abajo a la derecha del hongo *Preussia* sp.

El género *Preussia* sp. reúne 96 especies aisladas de suelo, madera, plantas, materia fecal, entre otros, según mycobank (el 24/7/2018) (Robert *et al.*, 2013). Existen pocas referencias sobre celulasas de este género. Por un lado, un aislamiento de hongos de suelos del archipiélago de Svalbard, en Noruega, obtuvieron 30 cepas y una de ellas fue una cepa de *Preussia* sp. la cual mostró actividad celulolítica (Singh *et al.*, 2012). En otro aislamiento de hongos endófitos de un árbol del incienso (*Boswellia sacra*) en Omán, se obtuvieron entre otras, tres aislamientos de *Preussia* sp. a partir de hojas, al igual que la cepa EBV 96-24 aislada en esta tesis, a los cuales les realizaron análisis de producción de celulasa, fosfatasa y glucosidasa y dieron positivos a todas pero con diferentes unidades enzimáticas, por lo tanto podría tratarse de cepas diferentes dentro de un mismo género (Khan *et al.*, 2016). Otras cepas de este género se han aislado como endófitas de diferentes especies de vegetales (Arenal, Platas y Peláez, 2007; Zaferanloo *et al.*, 2014). En esos casos no se determinó su capacidad de producir celulasa ni xilanasas.

Para la producción de enzimas xilanolíticas se seleccionaron tres microorganismos en base a que mostraron mayor actividad enzimática cuando fueron evaluados frente a los demás microorganismos aislados. Estos microorganismos fueron una bacteria, EBV 12-22, una levadura, EBV 97-87, y un hongo filamentoso, EBV 95-17.

De acuerdo con el análisis de la secuencia del 16S rDNA de la cepa seleccionada EBV 12-22, junto con el estudio de sus características morfológicas fue identificada como *Bacillus* sp. La colonia es de forma circular con bordes irregulares, es de color crema, de aspecto seco. Según los estudios morfológicos microscópicos, esta bacteria es gram-positiva, con

forma de bastón y formadora de endosporas y sus células se disponen en cadenas (Figura 38).

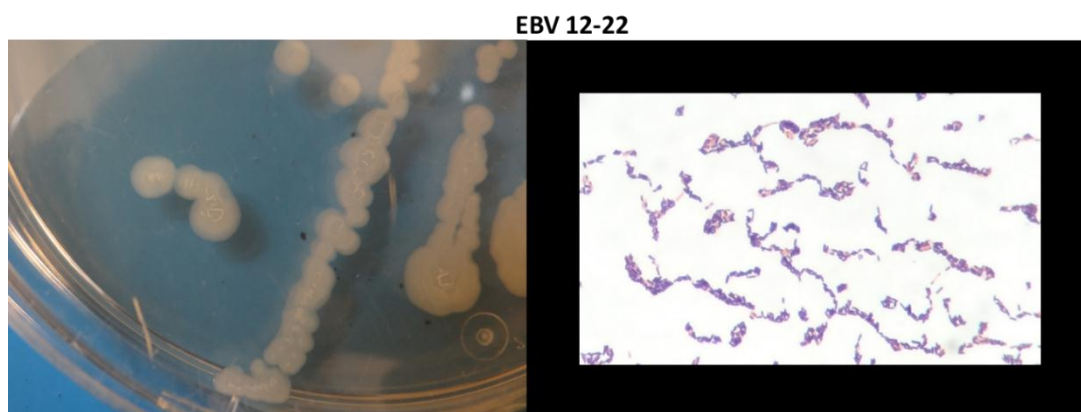


Figura 38 - Bacteria del género *Bacillus* sp. EBV 12-22. Izquierda: Observación macroscópica de las colonias en TSA con un crecimiento de 24 horas a 28°C, Derecha: tinción de Gram del cultivo representado en la foto derecha.

Este género de bacterias se encuentra comúnmente en suelos y plantas, ya que presenta una gran adaptabilidad gracias a la amplia diversidad de enzimas que produce, lo que se traduce en que este género tiene un papel importante en el ciclo del carbono y nitrógeno (Amore *et al.*, 2013).

Aislamientos de este género se encuentran en la mayoría de los trabajos sobre el estudio de actividades xilanolíticas bacterianas en sustratos lignocelulósicos y resultan ser aquellos que aparecen con mayor frecuencia o aquellos que se seleccionaron para continuar los estudios. De 10 aislamientos bacterianos obtenidos a partir de suelo en el que se encontraba material vegetal en descomposición y que se determinó su capacidad xilanolítica y celulolítica, 4 fueron identificados como *Bacillus* sp. mediante estudios filogenéticos (Ahmed, Babalola y McKay, 2017). En otro estudio en que se seleccionaron 7 de 93 cepas por su actividad xilanasa, cinco resultaron ser *Bacillus*, al comparar las secuencias obtenidas del gen del ARNr 16S (Amore *et al.*, 2015). Se aislaron bacterias con actividad xilanasa a partir de materia fecal de rumiantes, se seleccionaron 7 aislamientos de 249 que se obtuvieron y todos fueron caracterizados morfológicamente y mediante estudios moleculares como *Bacillus* sp. (Thite y Nerurkar, 2015).

Mientras que la levadura seleccionada pertenece al género *Pseudozyma*. Las colonias en PDA luego de tres días de crecimiento son lisas, de color crema a rosado claro, circulares y uniformes, células de forma elipsoide. Luego de 14 días, las colonias en la placa de PDA, se observan rugosas, de color más claro, con los bordes irregulares. Las células al microscopio se observan aglomeradas (Figura 39).

## EBV 97-87

3 días de  
crecimiento

14 días de  
crecimiento

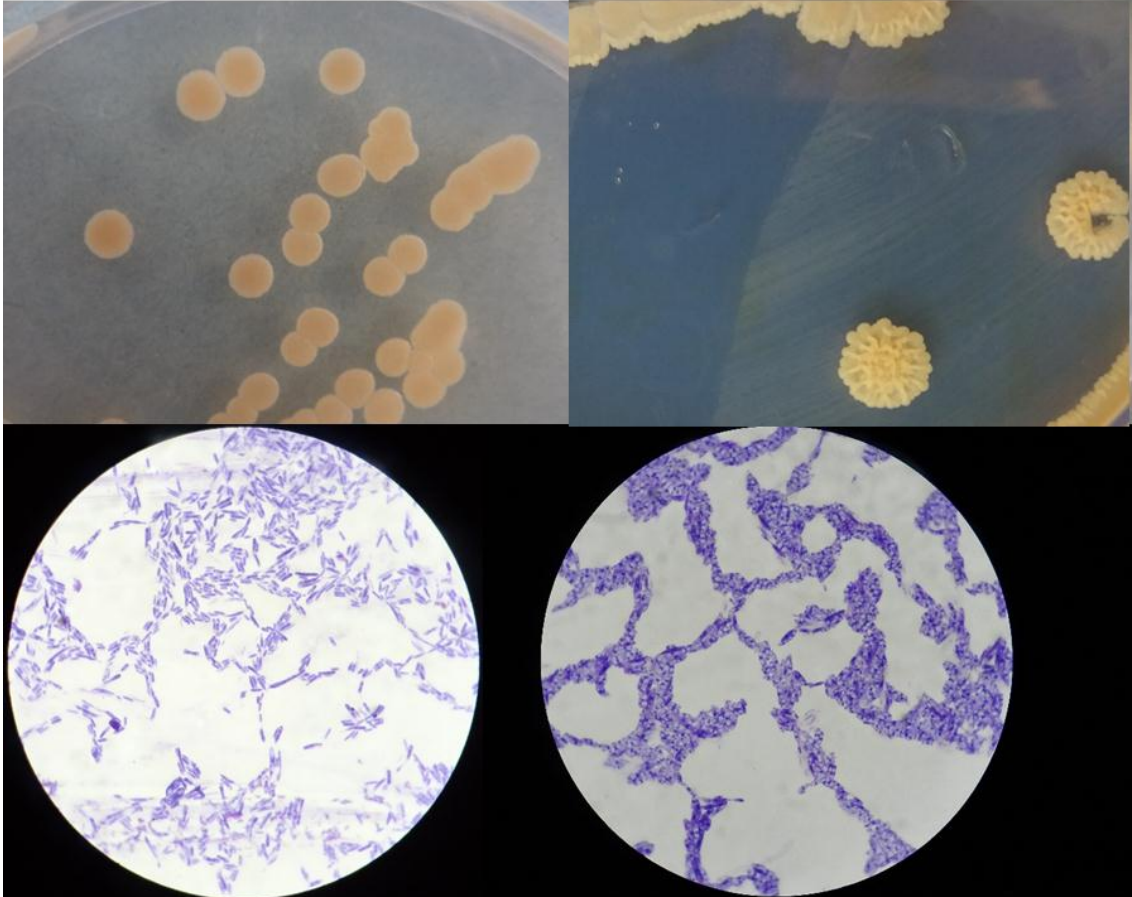


Figura 39 - Levadura del género *Pseudozyma* sp. EBV 97-87. Arriba: observación macroscópica de las colonias en PDA. Abajo: Observación al microscopio (aumento 100X) de suspensión de una colonia teñida con azul de metileno.

Este género de levaduras pertenece a la división Basidiomycota, de la cual se han descrito 21 especies. Se han reportado cepas de este género en varios estudios donde se han aislado de diversas fuentes como ser, aguas estancadas con plantaciones de bromelias en Brasil (Gomes *et al.*, 2015), plantas de las islas Canarias (Middelhoven, 1997) y también como endosimbiontes de insectos asociados a la caña de azúcar, en Brasil (Borges *et al.*, 2014). Se han reportado varias biomoléculas relevantes producidas por este género de levaduras como enzimas extracelulares, cutinasa (Seo *et al.*, 2007), lipasa (Bussamara *et al.*, 2010), xilanasa (Adsul, Bastawde y Gokhale, 2009; Borges *et al.*, 2014) y la producción de biosurfactantes como los manopiranosil meso-eritritoles (Faria *et al.*, 2014). Además algunas especies han sido usadas como cepas para biocontrol en algunas plantas (Marchand *et al.*, 2009).

La levadura *Pseudozyma* sp. EBV97-87 presenta características morfológicas macro y microscópicas similares a las encontradas en la cepa *Pseudozyma brasiliensis*, descrita por primera vez por (Oliveira *et al.*, 2014). La cepa aislada en esta tesis fue depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo en la Universidad de Valencia, con el número CECT 13162.

El hongo filamentoso seleccionado se identificó perteneciente al género *Penicillium* tanto en los estudios microscópicos como moleculares. En placa el micelio es de color verde grisáceo, con el borde blanco y el reverso es de color amarillo verdoso, su aspecto es aterciopelado. Al observarlo al microscopio, forma conidios a partir de células conidiogénicas en forma de pincel, con solo una línea de fiálides, por lo tanto, se lo caracteriza como monoverticilado. Los conidios se alinean en cadenas y son esféricos (Figura 40).

#### EBV 95-17

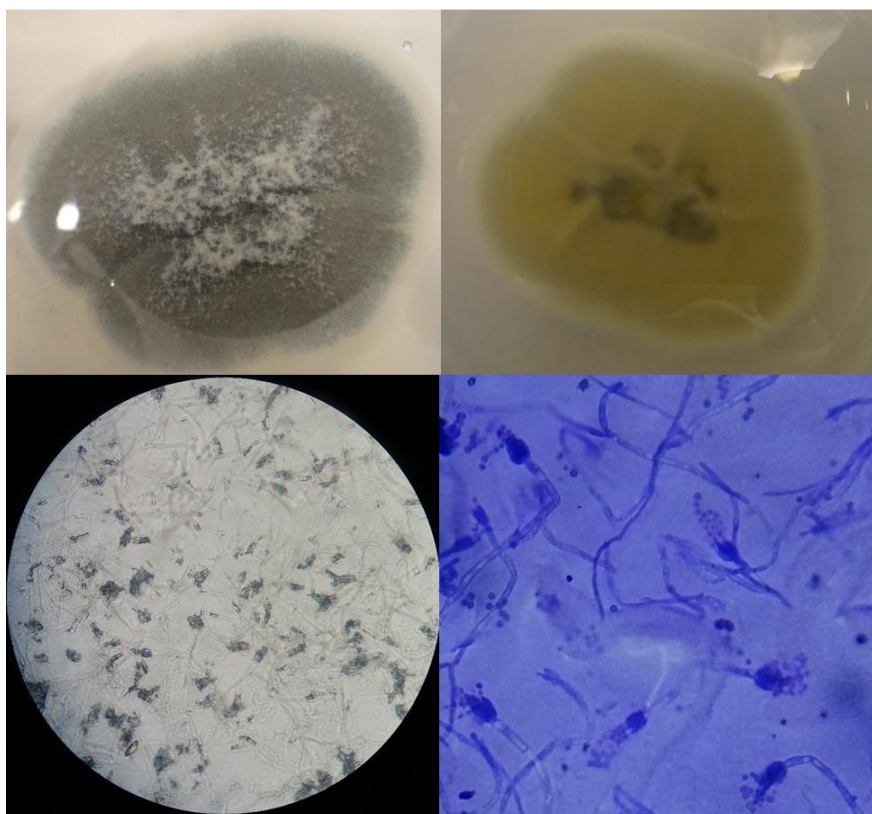


Figura 40 - Hongo filamentoso del género *Penicillium* sp. EBV 95-17. Arriba: observación macroscópica del micelio en PDA (izq: derecho de la placa, der: reverso de la placa). Abajo: Observación al microscopio (aumento 40X) del micelio izq: sin teñir. Der: teñida con azul de metileno.

Este género está ampliamente distribuido en la naturaleza (Pitt y Hocking, 2009), y se han reportado como buenos productores tanto de xilanasa como de celulasa (Osés *et al.*, 2006; Corrêa *et al.*, 2014; Menezes, da Silva, Daniele, Rossi y Ayub Záchia, 2017). Es una cepa de crecimiento rápido, por lo tanto es muy interesante para la producción de

xilanasa. En un aislamiento realizado a partir de suelos de los bosques atlánticos de Brasil, se obtuvo una cepa de *Penicillium crustosum* FP11, capaz de producir xilanasa cuando fue cultivada con residuos agrícolas (rastrero de maíz) como fuente de carbono. En este estudio se utilizó el crudo enzimático obtenido en el blanqueo de la pulpa Kraft lo cual llevó a disminuir el uso de cloro en el proceso (Silva *et al.*, 2016). Otros investigadores encontraron en *Penicillium ramulosum* N1, aislado de árboles en descomposición en Canadá una xilanasa resistente a proteasas (Lin *et al.*, 2015).

## 6.3. Conclusiones

---

- Los microorganismos seleccionados fueron identificados por estudios moleculares y análisis macro y microscópico y resultaron pertenecientes a géneros ya reportados como buenos productores de xilanasa y celulasa.
- Para seguir su estudio como microorganismos xilanolíticos se identificaron:
  - EBV12-22 bacteria del género *Bacillus*
  - EBV97-87 levadura del género *Pseudozyma*
  - EBV95-17 hongo filamentoso del género *Penicillium*
- Para seguir su estudio como microorganismos con actividad celulasa se identificaron:
  - EBV96-86 levadura del género *Aureobasidium*
  - EBV96-24 hongo filamentoso del género *Preussia*
- Se seleccionó de forma de incluir opciones entre eucariotas y procariotas para cada actividad enzimática con el fin de identificar y estudiar enzimas con diversidad en su capacidad de hidrólisis de los polímeros de interés.

## 7. Producción de celulasas

### 7.1. Metodología

En la Figura 41 se muestra el esquema de trabajo seguido para la producción de celulasa.

#### Selección de medio de cultivo para la producción de celulasa

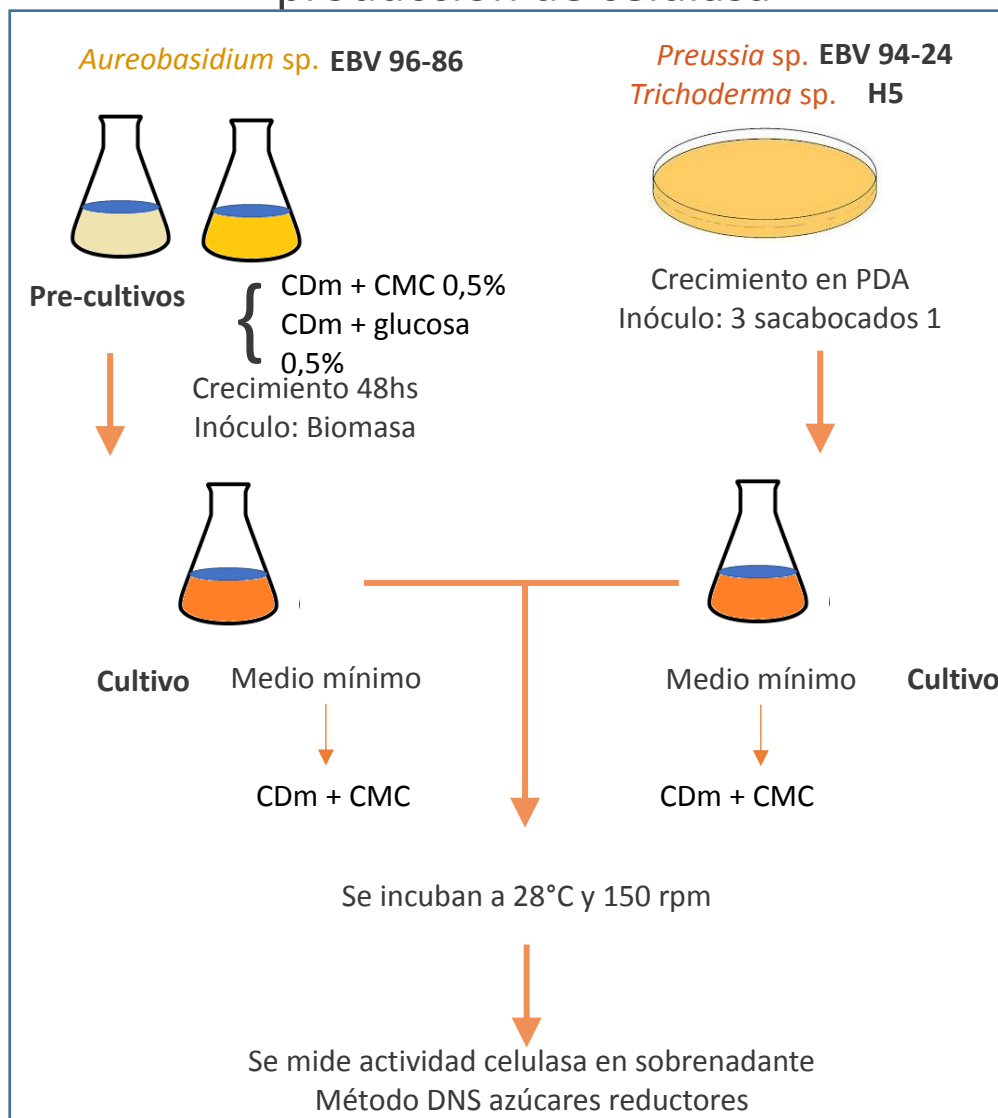


Figura 41 - Esquema de producción de celulasa

### 7.1.1. Efecto del tiempo de crecimiento y medio de cultivo en la producción de celulasa

Se estudió el efecto del tiempo en el cultivo para evaluar la producción de celulasa en los microorganismos seleccionados. Para el estudio de la levadura y el hongo filamentoso se utilizó el medio de cultivo:

- Czapek Dox modificado (CDm) se suplementó con peptona 0.5% y extracto de levadura 0.1% adicionados con CMC 0.5 %.

En el ensayo con la levadura, se probaron pre-cultivos del microorganismo en 20 ml de los medios 1) CDm + CMC 0.5% , 2) CDm + Glucosa y 3) PDB, en matraces Erlenmeyer de 100 ml inoculados con una colonia aislada y crecidos a 28 °C durante 48 horas con una agitación orbital de 150 rpm. Luego la biomasa se separó, se lavó con suero fisiológico y se inocularon los matraces Erlenmeyer de 100 ml con 20 ml del medio de cultivo descrito anteriormente (CDm + CMC 0.5%).

El hongo filamentoso se creció en placas de Petri con el medio PDA durante 8 días a 28 °C. De este crecimiento, se tomaron con sacabocado de 1 cm de diámetro 3 trozos de micelio que se utilizó para inocular los matraces Erlenmeyer de 100 ml con 20 ml del medio CDm + CMC 0.5%. Además de los hongos aislados de *Eucalyptus globulus* y seleccionados por su actividad celulasa, se trabajó con el hongo *Trichoderma* sp. (Y5) perteneciente a la colección de microorganismos del Laboratorio de Biotransformación y Biotransformaciones (LBB). La metodología de trabajo para este hongo fue la misma que la aplicada para el hongo filamentoso aislado en la presente tesis.

#### 7.1.1.1. Medida de actividad celulasa

Se ensayó la actividad a 50 °C en esta oportunidad, ya que es necesario para lograr una buena hidratación y expansión de las fibras del papel de filtro.

## 7.2. Resultados y discusión

---

### 7.2.1. Efecto del tiempo de crecimiento y medio de cultivo en la producción de celulasa

Las celulasas microbianas tienen diversas aplicaciones en la agricultura y en las industrias de alimentos, textiles, lavandería, pulpa y papel (Kuhad, Gupta y Singh, 2011). En esta tesis, se informa sobre cepas aisladas productoras de celulasa. Estas cepas, en virtud de los estudios morfológicos y de análisis moleculares descritos en el capítulo anterior, se identificaron como pertenecientes a los géneros *Preussia* y *Aureobasidium*. Ambos géneros fueron reportados anteriormente como productores de celulasas (Zaferanloo et



al., 2014; Rong *et al.*, 2015). Se realizó también el estudio de la producción de celulasa mediante una cepa de *Trichoderma* sp. aislada y perteneciente a la colección del LBB de la Facultad de Química, UdelaR ya que se han descrito varias cepas de este género en un gran número de trabajos científicos con muy buena actividad celulasa (Mandels, Hontz y Nystrom, 1974; Bischof, Ramoni y Seiboth, 2016; da Silva Delabona *et al.*, 2016).

El objetivo de este estudio era evaluar la capacidad de los aislamientos seleccionados en relación a su actividad celulasa en un medio de cultivo mínimo con el agregado de pequeñas concentraciones de extracto de levadura y peptona y se utilizó CMC como fuente de carbono para su crecimiento. Se observó que todos los microorganismos pudieron crecer con CMC como fuente de carbono.

Se estudió la producción de celulasa en la cepa *Aureobasidium* sp. EBV 96-86 al inocular sobre el mismo medio de cultivo, diferentes pre-cultivos en los que se creció el microorganismo durante 48 horas. Se diseñó este experimento ya que según diferentes autores el uso del pre-cultivo como inóculo fue capaz de aumentar la actividad celulasa (Leite *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2014; Jung *et al.*, 2015; Rong *et al.*, 2015). Los resultados de las actividades medidas se muestran a continuación en la Figura 42.

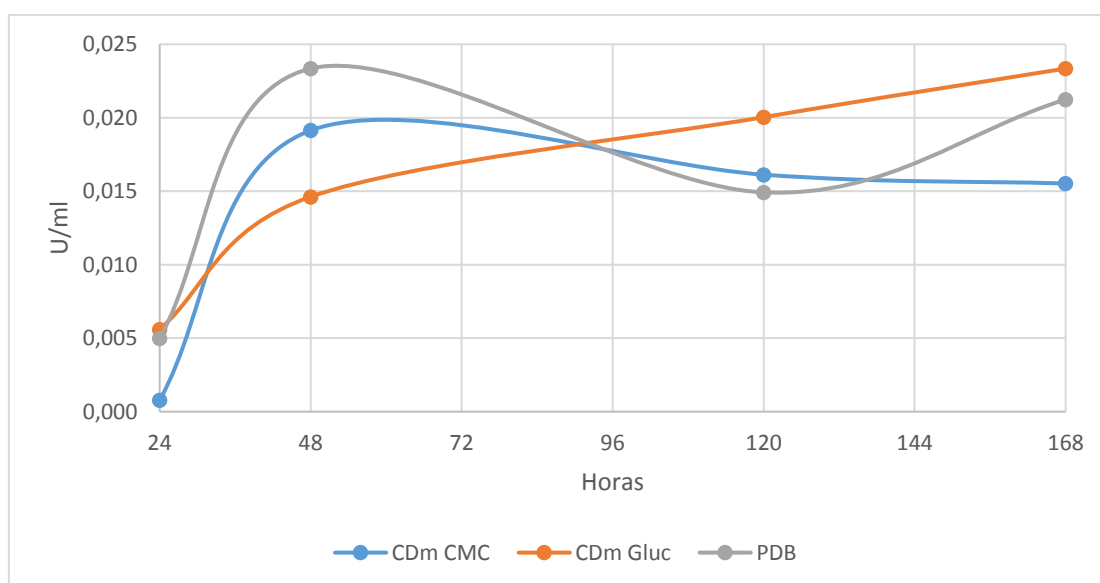


Figura 42 - Actividad celulasa de la levadura *Aureobasidium* sp. EBV 96-86 a diferentes tiempos. Las referencias corresponden a los pre-cultivos que fueron crecidos en los medios: CDm CMC: Czapek-Dox modificado + 0.5 % CMC, CDm Gluc: Czapek-Dox modificado + glucosa, PDB: Potato dextrose broth.

Los valores de actividad fueron menores que los reportados para el cribado cuantitativo en el medio PDB (0.14 U/ml) en el capítulo 5. La producción de FPasa fue máxima (0.023 U / ml) a las 48 horas en el caso del pre-cultivo en medio nutriente y se encontró el mismo valor a las 168 horas en el caso del microorganismo que provino del pre-cultivo CDm +

glucosa. No se encontraron reportes de actividad FPasa para *Aureobasidium*, sino que las actividades reportadas fueron medidas con otros sustratos como CMC o AVICEL por lo tanto no se deberían comparar (Leite *et al.*, 2007; Rong *et al.*, 2015; Khan *et al.*, 2016). Pero si se encontró un trabajo en el que se estudió el género de levadura *Cystobasidium oligophagum* por Vyas y Cahhabra y midieron una actividad FPasa de 0.04 U/ml luego de 72 horas de crecimiento en medio con CMC como fuente de carbono (Vyas y Chhabra, 2017). Se podrían llevar a cabo otros métodos para mejorar la actividad celulasa en esta cepa, por ejemplo se reportó en una tesis de maestría que para mejorar la actividad celulasa de una cepa de *Aureobasidium pullulans* llevaron a cabo metodologías de “genome shuffling” para obtener mutantes y obtuvieron con una de las cepas recombinantes un aumento de seis veces en la actividad FPasa (Baldwin, 2017).

Se estudió además la actividad FPasa en las cepas *Preussia* sp. EBV 96-24 y *Trichoderma* sp.Y5 en este caso se estudió el mismo medio de cultivo Czapek Dox modificado con extracto de levadura y peptona y el inóculo fue el mismo para ambos. Las actividades medidas se muestran a continuación en la Figura 43. En el caso de la cepa de *Preussia* sp. EBV 96-24 los resultados en este medio mínimo fueron menores que en el caso del cribado cuantitativo (capítulo 5). La máxima actividad se obtuvo en el día 18 para ambas cepas, pero las unidades de FPasa fueron mayores en *Trichoderma* sp. Y5 (0.073 U/ml) que en *Preussia* sp. EBV 96-24 (0.020 U/ml).

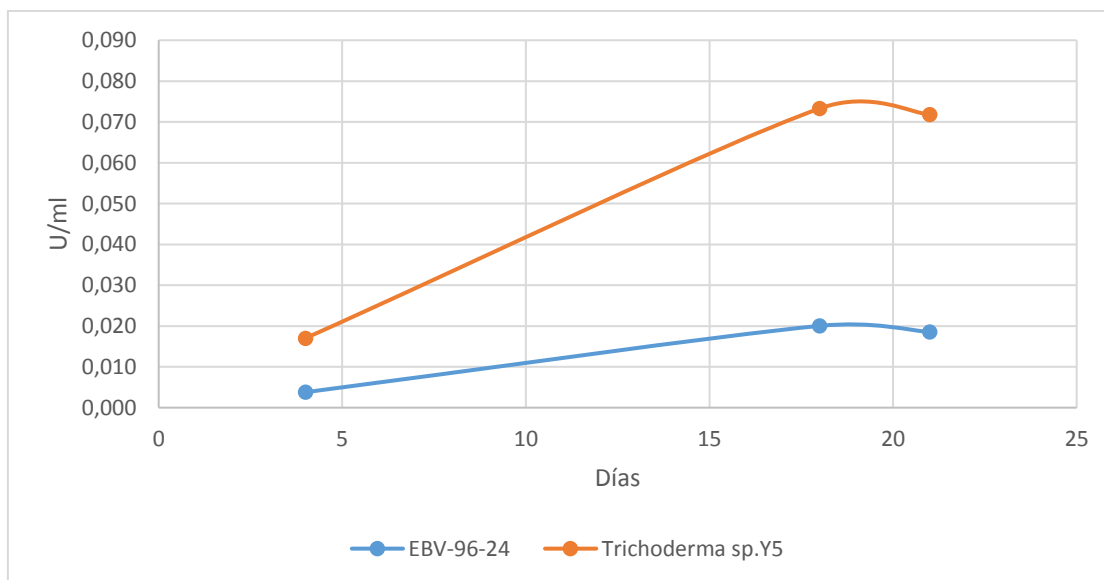


Figura 43 - Actividad celulasa de los hongos *Preussia* sp. EBV 96-24 y *Trichoderma* sp. Y5 a diferentes tiempos.

Los estudios en el tiempo de la producción de celulasa por estas cepas en las condiciones ensayadas revelaron que la cepa mejor productora es *Trichoderma* sp. Y5 (0.070 U/ml) seguido por las otras dos (aproximadamente 0.020 U/ml cada una) seleccionadas en esta tesis. Si bien la carboximetilcelulosa se ha reportado como estimuladora de la actividad

celulasa (Ramarajan y Sumathi Manohar, 2017), en otros estudios se apoya la teoría que explica que para algunas cepas de microorganismos, los materiales lignocelulósicos que son más complejos estructuralmente, son mejores en inducir la actividad celulasa. Como en el caso de una cepa de *Penicillium oxalicum* en donde se midió una actividad de 1.29 U/ml en un medio con sales, extracto de levadura, peptona, celulosa microcristalina y salvado de trigo (Saini *et al.*, 2015). Otros autores encontraron en el caso de dos hongos endófitos del género *Acremonium* sp. actividades FPasa de 0.55 U/ml en un medio con bagazo de caña de azúcar (De Almeida *et al.*, 2011). Por lo tanto, las condiciones analizadas en esta tesis no serían aquellas de mejor producción de actividad ya que en general fueron bajas a pesar de haber medido a 50 °C. Es un resultado posible debido a que se ha reportado que la producción de glicosil hidrolasas está estrechamente relacionada con la naturaleza de la fuente de carbono, ya que el metabolismo de los hongos está muy influenciado por la composición del medio. Cada cepa tiene un perfil metabólico y enzimático distinto y depende del medio y del tiempo de cultivo (Robl *et al.*, 2013).

### 7.3. Conclusiones

---

Si bien se avanzó en la identificación de cepas con potencial capacidad de producción de celulasas, estos estudios no fueron suficientes para encontrar un medio de producción de esta enzima y continuar su estudio. Estos datos quedan para futuros experimentos en los que se puedan utilizar medios de cultivo con residuos lignocelulósicos como fuente de carbono y con capacidad de inducir estas enzimas.

## 8. Producción de xilanasas y caracterización de los sistemas enzimáticos

### 8.1. Metodología

En la Figura 44 se visualiza un esquema del trabajo seguido en esta etapa.

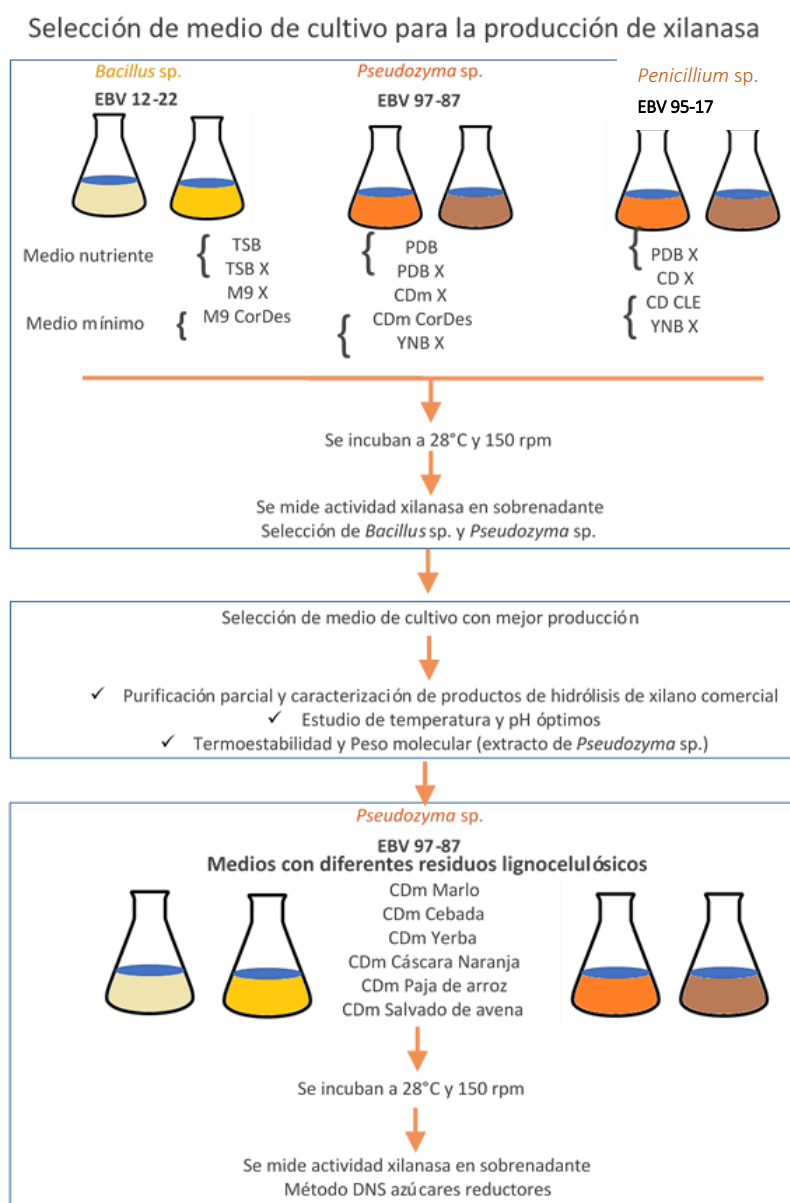


Figura 44 - Esquema de trabajo de producción de xilanasas y su estudio

#### 8.1.1. Efecto del tiempo y diferentes medios de cultivo en la producción de xilanasas

Se estudió el efecto del tiempo en el cultivo de los microorganismos seleccionados en distintos medios de cultivo para evaluar la producción de xilanasas y se evaluó el estado de crecimiento de los mismos. La descripción de los medios de cultivo y las cortezas utilizadas como sustrato se describen en los anexos 12.1, 12.4.1 respectivamente y capítulo 9 en el caso de la corteza deslignificada.

#### 8.1.1.1. Bacterias

Se sembraron placas de Petri con el medio TSA de la bacteria *Bacillus* sp. EBV 12-22 y se incubaron a 28 °C. Luego de 24 horas de incubación, se inoculó con una colonia aislada, un tubo de ensayo con 5 ml del medio TSB. Se incubó durante 24 horas a 150 rpm y 28 °C. La suspensión bacteriana obtenida se ajustó a una concentración de OD<sub>600nm</sub> = 0,3 medida en espectrofotómetro (Thermo Scientific Modelo Evolution 60S). A partir de esta suspensión se realizó un inóculo 1/ 10 a un matraz Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de los medios:

- TSB X: Tryptic Soy Broth + xilano de haya 1%
- M9 X: M9 + xilano de haya 1%
- M9 CorDes: M9 + corteza deslignificada 1%
- TSB: Tryptic Soy Broth

Los cultivos se incubaron a 28 °C y 150 rpm durante 217 horas. A diferentes intervalos de tiempo se tomaron muestras para medir actividad xilanasa y células totales mediante densidad óptica a 600 nm.

#### 8.1.1.2. Levaduras

Se sembraron placas de Petri con el medio PDA de la levadura *Pseudozyma* sp. 97-87 y se incubaron durante 48 horas a 28 °C. Se tomó biomasa desarrollada en estas placas para realizar un inóculo en suero fisiológico correspondiente a una escala McFarland 2 (3 x 10<sup>7</sup> células / ml). Esta suspensión se utilizó para inocular en una relación 1/100 un matraz Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de los medios de cultivo:

- PDB X: Potato Dextrose Broth + xilano de haya 1%
- CDm X: medio Czapek-Dox + extracto levadura 0,1% + peptona 0,5% + xilano de haya 1%
- YNB X: Yeast Nitrogen Base + xilano de haya 1%
- CDm CorDes: medio Czapek-Dox + extracto levadura 0,1% + peptona 0,5% + corteza deslignificada 1%

- PDB: Potato Dextrose Broth

Los cultivos se incubaron a 28 °C y 150 rpm durante 356 horas. A diferentes intervalos de tiempo se tomaron muestras para medir actividad xilanasa y recuento de células viables mediante tinción con azul de metileno en cámara de Neubauer (anexo 12.7).

### 8.1.1.3. Hongo filamentoso

Se sembró una placa de Petri con el medio PDA del hongo *Penicillium* sp. EBV 95-17. Se incubó a 28 °C durante 7 días. A partir de este crecimiento se preparó una suspensión de conidias mediante la adición de 5 ml de suero fisiológico y raspando la superficie del micelio con ansa estéril. El suero fisiológico con las conidias se filtró a través de lana de vidrio en un embudo, estéril, hacia un matraz con bolitas de vidrio estériles. Se contaron las conidias en la cámara de Neubauer. Esta suspensión se utilizó para inocular matraces Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml, de los medios que se describen a continuación, a una concentración en los matraces de  $10^7$  conidias/ml.

- PDB X: Potato Dextrose Broth + xilano de haya 1%
- CD X: medio Czapek-Dox + xilano de haya 1%
- YNB X: Yeast Nitrogen Base + xilano de haya 1%
- CD CLE: medio Czapek-Dox + corteza libre de extractivos 1%

Los cultivos se incubaron a 28 °C y 150 rpm durante 356 horas.

### 8.1.2. Obtención del crudo enzimático a partir de los medios de cultivo seleccionados

A partir de los sobrenadantes de los cultivos realizados como se describieron en el ítem anterior, se realizó una precipitación salina hasta una concentración de sulfato de amonio (Fluka) de 70 % en todos los casos, en un baño de agua-hielo, con agitación mínima constante durante el agregado de la sal. Una vez finalizado, se colocó a 4 °C durante la noche, para permitir la precipitación. Por último, se centrifugó, en una centrifuga (Thermo Scientific Modelo RC 6+) a 8000 rpm a 10 °C durante 10 minutos.

El precipitado se resuspendió en un volumen adecuado y se realizaron medidas de actividad xilanasa y cantidad de proteínas solubles. En general para las enzimas de *Bacillus* sp. EBV 12-22 se utilizó una relación de 1 gramo de precipitado húmedo y 2 ml de buffer y para las enzimas de *Pseudozyma* sp. EBV 97-87 una relación de 1 gramo de precipitado húmedo y 6 ml de buffer.

Medida de actividad xilanasa MODIFICADA - Procedimiento modificado de Bailey (Bailey, Biely y Poutanen, 1992)

En un tubo de ensayo se agregó:

- 0,5 ml solución de extracto enzimático diluido en buffer citrato 0.05 M; pH 4.8 (\*)
- 1,0 ml solución de xilano 2 % p/v en buffer citrato 0.05 M; pH 4.8

Se dejó en baño de agua termostaticado a 30 °C, durante 15 minutos. Al finalizar se tomaron 0.375 ml de medio, se pasó a otro tubo y se agregaron 0.750 ml de solución de ácido 3, 5-dinitrosalicílico (DNS) (detallado en anexo 12.2), se hirvieron los tubos en baño a 100 °C durante 5 minutos, luego se enfriaron con un baño de agua - hielo. Se agregaron 5 ml de agua destilada y se midió la absorbancia a 540 nm.

(\*) (en general se realizó una dilución 1/20 para las medidas de xilanasa en el sobrenadante del medio de cultivo y una dilución 1/100 del crudo luego de precipitarlo con sulfato de amonio).

Los blancos, las curvas de calibración y las unidades de xilanasa se realizaron como se detalló en el capítulo 5.

#### 8.1.2.1. Cuantificación de proteínas

La cuantificación de la concentración de proteínas de los extractos se realizó mediante el ensayo de Bradford (Sigma-Aldrich) (Bradford, 1976). Se realizó una curva de calibración, para lo cual se utilizó albumina del suero bovino (BSA, Sigma-Aldrich). El ensayo se realizó según el protocolo del reactivo para 2 ml de mezcla, agregando 1 ml del extracto (o dilución del mismo) o el estándar proteico (BSA) con 1 ml del reactivo de Bradford. Luego de 5 minutos de reacción se midieron las absorbancias a 595 nm en espectrofotómetro. Los valores obtenidos fueron convertidos a mg/ml según la curva estándar elaborada y se utilizaron para calcular la actividad enzimática específica de cada extracto (Anexo 12.6).

#### 8.1.3. Estudio de la biotransformación de xilano de haya mediante las xilanasas obtenidas

Se realizaron hidrólisis del xilano de haya (2% p/v), utilizando las enzimas obtenidas luego de la precipitación salina de los sobrenadantes de los medios de cultivo de *Bacillus* sp. EBV12-22; *Pseudozyma* sp. EBV97-87 y *Penicillium* sp. EBV95-17.

Las reacciones se llevaron a cabo en buffer citrato 0,05M, pH 4.8, a 30°C. Se tomaron muestras a los 15 y 60 minutos. Se realizó un blanco con xilano de haya en la misma

concentración pero sin el agregado de enzima, sino que se agregó el mismo volumen de buffer.

#### 8.1.3.1. Caracterización analítica de los productos obtenidos

Las muestras obtenidas se analizaron mediante cromatografía en capa fina (TLC) y cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

##### *Condiciones de TLC:*

Fase móvil utilizada en la TLC (Silicagel 60 F<sub>254</sub>, Merck<sup>®</sup>) fue cloroformo : ácido acético : agua (3:6:1). Se reveló con Orcinol 20 mM en etanol/ácido sulfúrico 95:5. Se utilizaron los estándares de xilosa (X1), y los xilooligosacáridos X2, X3, X4, X5 y X6 (Megazyme) para identificar los productos obtenidos.

##### *Condiciones de HPLC:*

Equipo Shimadzu LC – 20AT, un detector de Índice de refracción (Shimadzu RID – 10AT). La columna utilizada fue Supelcogel C610H (30 cm x 7.8 mm) junto con su pre-columna Supelguard C610H (5 cm x 4.6 mm). Fase móvil, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,005N flujo de 0,5 ml/min. Los análisis se llevaron a cabo a 55°C. Se utilizaron los estándares de xilosa (X1), y los xilooligosacáridos xilobiosa (X2), xilotriosa (X3), xilotetrosa (X4) (Megazyme) para identificar los productos obtenidos.

#### 8.1.4. Caracterización respecto a la Temperatura y pH

Para los extractos enzimáticos de *Pseudozyma* sp. EBV 97-87 y *Bacillus* sp. EBV 12-22 se realizaron las medidas de temperatura y pH óptimos.

Para determinar el pH óptimo de la enzima las reacciones se hicieron a temperatura de trabajo constante (30°C) y la escala de pH usada para *Pseudozyma* sp. EBV 97-87 fue de 2.4 a 8.4 (2,4; 3,0; 3,9; 4,4; 4,8; 6,6; 7,1; 8,4). Mientras que para *Bacillus* sp. EBV 12-22 fue de 4.8 a 9.8 (4,8; 6,6; 7,1; 7,8; 8,4; 9,8).

Los buffers usados para preparar las diluciones de la enzima y para la disolución de su sustrato fueron buffer citrato 0,1 M (rango 2,4 a 4,8), buffer fosfato 0,1 M (rango 6,6 a 8,4) y buffer carbonato pH 9.8 (Anexo 12.2).

Para determinar la temperatura óptima las reacciones se hicieron a pH de trabajo constante y óptimo para cada cepa y la escala de temperaturas usada fue de 20 °C a 70 °C para *Pseudozyma* sp. EBV 97-87 y de 30 °C a 70 °C para *Bacillus* sp. EBV 12-22, con intervalos de 10 °C. Para ambos parámetros se usó el ensayo enzimático para determinar actividad xilanasa detallado en la sección 8.1.2.



### 8.1.5. Estabilidad térmica y peso molecular de xilanasas de *Pseudozyma* sp. EBV 97-87

Para el estudio de estabilidad térmica las temperaturas ensayadas fueron 4, 30 y 50 °C. Se incubó el extracto parcialmente purificado y resuspendido en buffer citrato pH 4,8 a las diferentes temperaturas y la actividad remanente fue medida a diferentes tiempos (24, 96, 144, 240 y 408 horas) termostatzado previamente las muestras a 22° C.

La cromatografía de exclusión por tamaño se realizó a temperatura ambiente con la columna Superdex™ 75 10/300 GL (rango óptimo: 3000 – 70000 Da), que se conectó al sistema AKTA (GE Healthcare, Suecia). La columna se equilibró con 10 volúmenes de columna de buffer acetato de sodio 0.1 M y pH 5. La muestra se inyectó a la columna a través de un loop de 100 µl y se corrió en el buffer a 0.25 ml/min. Se midió absorbancia a 280 nm. Se recolectaron muestras de 0.5 ml, con un colector de fracciones incluido en el sistema (Frac-920). Todas las fracciones que correspondieron a un pico en el cromatograma se sometieron a ensayos de actividad enzimática.

Se realizó una curva de calibración para dilucidar el peso molecular de la enzima de interés. Estándares de proteínas utilizadas en la curva de calibración: ovoalbúmina (45 kDa), BSA (66.4 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), citocromo C (12.4 kDa).

### 8.1.6. Producción de xilanasas de *Pseudozyma* sp. EBV 97-87 en medio de cultivo con diferentes residuos

Se sembraron placas de Petri con el medio PDA de la levadura *Pseudozyma* sp. EBV 97-87 y se incubaron a 28 °C durante 48 horas. Se tomó biomasa crecida en las placas y se realizó un inóculo en suero fisiológico correspondiente a una escala McFarland 2. Esta suspensión se utilizó para inocular en una relación 1/100 un matraz Erlenmeyer de 100 ml con 20 ml de los medios de cultivo:

- Medio Czapek-Dox + extracto levadura 0,1% + peptona 0,5% + salvado de avena (SA) / paja de arroz (PA) / yerba mate usada (YMU) / cáscara de naranja seca (CNS) / marlo de maíz (MM) / cebada usada (CU) en una concentración del 1% p/v.

Para realizar este experimento los residuos se secaron a 45 °C durante 5 días y se molieron todos menos la yerba mate en un molino (IKA MF 10.1).

Se incubaron a 28 °C y 150 rpm durante 4 días y se midió actividad xilanasas.

## 8.2. Resultados y discusión

---

### 8.2.1. Efecto del tiempo de crecimiento y diferentes medios de cultivo en la producción de xilanasas.

Los microorganismos seleccionados para estudiar la producción de xilanasas, corresponden a géneros ya reportados como productores de estas enzimas. La selección de los medios de cultivo es usualmente el paso preliminar implicado en la optimización del bioproceso que se realiza siempre a nivel de matraz para luego seleccionar la formulación del medio más adecuada, mediante un proceso racional de optimización (Ali El Enshasy *et al.*, 2016). Durante este trabajo, se buscó analizar el efecto de diferentes medios de cultivo y el agregado de xilano, como polímero inductor de la actividad, y también se estudió un sustrato lignocelulósico, como lo es la corteza de *E. dunnii*. Estos ensayos se realizaron para conocer el comportamiento de las cepas aisladas y si se ajustan a los estudios previos encontrados en la literatura. Por otro lado, se realizó el recuento de microorganismos totales para los cultivos de *Bacillus* sp. EBV 12-22 y de células viables para *Pseudozyma* sp. EBV 97-87 de forma de relacionar estos resultados con la producción de las enzimas de interés.

#### *Bacteria*

El perfil de la actividad y el recuento de microorganismos en cada medio de cultivo se muestran en las Figuras 41 y 42. La actividad xilanasas en la cepa de *Bacillus* fue en aumento hasta las 145 horas en los medios TSB X y M9 X, tiempo en que se midió la máxima actividad (18.7 U/ml) en el medio TSB X y luego disminuyó. Cuando se utilizó corteza de *E. dunnii* deslignificada como sustrato fue donde se observó menor actividad y crecimiento. Los resultados en el medio nutriente TSB sin xilano fueron similares a los obtenidos para el medio mínimo con corteza deslignificada.

En el cribado (capítulo 5) con *Bacillus* sp. EBV12-22 la actividad xilanasas fue también mayor en el medio de cultivo nutriente TSB X, con valores de 0.7 U/mL mientras que en el medio M9 X se alcanzó una actividad de 0.39 U/mL a las 24 horas de cultivo. Posteriormente, al realizar este nuevo ensayo en todos los tiempos analizados, la actividad también fue mayor en el medio TSB X.

Se muestra en la Figura 45, que a las 72 horas la cepa de *Bacillus* ya se encuentra en fase estacionaria en TSB X, TSB y M9 X y la cantidad de células fue mayor al igual que la actividad xilanasas, en todos los tiempos en el medio TSB X.

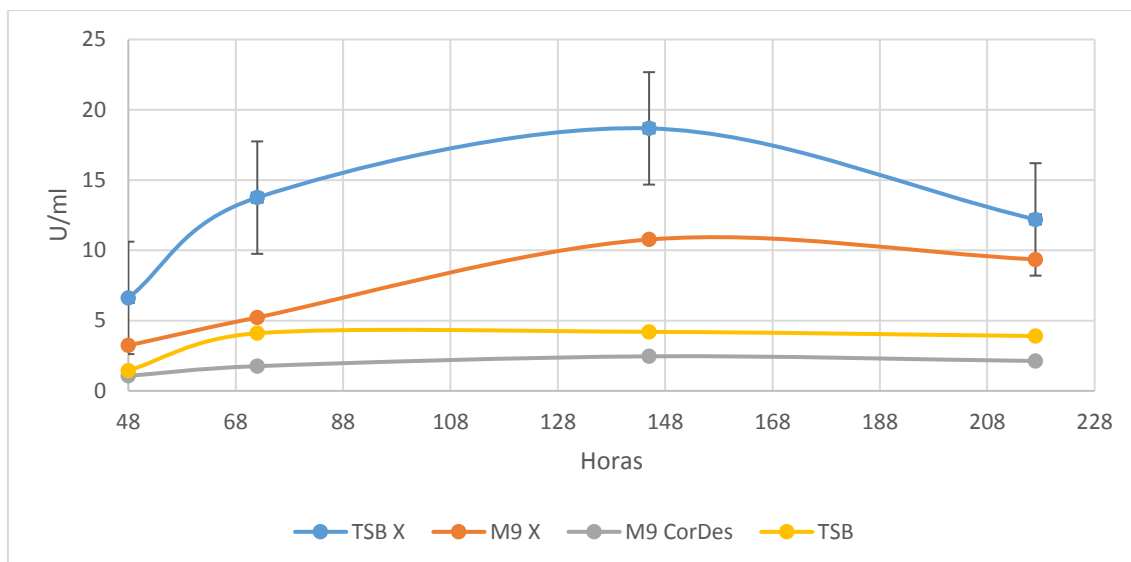


Figura 45 - Actividad xilanasa en la bacteria seleccionada *Bacillus* sp. EBV 12-22. M9 X: M9 + xilano 1%, M9 CorDes: M9 + corteza de *E. dunnii* designificada, TSB X: Tryptic Soy Broth + xilano 1%, TSB: Tryptic Soy Broth.

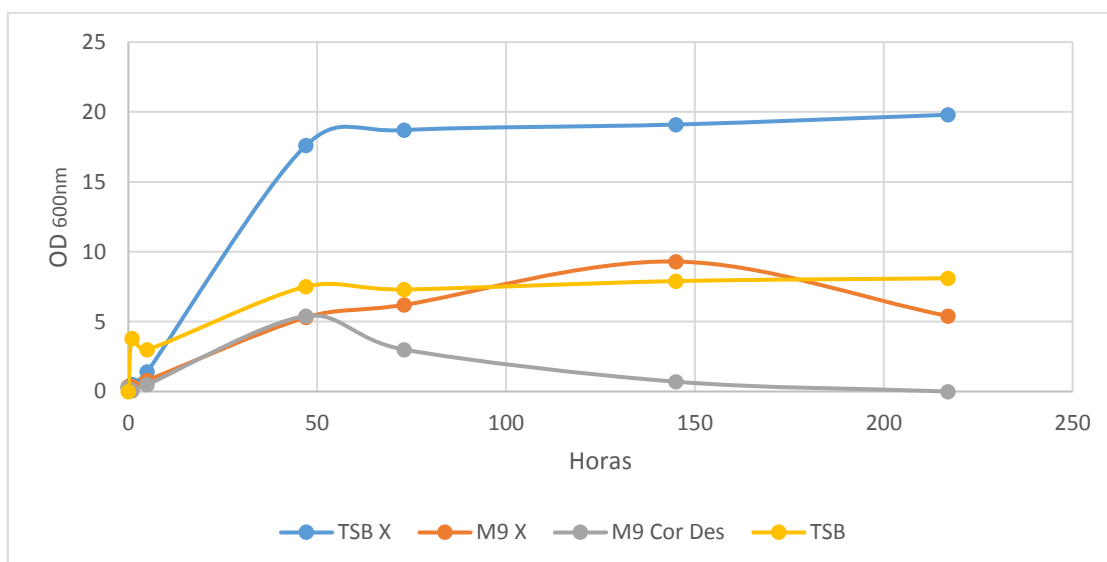


Figura 46 - Recuento de células totales de la bacteria seleccionada *Bacillus* sp. EBV 12-22. M9 X: M9 + xilano 1%, M9 CorDes: M9 + corteza de *E. dunnii* designificada, TSB X: Tryptic Soy Broth + xilano 1%, TSB: Tryptic Soy Broth.

El tiempo de producción máxima de una enzima determinada varía en las diferentes bacterias y es dependiente de las condiciones de cultivo y la genética de cada organismo. Se ha encontrado que la producción de xilanasas en algunas cepas del género *Bacillus* está asociada al crecimiento y por lo tanto también es dependiente de la disponibilidad de nutrientes (Anuradha *et al.*, 2007). Este hecho también lo reportaron otros autores, como Kumar y colaboradores, encontraron un aumento del crecimiento y la producción de xilanasas por *B. amyloliquefaciens* SK-3 con el tiempo. Se observó crecimiento bacteriano máximo (OD 620nm 1.6) y actividad de xilanasas ( $48.5 \pm 1.8$  UI / ml) a las 48 horas (Kumar *et al.*, 2017). Otros investigadores como (Hero *et al.*, 2017) encontraron

también una relación entre el aumento en la actividad xilanasas y las densidades celulares en un co-cultivo de una cepa de *Bacillus* sp. AR03 y *Paenibacillus* sp. AR247.

Sin embargo Ghio y su equipo encontraron que en el medio nutriente con el agregado de xilano la actividad fue menor que en el medio mínimo a pesar que la biomasa fue mayor (Ghio *et al.*, 2016). Estos datos sugieren que la inducción de xilanasas es un fenómeno complejo y el nivel de respuesta a diferentes inductores varía con cada cepa.

En esta tesis se observó que hay un efecto entre el aumento de la densidad celular, la actividad y la presencia de xilano ya que al analizar los resultados de las 72 horas se observa que la actividad xilanasas fue mayor en el medio TSB X (13.8 U/ml) alcanzando una OD<sub>660</sub> de 18.8 en segundo lugar en el medio M9 X (5.2 U/ml) con una OD<sub>660</sub> de 6.2 y en el medio nutriente TSB sin agregado de xilano la actividad resultó de 4.1 U/ml y una OD<sub>660</sub> de 7.3. Por lo tanto, se puede observar que el crecimiento no sigue el mismo patrón que la actividad, sino que la OD<sub>660</sub> fue mayor en el medio TSB X, en segundo lugar TSB y por último en el medio M9 X. Por lo tanto, se puede postular que la actividad xilanasas no estaría solamente asociada a la mayor cantidad de biomasa sino que el xilano tendría un efecto inductor en la actividad (ya que a pesar de que hay menos células en el medio M9 X que en TSB, la actividad es mayor).

El hecho del uso de xilano como inductor está propuesto por diversos autores (Adhyaru, Bhatt y Modi, 2014; Ghio *et al.*, 2016; Kalim y Mazhar, 2016). En esta tesis las actividades más altas se observaron a las 145 horas de cultivo, para los medios con el polímero comercial. Por otro lado, la densidad celular como la actividad xilanasas fue menor cuando se utilizó corteza deslignificada como fuente de carbono en el medio mínimo. Varios investigadores han reportado aumentos en la actividad xilanasas en cepas de *Bacillus* sp. utilizando diferentes sustratos lignocelulósicos como paja de sorgo (a las 48 horas de crecimiento (65,5 U/ml) crecido en un medio mínimo con adición de paja de sorgo (Adhyaru, Bhatt y Modi, 2014), salvado de trigo (3,7 U/ml el máximo luego de 24 horas crecido en medio líquido con salvado de trigo) (Thite y Nerurkar, 2015), otro medio con salvado de trigo se llegó a una actividad de 42 U/ml (Kallel *et al.*, 2016), otros sustratos que se han utilizado incluyen salvado de cebada (Haddar *et al.*, 2012), salvado de avena (Akhavan Sepahy, Ghazi y Akhavan Sepahy, 2011), pero no se encuentran hasta hoy reportes utilizando como inductores residuos de un árbol de madera dura. Los sustratos descritos en la literatura tienen una proporción mayor de xilano que la que contiene la corteza de *Eucalyptus*.

Es de importancia destacar que en los trabajos reportados anteriormente no solo se optimizó el sustrato utilizado sino también el tamaño y edad del inóculo, la fuente de nitrógeno, el pH, el agregado de metales y surfactantes.

## Levadura

Se probaron diferentes medios de cultivo para el crecimiento y producción de xilanas de la cepa de *Pseudozyma* sp. EBV 97-87. Los resultados se observan en las Figuras 43 y 44.

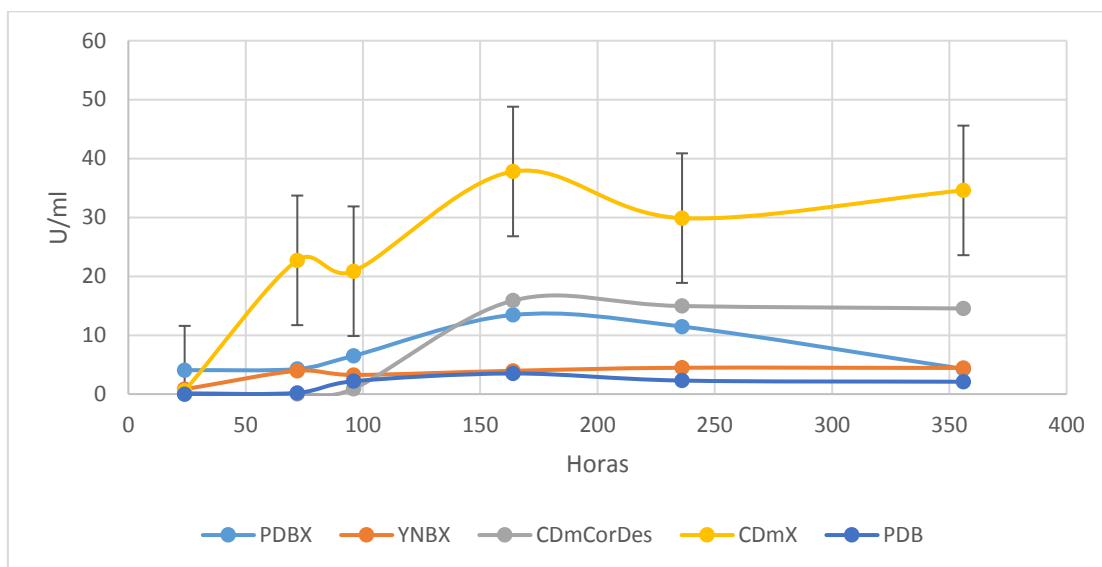


Figura 47 - Actividad xilanasa en la levadura seleccionada *Pseudozyma* sp. EBV 97-87. PDBX: Potato dextrose broth + xilano 1% , YNBX: Yeast nitrogen base + xilano 1%, CDmCorDes: Czapek-Dox modificado + corteza de *E. dunnii* deslignificada. CDmX: Czapek-Dox modificado + xilano 1%, PDB: Potato Dextrose Broth.

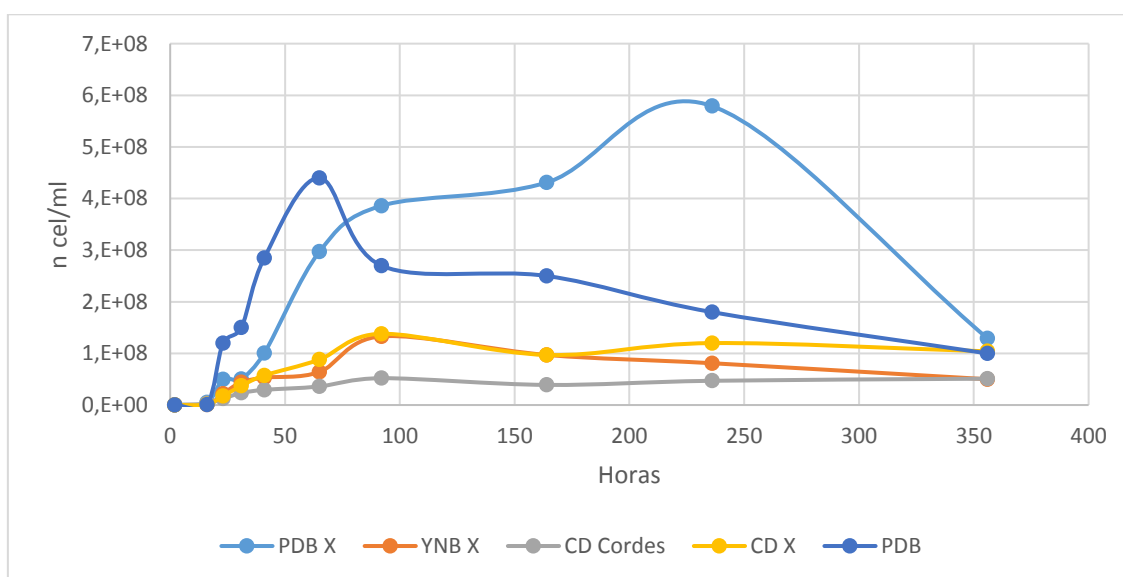


Figura 48 - Recuento de células viables de la levadura seleccionada *Pseudozyma* sp. EBV 97-87. Escala logarítmica. PDBX: Potato dextrose Broth + xilano 1% , YNB X: Yeast Nitrogen Base + xilano 1%, CDmCorDes: Czapek-Dox modificado + corteza de *E. dunnii* deslignificada, CDmX: Czapek-Dox modificado + xilano 1%, PDB: Potato Dextrose Broth.

Al analizar los resultados obtenidos con la levadura, en el cribado cuantitativo (capítulo 5) se obtuvo una actividad de 0.8 U/mL en el medio YNB X a las 48 horas de cultivo, sin embargo, este medio no resultó ser el mejor para la producción de estas enzimas, según ensayos posteriores. Se probó otro medio de cultivo mínimo, Czapek-Dox, con un

agregado de extracto de levadura y peptona en muy bajas concentraciones (CDm X) y se alcanzó una actividad de 37.8 U/ml a las 164 horas.

En PDB X el crecimiento fue del mismo orden que en el resto de los medios, a lo largo de todo el experimento, pero no se vio reflejado en una mayor actividad. En medio mínimo como el CDm, junto con el agregado de xilano, como fuente de carbono y energía, se aumentó la actividad a pesar de tener un crecimiento menor. La levadura al verse privada de una fuente de carbono accesible (como en el caso del PDB que contiene alta cantidad de azúcares) podría inducir la producción de la enzima. Esta producción se observa durante la fase estacionaria de crecimiento del microorganismo, como se muestra en la curva de células viables (Figura 48) y no viene acompañado de un mayor número de células (la mayor concentración de células se observa en el medio de cultivo rico PDB X y PDB). Por otro lado, se ha reportado que la glucosa puede ser inhibidora de estas enzimas. De los resultados obtenidos se desprende que, en este caso, la actividad no depende del crecimiento del microorganismo y sí de la composición del medio de cultivo.

Se reportaron comportamientos similares de producción de xilanasas y crecimiento en el estudio de dos cepas de *Pseudozyma aphidis* y *Pseudozyma antarctica* en medio con xilano. Se reportan que si bien el crecimiento de células se dio entre los 2 y 4 días, la mayor actividad se obtuvo a los 10 días (Faria *et al.*, 2014). En el resto de la literatura sobre este género, se han reportado las mayores actividades xilanasas a las 48, 96, 72 horas, utilizando xilosa, xilano comercial de haya o avena, glucosa y celobiosa (Adsul, Bastawde y Gokhale, 2009; Borges *et al.*, 2014; Neto *et al.*, 2016).

En la Figura 47 se observa además que si bien la producción de xilanasas en el medio CDmCorDes, no es la mayor de todos los ensayos realizados, es una buena actividad (15.9 U/ml) al ser producida en un medio con un residuo como fuente de carbono y energía. Si observamos la composición de esta corteza vemos que tiene un 65 % celulosa y 16 % xilano (ver página 127). Este porcentaje de hemicelulosa es bajo si comparamos con otros residuos como por ejemplo la mazorca de maíz que tiene un alto contenido en xilano (El-Gendy, 2014).

Sería interesante estudiar el uso de la mazorca de maíz y otros residuos ricos en hemicelulosas para la producción de xilanasas ya que podrían actuar como inductores de la expresión enzimática.

#### *Hongo filamentoso*

Se estudió la actividad xilanasas producida en el hongo *Penicillium* sp. EBV 95-17 en cuatro medios de cultivo, los resultados se muestran en la Figura 49.

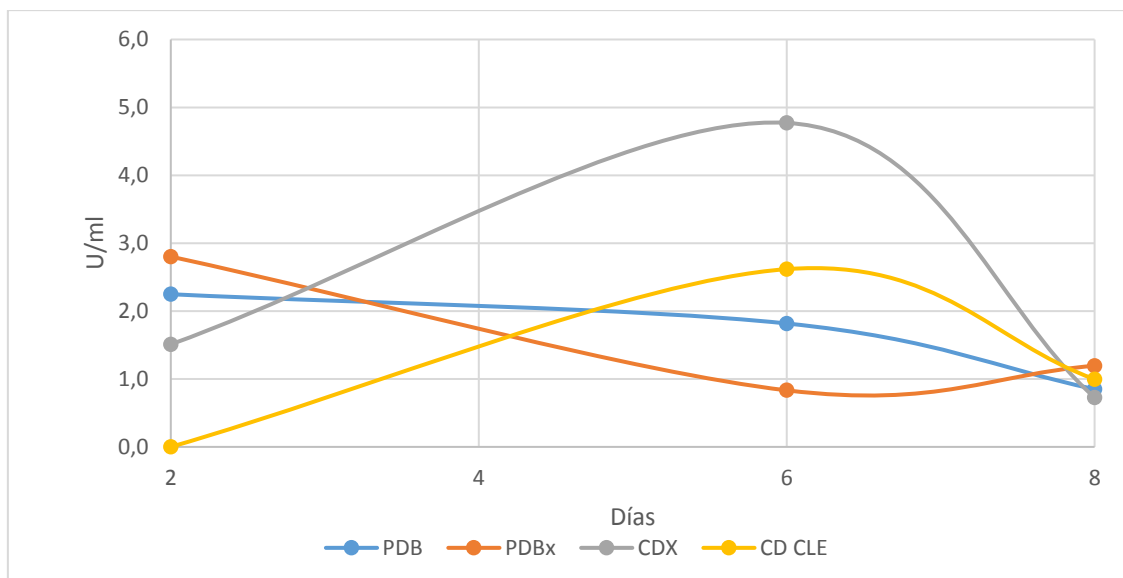


Figura 49 - Actividad xilanasa en el hongo seleccionado *Penicillium* sp. EBV 95-17 . PDB: Potato Dextrose Broth; PDBx: Potato Dextrose Broth + xilano 1% , CDX: Czapek-Dox + xilano 1%, CD CLE: Czapek-Dox + corteza de *E. dunnii* libre de extractivos 1%.

La máxima actividad se obtiene a los 6 días, en el medio CD con el agregado de xilano (4.8 U/ml) (Figura 49). El resto de las actividades medidas no superan las 2.8 U/ml. A los 8 días todas las actividades decrecen. En la literatura sobre xilanasa de cepas del género *Penicillium* se encuentra una gran variedad de resultados y los autores indican que la producción de xilanasa varía según la cepa y para algunas especies es altamente dependiente de la fuente de carbono utilizada (Milagres y Prade, 1994; Chavez, Bull y Eyzaguirre, 2006; Jaejung *et al.*, 2012; Rai *et al.*, 2016).

El perfil de actividad xilanasa encontrado para esta cepa de *Penicillium* sp. EBV 05-17 es similar al reportado en el trabajo de Marjamaa y colaboradores, los que obtuvieron máxima actividad xilanasa entre los días 4 y 6 de crecimiento en los cultivos de *Penicillium pulvillorum* TUB F-2220 y *Penicillium cf. simplicissimum* TUB F-2378 al utilizar un sustrato puro (AVICEL) como fuente de carbono y al usar residuos lignocelulósicos la actividad fue menor (Marjamaa *et al.*, 2013).

Con los resultados obtenidos se pudo constatar que el medio de cultivo influye sobre la actividad xilanasa en los tres microorganismos. Por lo tanto, para continuar con la producción de las enzimas xilanasas se seleccionaron las siguientes condiciones:

- a- Bacteria: ***Bacillus* sp.** EBV12-22 cultivada en el medio TSB X: TSB + xilano 1%, durante un tiempo de 72 horas.
- b- Levadura: ***Pseudozyma* sp.** EBV97-87 cultivada en el medio CDm X: Czapek-Dox + extracto levadura 0,1% y peptona 0,5%+ xilano 1%, durante un tiempo de 96 horas.

- c- Hongo filamentoso: *Penicillium sp.* EBV95-17 cultivado en el medio CD X: Czapek-Dox + xilano 1% durante un tiempo de 6 días.

Como se puede observar no se seleccionaron los tiempos en donde se vieron las actividades máximas, sino que la decisión se realizó basada en un compromiso entre acortar los tiempos de cultivo y obtener una buena actividad enzimática.

## 8.2.2. Obtención del crudo enzimático a partir de los medios de cultivo seleccionados

Se realizaron nuevamente los experimentos descritos anteriormente y los sobrenadantes de los cultivos seleccionados, se centrifugaron para separar las células y se concentraron por precipitación salina hasta un 70 % de saturación con sulfato de amonio a 4°C. Estos sólidos se resuspendieron en el buffer de actividad, para utilizarlos en los estudios posteriores de hidrólisis de diferentes sustratos. Se midió nuevamente actividad y cantidad de proteína. Estos resultados, se muestran a continuación en la Tabla 9. Se observó en todos los casos, una concentración de la actividad y un aumento en la actividad específica.

Tabla 9- Resultado de actividad enzimática y específica de los extractos enzimáticos de *Pseudozyma sp.* EBV 97-87; *Bacillus sp.* EBV 12-22 y *Penicillium sp.* EBV 95-17. Inicial: Actividad en Medio seleccionado, Resuspendida: actividad del precipitado obtenido luego de agregar 70% sulfato de amonio, resuspendido en buffer utilizado para medir actividad.

<i>Pseudozyma sp.</i>	Actividad enzimática (U/ml)	Actividad específica (U/mg)	<i>Bacillus sp.</i>	Actividad enzimática (U/ml)	Actividad específica (U/mg)
Inicial	10,5	1,3	Inicial	7,9	0,5
Resuspendida	120,3	2,2	Resuspendida	197,3	2,1

<i>Penicillium sp.</i>	Actividad enzimática (U/ml)	Actividad específica (U/mg)
Inicial	2,3	1,6
Resuspendida	4,2	6,2

La precipitación salina es un método comúnmente utilizado como paso inicial en la purificación de enzimas. El mismo permite una primera separación del crudo enzimático de los componentes del medio de cultivo que pueden llegar a interferir en experimentos posteriores. En este caso, el xilano remanente, interferiría en la utilización posterior de estos extractos. El inconveniente de este método es que luego de resuspender el precipitado, puede quedar una concentración alta de la sal utilizada y podría interferir en la actividad enzimática (según la enzima) o en otros análisis. Es por eso que



generalmente, se siguen pasos de gel filtración o diálisis posteriores (Wingfield, 2001; Duong-Ly y Gabelli, 2014). En este caso no se perdió actividad por la alta concentración de sal, así que no se siguió con ningún otro paso de purificación.

Para los tres crudos enzimáticos se utilizó el mismo porcentaje de sulfato de amonio, esta cantidad se determinó en experimentos previos y resultó satisfactoria para todos los casos (resultados no mostrados). Se estudió posteriormente la capacidad de estos crudos de hidrolizar xilano comercial.

### 8.2.3. Estudio de la biotransformación de xilano mediante las enzimas precipitadas.

Los perfiles de hidrólisis del xilano de haya comercial por TLC obtenidos de los tres microorganismos se muestran en la Figura 50. Los Rf de los estándares de oligoxilanos (XOS) utilizados se muestran en la Tabla 10.

En la Figura 51 se observan los cromatogramas superpuestos de los productos de hidrólisis analizados por HPLC.

Tabla 10 - Rf de los estándares de xilooligosacáridos (XOS).

Oligoxilano (STD)	Xilosa (X1)	Xilobiosa (X2)	Xilotriosa (X3)	Xilotetrosa (X4)	Xilopentosa (X5)	Xilohexosa (X6)
Rf	0,61	0,48	0,37	0,26	0,19	0,12

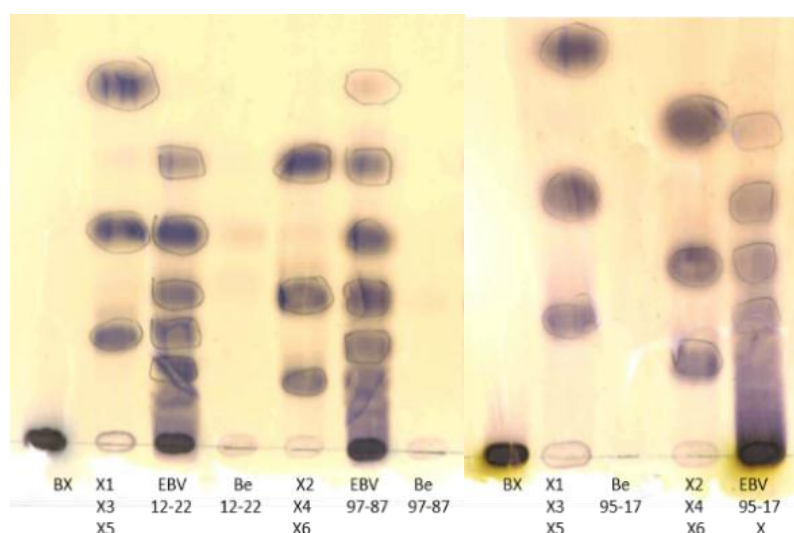


Figura 50- Productos de hidrólisis del xilano comercial con los distintos microorganismos. EBV 12-22: *Bacillus* sp., EBV 97-87: *Pseudozyma* sp. y EBV 95-17: *Penicillium* sp. Be 12-22: sobrenadante de enzima de *Bacillus* sp. Be 97-87: sobrenadante de enzima de *Pseudozyma* sp. Be 95-17: sobrenadante de enzima de *Penicillium* sp. BX: blanco xilano sin enzima, X1, X2, X3, X4, X5 y X6: estándares de oligoxilanos (arriba se muestran los Rf de los mismos).

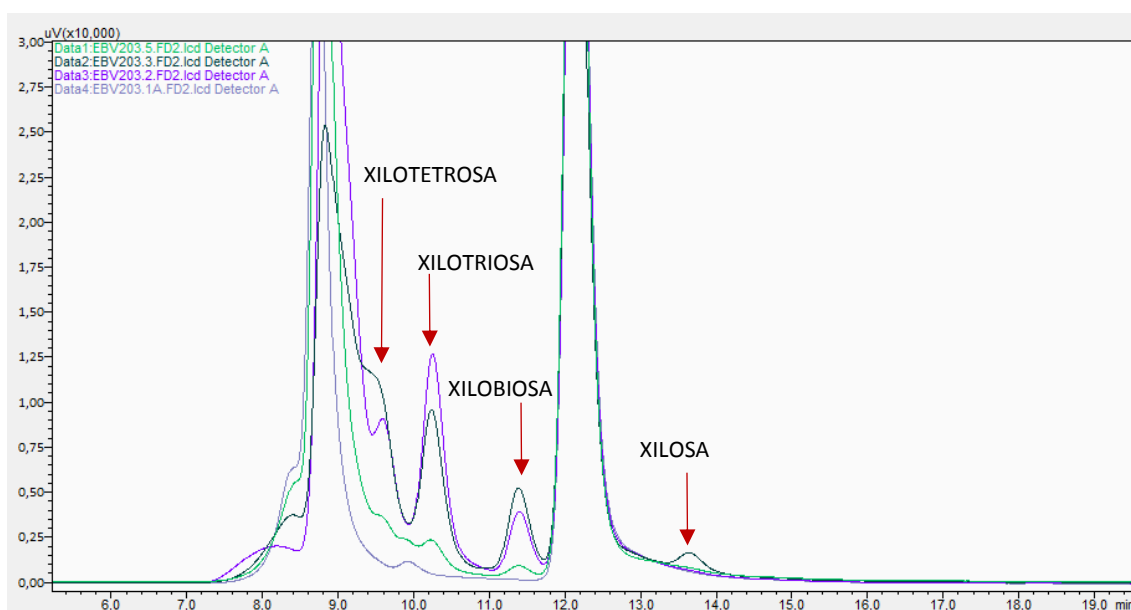


Figura 51 - Comparación de cromatogramas de hidrólisis de xilano comercial) gris: xilano sin hidrolizar, verde: hidrólisis con enzimas de *Penicillium* sp. EBV 95-17, negro: hidrólisis con enzimas de *Pseudozyma* sp. EBV 97-87, violeta: hidrólisis con enzimas de *Bacillus* sp. EBV 12-22.

Se identificaron por TLC X2, X3, X4, X5 y X6 como productos principales de la hidrólisis del xilano de haya comercial cuando se lo sometió a la acción del extracto enzimático de *Bacillus* sp. EBV 12-22. Al no observarse xilosa como producto, se deduce que el extracto no muestra actividad  $\beta$ -xilosidasa. Los xilooligosacáridos correspondientes a X2, X3 y X4 se confirman por HPLC (Figura 51). Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por otros autores, como Reddy y Krishnan sobre el estudio de los oligosacáridos producidos por *Bacillus subtilis* KCX006, en un medio en el que utilizaron material lignocelulósico como fuente de carbono e identificaron X2 y X3 como productos mayoritarios (Reddy y Krishnan, 2016). Estos investigadores describen la presencia de endo-xilanasas. Se probaron por otros autores extractos crudos de cultivos de *Bacillus mojavensis* A21, sobre xilano extraído de marlo del maíz y los productos mayoritarios resultaron ser X2 y X3 luego de ocho horas a 50°C y pH de 8 (Haddar *et al.*, 2012). Por otro lado, se estudió una endo-xilanasa purificada de una cepa de *B. subtilis* DFR40 aislada de suelo, en la hidrólisis de salvado de trigo durante 48 horas y los productos mayoritarios fueron X2, X3 y X4 (Raj Xavier, Ramanay Sharma, 2018). Los resultados obtenidos junto con la información sobre el modo de acción de las xilanasas podrían indicar que se trata de un extracto con actividad endo-xilanasas.

Los datos encontrados hasta el momento en donde se observa que el género *Bacillus* no produce xilosa a partir de la hidrólisis de xilano y, a su vez, los mismos son concordantes con los resultados obtenidos en esta tesis indican que el extracto enzimático producido

por *Bacillus* sp. EBV 12-22 podría utilizarse para producir XOS de interés como prebióticos.

Como se puede observar en las Figuras 46 y 47, los productos de hidrólisis de xilano con las enzimas de *Pseudozyma* sp. EBV97-87 incluyen no solo xilosa, sino también otros oligosacáridos los cuales podrían corresponder a X2, X3, X4 y otros de mayor grado de polimerización, analizando sus Rf (Figura 50, Tabla 10) y su tiempo de retención en el análisis por HPLC (Figura 51). Este resultado estaría indicando que posiblemente el extracto enzimático de la cepa de *Pseudozyma* aislada en esta tesis también presenta actividad  $\beta$ -xilosidasas o que se trata de una xilanasa capaz de liberar xilosa a partir de oligosacáridos pequeños como X3. Esta observación la realizaron Watanabe y su grupo, al purificar una xilanasa de *Pseudozyma antarctica* GB-4(0) y analizar los productos de hidrólisis del xilano de haya comercial, los cuales fueron xilosa (X1), xilobiosa (X2), xilotriosa (X3) y otros xilololosacáridos de xilano. Ellos estudiaron si esta xilanasa tenía actividad  $\beta$ -xilosidasa, y encontraron un resultado negativo, por lo tanto esta enzima no podía hidrolizar la xilobiosa en xilosa. La xilosa detectada podría haber resultado de la hidrólisis de otros xilooligosacáridos mayores a X2. Además lograron clasificar la enzima según la secuencia del módulo catalítico en la familia GH10, las cuales exhiben mayor afinidad por  $\beta$ -1,4-xiloligosacáridos más cortos y lineales que las xilanasas de la familia GH11 (Biely *et al.*, 1997). Estos datos, entonces, concluyeron que las xilanasas aisladas de *P. antarctica* GB-4(0) corresponderían a endoxilanasas (Watanabe *et al.*, 2015).

La xilanasa PbXynA purificada de *Pseudozyma brasiliensis* GHG001 por Borges y colaboradores dio como productos de hidrólisis del xilano de haya un conjunto de XOS que fueron desde X2 hasta X6 y luego de veinte horas se observó la liberación de pequeñas cantidades de xilosa (Borges *et al.*, 2014). Obtuvieron resultados similares a los alcanzados en esta tesis pero en un mayor tiempo de reacción. Debido a que en esta tesis se utilizó el extracto enzimático obtenido a partir de la precipitación con sulfato de amonio no se pudo determinar si se trata de un extracto con actividad únicamente xilanasa o también presenta actividad  $\beta$ -xilosidasa en el crudo enzimático.

Sin embargo los reportes de Adsul y colaboradores indican que utilizando endo-xilanasas purificadas de una cepa de *Pseudozyma hubeiensis* NCIM 3574 se obtuvieron XOS de 3 – 7 unidades de xilosa pero no se producía ni X1 ni X2 a partir de la hidrólisis de xilano de trigo (Adsul, Bastawde y Gokhale, 2009). Esta diferencia podría ser por la estructura del xilano utilizado, en los cereales en general se trata de arabinoxilanos con ácido ferúlico como sustituyente que podría interferir en el sitio activo de la enzima (Biely, Singh y Puchart, 2016).

Finalmente, los productos obtenidos por la hidrólisis del xilano de haya (comercial) con el extracto enzimático de *Penicillium* sp. EBV 95-17 según se determinó mediante TLC fueron X3, X4 y X5. Similar perfil obtuvieron Driss y colaboradores los cuales observaron para la hidrólisis de xilano de la mazorca de maíz, utilizando una enzima inmovilizada de *Penicillium occitanis* los productos obtenidos fueron X3 mayoritariamente y en menor medida X2 (Driss *et al.*, 2014). Otro estudio realizado con una xilanasa purificada de *Penicillium janczewskii* sobre diferentes xilanos comerciales dio como resultado X3, X4 y principalmente xilooligosacáridos (XOS) más grandes, por lo tanto, ellos clasifican esta enzima como una enzima tipo endo-xilanasa (Terrasan, Guisan y Carmona, 2016).

Para futuros ensayos se decide seguir trabajando con las enzimas de *Pseudozyma* sp. EBV 97-87 y *Bacillus* sp. EBV 12-22 ya que con *Penicillium* sp. EBV 95-17 no se obtuvo una buena producción de enzima en las condiciones analizadas.

#### 8.2.4. Caracterización de las xilanasas según pH y temperatura

Las condiciones óptimas para la actividad de las enzimas en términos de temperatura y pH fueron investigados en base al estudio de la actividad enzimática en las diferentes condiciones sobre los extractos concentrados de *Pseudozyma* sp. EBV97-87 y *Bacillus* sp. EBV 12-22.

##### *Bacillus* sp. EBV 12-22

Como se observa en la Figura 52, la xilanasa de *Bacillus* sp. EBV 12-22 exhibió una actividad máxima a pH 7.1 y mostró un rango óptimo entre los pH 6.6 y 7. Pierde un 26 % de actividad a pH 8.4 (actividad a 7.1 contada como 100 %). A pH 9.8 pierde un 85 % de actividad. Otras xilanasas producidas por *Bacillus* reportadas muestran grandes diferencias en su pH óptimo, yendo desde valores ácidos, como en el caso de la xilanasa GH 11 de la cepa *B. amyloliquefaciens*, el pH óptimo fue de 4 (Baek *et al.*, 2012) a valores de 6.5 para una cepa de *B. subtilis* (Chang *et al.*, 2017); pH 7 en una cepa de *B. altitudinis* (Adhyaru, Bhatt y Modi, 2014) y hasta pH óptimos de 9, como en el caso de la xilanasa de una cepa de *B. mojavenensis* (Akhavan Sepahy, Ghazi y Akhavan Sepahy, 2011).

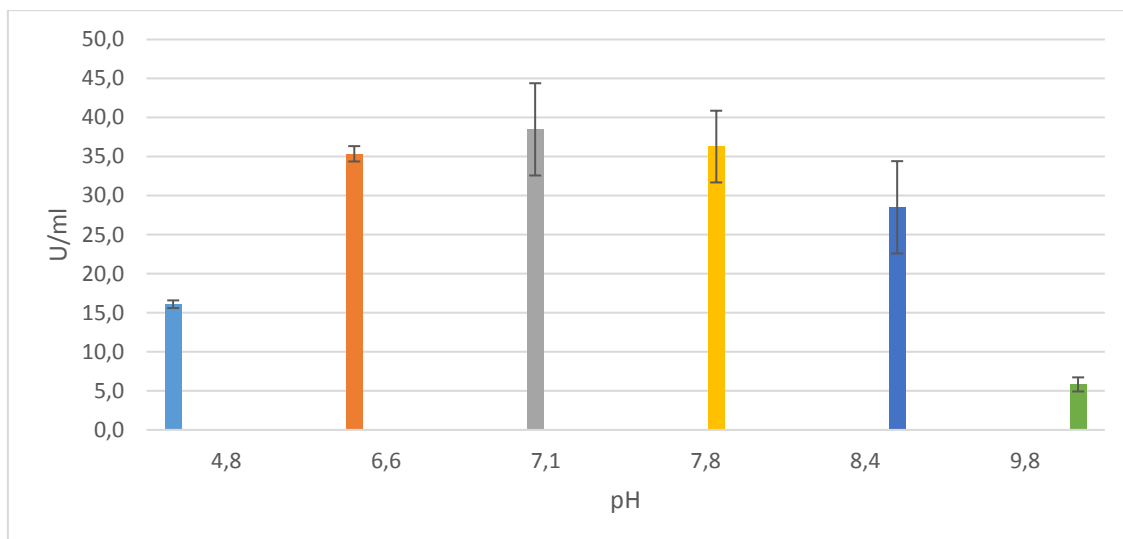


Figura 52 - Determinación del rango de pH óptimo en xilanasas de *Bacillus* sp. EBV 12-22

El rango de temperaturas óptimas de la actividad xilanasas de la cepa aislada en esta tesis es entre 50 °C y 60 °C pero cae notoriamente a los 70 °C (Figura 53). Este resultado es diferente al de la xilanasas de *B. amyloliquefaciens* que presentó una temperatura óptima de 70 °C (Amore *et al.*, 2015) o la xilanasas de *B. subtilis* la cual presentó mayor actividad a 100 °C (Raj Xavier, Ramana y Sharma, 2018). Sin embargo se han reportado otras xilanasas con temperaturas óptimas similares a las obtenidas para EBV 12-22, como la de una cepa de *B. mojavensis*, la cual mostró actividad óptima a 50 °C (Haddar *et al.*, 2012). Otro caso son las xilanasas de tres aislamientos de *Bacillus* sp. con temperaturas óptimas entre 50 °C y 55 °C (Anuradha *et al.*, 2007).

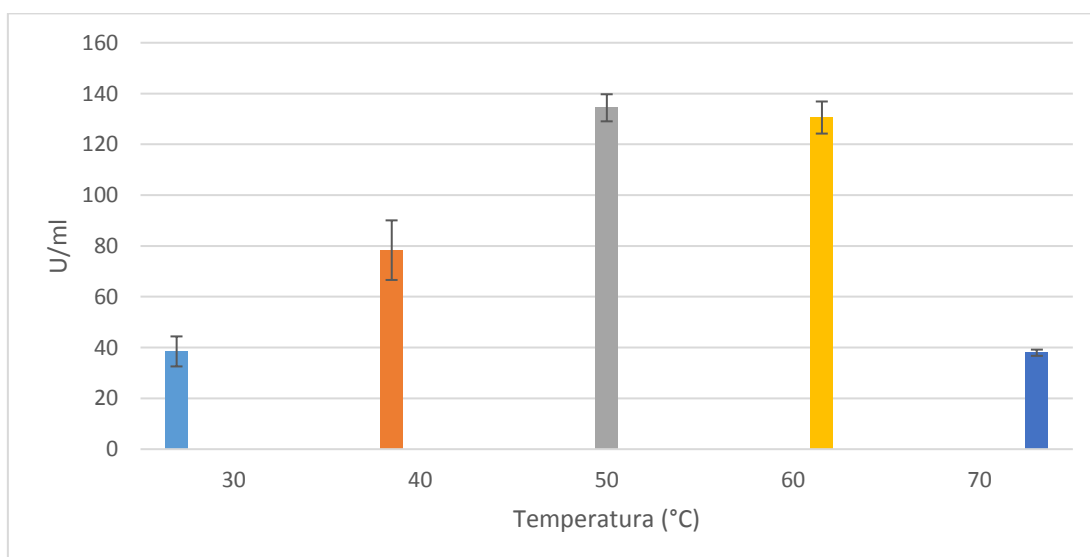


Figura 53 - Determinación del rango de temperatura óptimo en xilanasas de *Bacillus* sp EBV 12-22

*Pseudozyma* sp. EBV97-87

Como se muestra en la Figura 54 el extracto parcialmente purificado de *Pseudozyma* sp. EBV97-87 exhibió actividad en el rango de pH de 3.0-8.0 con un óptimo en el rango de 3.9 a pH 4.8, lo que sugiere que es una xilanasa ácida.

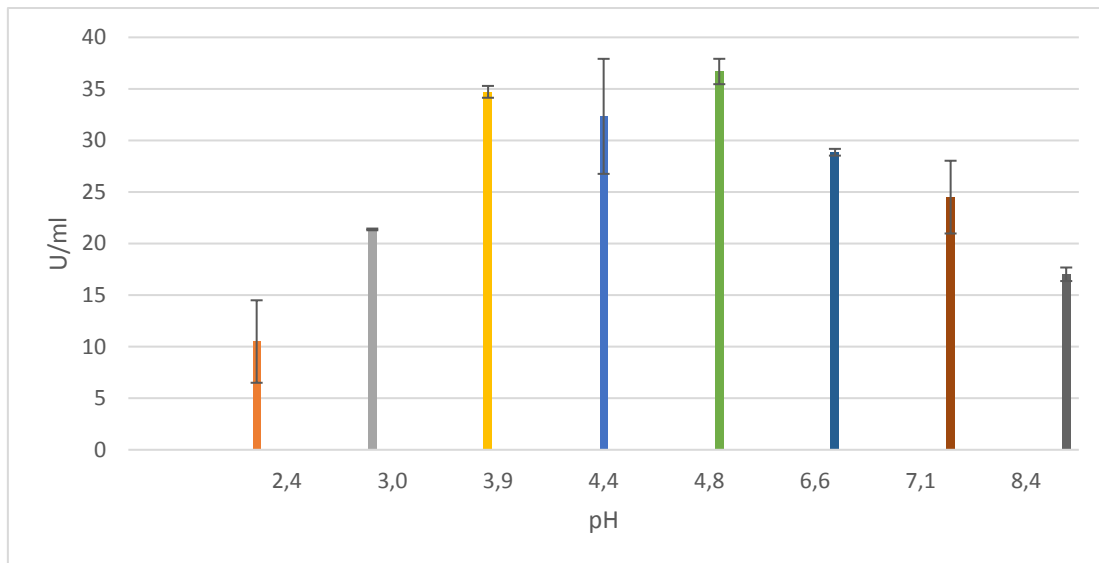


Figura 54 - Determinación del rango de pH óptimo en xilanasas de *Pseudozyma* sp. EBV97-87.

El estudio de temperatura óptima se realizó en el pH óptimo de actividad (pH=4.8) y se encontró que la temperatura óptima es de 50°C (139.1 U/ml) (Figura 55).

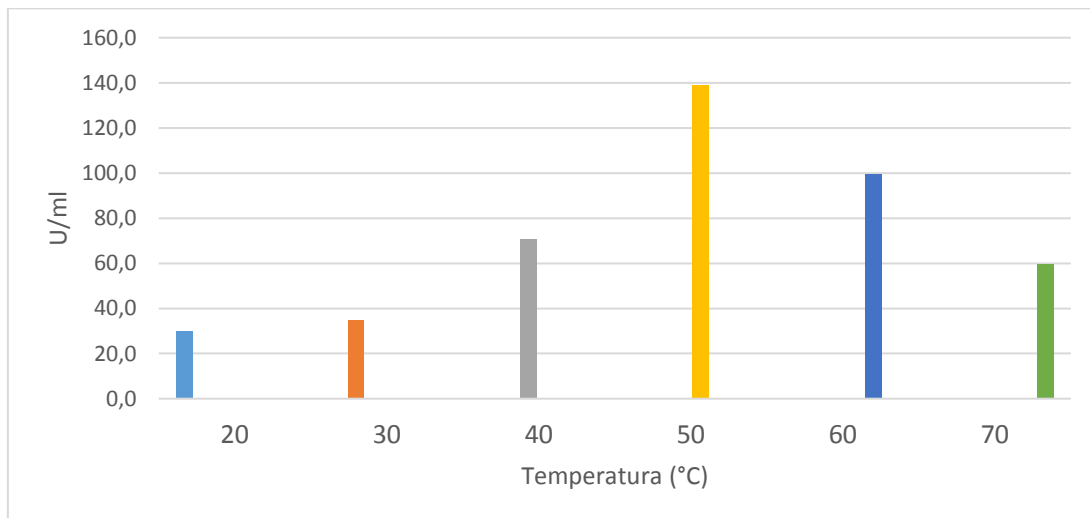


Figura 55 - Determinación del rango de temperatura óptimo en xilanasas de *Pseudozyma* sp. EBV97-87.

Estos datos están de acuerdo con la literatura donde la actividad máxima de xilanasas originarias de *Pseudozyma* está entre pH 4.0 y 6.5 y las temperaturas están entre 40 °C y 65 °C (Adsul, Bastawde y Gokhale, 2009; Borges *et al.*, 2014; Watanabe *et al.*, 2015).

## 8.2.5. Estabilidad térmica y peso molecular de xilanasa de *Pseudozyma* sp. EBV 97-87

Se determinó la estabilidad térmica del extracto concentrado, obtenido del cultivo de *Pseudozyma* sp. EBV 97-87, en las temperaturas de 4, 30 y 50 °C a diferentes tiempos. Se desprende de la Figura 56 que a 50 °C la enzima pierde el 90 % de su actividad luego de 24 horas. Sin embargo a 4 y 30 °C los perfiles de pérdida de actividad son similares, a las 24 horas baja a un 64 % en ambos casos y luego se mantiene estable hasta las 144 horas y comienza a descender y a las 408 horas tienen solamente el 22 y 24 % de la actividad inicial respectivamente.

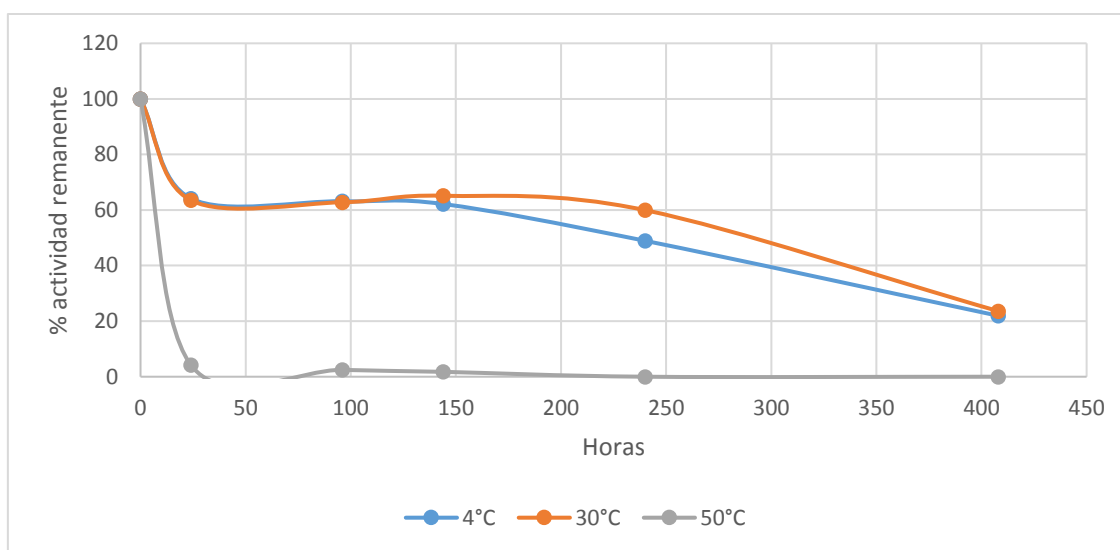


Figura 56 - Porcentaje de actividad remanente del extracto enzimático parcialmente purificado obtenido del cultivo de *Pseudozyma* sp. EBV 97-87 y conservado a 4, 30 y 50 °C.

Se ha reportado que la estabilidad térmica es una variable importante en la actividad enzimática y en los usos posibles que pueden lograrse con las enzimas (Ali El Enshasy *et al.*, 2016). Si bien a 4 °C o 30 °C luego de 24 horas pierden aproximadamente un 35 % de la actividad, esta se mantiene hasta las 144 horas. Este resultado es de gran importancia ya que indica que la enzima puede conservarse durante ese tiempo y para ser utilizada. Si bien su temperatura óptima es a 50 °C, el extracto no es estable a esa temperatura. Esta observación se ha reportado previamente para xilanasas de este y otros géneros de microorganismos (Baek *et al.*, 2012; Robledo *et al.*, 2015; Nieto-Domínguez *et al.*, 2017; Raj Xavier, Ramana y Sharma, 2018). La termoestabilidad es importante para las diferentes aplicaciones industriales de las enzimas, y esta se puede llegar a mejorar con modificaciones genéticas (Yang *et al.*, 2017).

Los trabajos de estabilidad térmica reportados sobre las enzimas de *Pseudozyma*, no estudian la estabilidad de la actividad en tiempos largos a diferentes temperaturas, sino que se estudia la estabilidad a una temperatura por un tiempo corto como ser 10, 15 o

30 minutos. Igualmente muestran la inestabilidad de estas xilanasas a temperaturas cercanas a las óptimas, lo que apoya los resultados obtenidos para *Pseudozyma* sp. EBV 97-87. Por ejemplo el trabajo de Watanabe y colaboradores observaron que 30 minutos a 57 °C la xilanasas PaXynG de *P. antártica* pierde la mitad de su actividad siendo su temperatura óptima de actividad 50°C (Watanabe *et al.*, 2015). En el estudio de Adsul sobre las dos xilanasas de *P. hubeiensis* indican que la mitad de la actividad se pierde luego de 15 minutos a 70 °C para la enzima PhX33 y a 60 °C luego de 10 minutos para la enzima PhX20 siendo las temperaturas óptimas 60 y 55 °C respectivamente (Adsul, Bastawde y Gokhale, 2009).

Por último se realizó una cromatografía de exclusión por tamaño del extracto enzimático para conocer el peso molecular de la xilanasas de interés. De cada pico que se observó en el cromatograma se midió actividad y se determinó que solo uno de ellos fue positivo, por lo tanto en el extracto solo se encuentra una enzima con actividad xilanasas y la misma presenta un peso molecular de 19.9 kDa según la curva de calibración realizada (Figura 57).

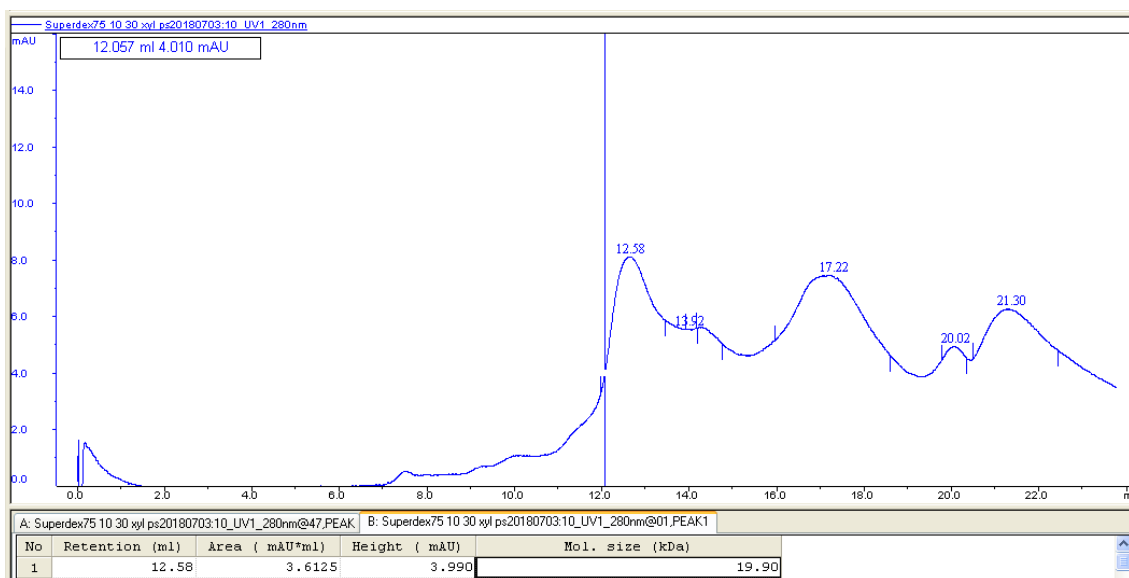


Figura 57 - Perfil de elución de picos de proteínas separadas por gel filtración del extracto enzimático de *Pseudozyma* sp. EBV 97-87.

Las xilanasas reportadas para *Pseudozyma* hasta la fecha han presentado pesos moleculares de 33 kDa en *P. antarctica* GB-4(0) (Watanabe *et al.*, 2015), 33.5 kDa y 20.1 kDa en *P. hubeiensis* NCIM 3574 (Adsul, Bastawde y Gokhale, 2009) y 24 kDa en *P. brasiliensis* GHG001 (Borges *et al.*, 2014).

Se realizó una TLC de la reacción entre el xilano de haya y las fracciones obtenidas de la gel filtración correspondientes al pico de la xilanasas. En la Figura 58 se observan los productos obtenidos luego de 15 minutos de reacción. Se observa la producción de xilosa



y XOS mayores, por lo que se concluye que la enzima purificada es capaz de liberar xilooligosacáridos y xilosa a la vez.



Figura 58 – TLC de hidrólisis de xilano de haya con xilanasa purificada de EBV 97-87, en los extremos dos fracciones correspondientes a la fracción eluída con actividad xilanasa de *Pseudozyma* sp. EBV 97-87, en el centro el estándar de xilosa.

Resultado similar a la xilanasa reportada por Borges y colaboradores, purificada de *P. brasiliensis* GHG001, que produce xilosa luego de 3 horas de hidrólisis del xilano de haya.

### 8.2.6. Producción de xilanasa de *Pseudozyma* sp. EBV 97-87 en medio de cultivo con diferentes residuos

Para reducir los costos de producción de la enzima xilanasa de *Pseudozyma* sp. EBV 97-87 se probaron diferentes residuos agroindustriales y lignocelulósicos. En concreto se utilizó salvado de avena (SA), paja de arroz (PA), yerba mate usada (YMU), cáscara de naranja seca (CNS), mazorca de maíz (MM), cebada usada (CU) en una concentración del 1% p/v.

En la Figura 59 se observan los resultados de actividad xilanasa obtenidos para las diferentes fuentes de carbono utilizadas.

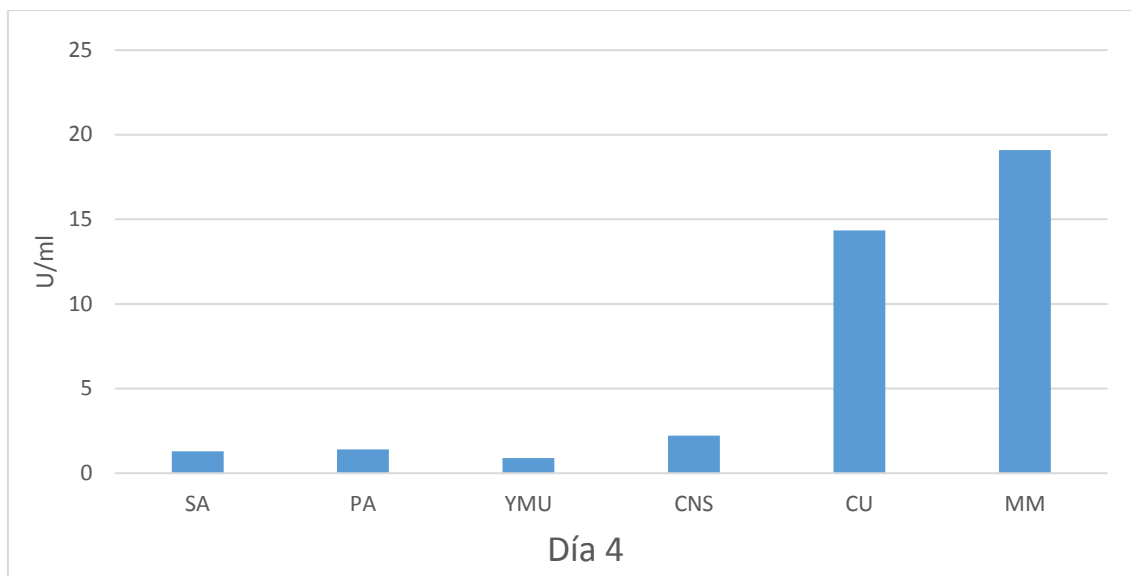


Figura 59 - Actividad xilanasa en el medio CDm con diferentes residuos como fuente de carbono: salvado de avena (SA), paja de arroz (PA), yerba mate usada (YMU), cáscara de naranja seca (CNS), mazorca de maíz (MM), cebada usada (CU).

En todos los casos se observó crecimiento del microorganismo por observación de turbidez en los matraces. Las actividades más altas se observaron en los medios con cebada usada y mazorca de maíz. Ambos residuos están compuestos de aproximadamente un 28 - 35 % de hemicelulosa con su cadena principal formada por unidades de xilosa. En el caso de la cebada usada (dependiendo del tipo de cebada, el malteado y el resto de los procesos de fabricación de la cerveza) aproximadamente un 20 % corresponde a la porción de xilanos, a su vez también es fuente de proteínas (Rochados Santos Mathias, Moretzsohn de Mello y Camporese Srvalo, 2014; Amore *et al.*, 2015). La mazorca de maíz posee un 30 % de hemicelulosa (Li *et al.*, 2015). Por tanto ambos residuos presentan una mayor concentración de hemicelulosas que la corteza de *E. dunnii* designificada utilizada en la actividad 8.2.1 de este capítulo. Estos dos residuos agroindustriales son considerados biomasa de bajo costo y contienen una composición de azúcares alta de interés en la biorrefinería. La producción de enzimas a partir de ellos aportaría a valorizarlos desde el punto de vista económico y a disminuir la formación de residuos con altos contenidos de materia orgánica (dos Santos Mathias *et al.*, 2015).

En los estudios reportados sobre producción de xilanasa de cepas de *Pseudozyma* sp. sólo se han realizado experimentos con aguas residuales de destilería de bioetanol lignocelulósico provenientes de la hidrólisis de la paja de arroz (LBDW). Este residuo contiene altas concentraciones de xilosa (ya que *Saccharomyces cerevisiae* no la utiliza como fuente de carbono) y obtuvieron 17.3 U/ml luego de 72 horas de cultivo con *P. antarctica* GB-4(0) (Watanabe *et al.*, 2015). Estos valores son similares a los obtenidos en la tesis con el marlo del maíz y la cebada usada.

## 8.3. Conclusiones

---

- Se seleccionó para cada microorganismo un medio de cultivo y un tiempo para producir la enzima de interés y se encontró que el xilano es un buen inductor de la actividad xilanasa para todas las cepas estudiadas.
- Se obtuvo una concentración de la actividad xilanasa utilizando sulfato de amonio al 70 % en todos los casos.
- El producto de hidrólisis del xilano comercial con el extracto enzimático de la levadura, es principalmente xilosa, xilobiosa y xilotriosa, también se identificaron X4, X5 y X6 por TLC.
- Los productos de hidrólisis con las enzimas del hongo filamentoso incluyen oligosacáridos, X3, X4, X5 y en menor medida X2. En este caso no se observa xilosa.
- La hidrólisis con xilanasas de *Bacillus* sp. EBV 12-22 se observa xilobiosa, X3, X4, X5 y X6. Tampoco se observa xilosa como producto final.
- El perfil hidrolítico de las enzimas provenientes de los tres microorganismos es distinto, aunque todas parecen ser endo-activas por los productos obtenidos.
- Se caracterizaron los pH y temperaturas óptimas de las enzimas de *Pseudozyma* sp. EBV 97-87 y *Bacillus* sp. EBV 12-22. En el caso de la xilanasa de *Bacillus* sp. EBV 12-22, el rango óptimo de pH fue entre 6.6 y 7.8 y temperatura óptima entre 50 y 60 °C. En el caso de *Pseudozyma* sp. EBV 97-87 se encontró que si bien es activa en un amplio rango de pH el rango óptimo es entre 4.0 y 4.8 y la mejor temperatura es 50 °C.
- El extracto enzimático parcialmente purificado de *Pseudozyma* sp. EBV 97-87 resultó estable a 4 °C y 30 °C y luego de 17 días se observa una actividad remanente del 22 y 24 % para ambas temperaturas. Si bien su temperatura óptima es 50 °C, la enzima no es estable a esta temperatura ya que a las 24 horas perdió el 96 % de su actividad.
- El peso molecular de la xilanasa de *Pseudozyma* sp. EBV 97-87 resultó ser de 19.9 kDa y la misma es capaz de producir xilosa y el resto de los xilooligosacáridos a partir del xilano comercial de haya. Estos datos permiten concluir que se trata de una endo-xilanasa.
- Se probaron diferentes residuos agroindustriales para la producción de xilanasa por *Pseudozyma* sp. EBV 98-87 y se encontraron buenas actividades en los medios con cebada usada y mazorca de maíz.

# 9. Estudio de la posible aplicación de las enzimas obtenidas

## 9.1. Metodología

Se presenta en la Figura 60 el esquema de trabajo seguido en este capítulo.

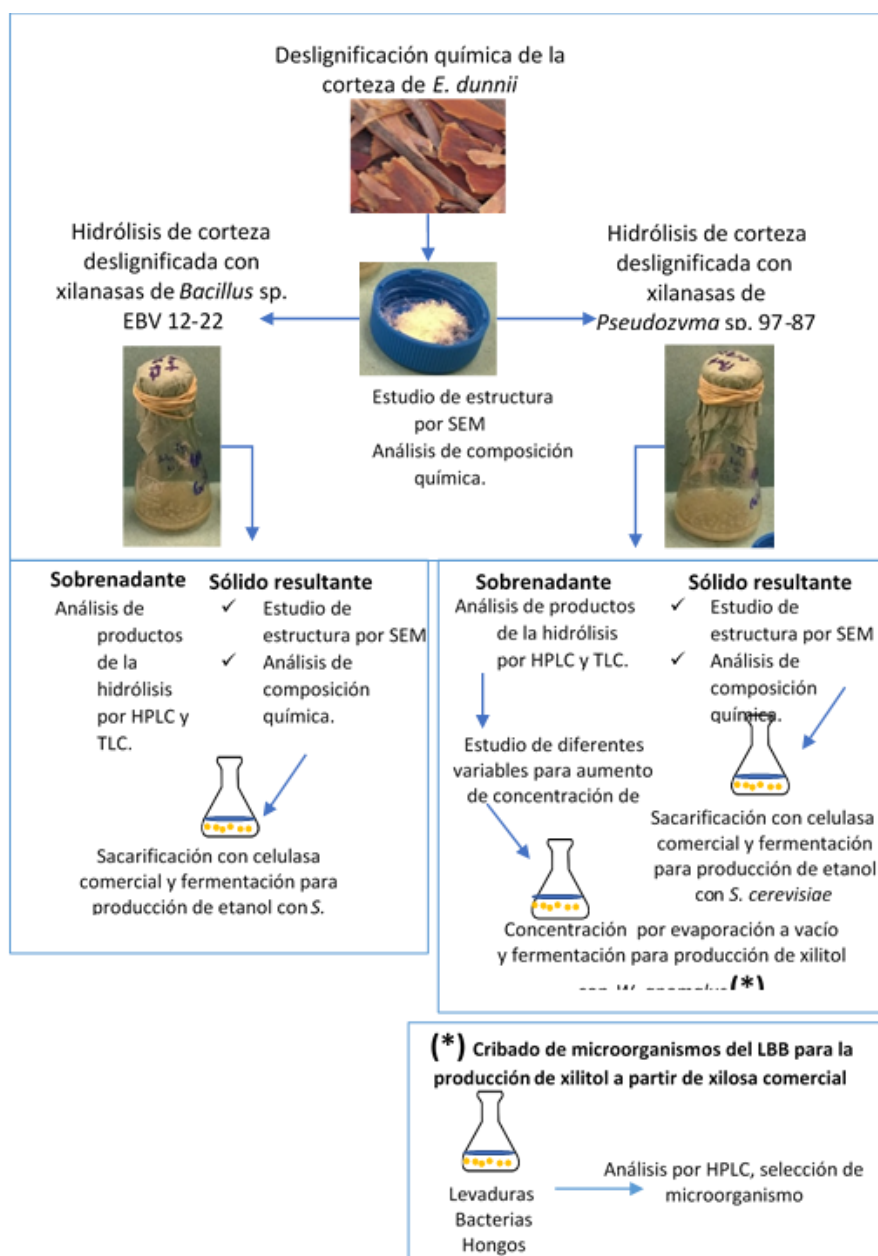


Figura 60 - Esquema seguido para el estudio de la hidrólisis del xilano de la corteza de *E. dunzii* y la posible aplicación de los productos

### 9.1.1. Deslignificación química de la corteza para la hidrólisis enzimática

Se pre-trató 10 gramos de corteza libre de extractivos (ver anexo 12.4.1) con 750 ml de ácido peracético en un matraz de 2 L con agitación a 85°C durante 30 minutos. Luego de ese tiempo, se agregó 1 L de agua destilada y el material resultante (corteza deslignificada) se filtró y se lavó con abundante agua destilada para limpiar los restos de ácido de la superficie. Posteriormente, el material resultante se secó a 40 °C durante una noche y se mantuvo en bolsa hermética hasta su uso (Evtuguin *et al.*, 2003). Se determinó el contenido de lignina, celulosa y hemicelulosa según el procedimiento del National Renewable Energy Laboratory (NREL) descrito en el anexo 12.4.2.

### 9.1.2. Estudio de la biotransformación de corteza deslignificada mediante las xilanasas

#### Ensayo inicial:

#### *Bacillus* sp. EBV 12-22:

- 100 mg de corteza deslignificada se le agregan 3 ml de buffer citrato 0.05M, pH 4.8, extracto parcialmente purificado de *Bacillus* sp. EBV 12-22 hasta una concentración final de 50 U/ml de enzima, se ajusta el volumen final a 5 ml. Se deja a 30°C y 150 rpm. Se tomaron muestras a las 0,5 ; 1; 2; 24; 48 y 72 horas de reacción. Este ensayo se realizó por duplicado. (\*)

#### *Pseudozyma* sp. EBV 97-87:

- 100 mg de corteza deslignificada se le agregan 3 ml de buffer citrato 0.05M, pH 4.8, extracto parcialmente purificado de *Pseudozyma* sp. EBV 97-87 hasta una concentración final de 50 U/ml de enzima, se ajusta el volumen final a 5 ml. Se deja a 30°C y 150 rpm. Se tomaron muestras a las 1, 2, 16, 24, 48, 72 y 144 horas. Este ensayo se realizó por duplicado. (\*)
- El mismo ensayo se llevó a cabo además a 50 °C durante 24 horas. Este ensayo se realizó por duplicado. (\*)

#### *Blanco:*

- Se realizó un blanco en las mismas condiciones que los ensayos realizados pero sin el agregado de enzima, se ajusta el volumen final a 5 ml. (\*)

(\*) La corteza con el buffer se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 15 minutos previo a la hidrólisis, luego se agregó la solución de enzima previamente filtrada por 0,22 μm.

### 9.1.2.1. Análisis de corteza resultante

#### 9.1.2.1.1. Estudio de microscopía

Se realizó microscopía electrónica de barrido de las cortezas resultantes del ensayo inicial de hidrólisis y de la corteza sin tratamiento con xilanasas. Para ello el material resultante se adhirió a un soporte de metal y se realizó un recubrimiento de oro en una cámara Denton Vacuum DeskII durante 120 segundos. Las muestras se analizaron en un SEM Jeol-5900 LV (Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido, Facultad de Ciencias, UdelaR) que adquiere y muestra la señal a través del sistema de imágenes X-Stream.

#### 9.1.2.1.2. Análisis de la composición química

Se realizó el estudio de la composición de celulosa y hemicelulosa según el procedimiento del National Renewable Energy Laboratory (NREL) descrito en el anexo 12.4.2. Previamente el material resultante de la hidrólisis se lavó con agua destilada y se secó a 40°C durante 12 horas y luego se utilizó para realizar los análisis.

### 9.1.3. Producción de xilitol

#### 9.1.3.1. Estudio de distintas variables en la producción de xilosa por *Pseudozyma* sp. EBV 97-87:

*Pseudozyma* sp. EBV 97-87

- 400 mg de corteza deslignificada se le agregan 3 ml de buffer citrato 0.05M, pH 4.8, extracto parcialmente purificado de *Pseudozyma* sp. EBV 97-87 hasta una concentración final de 100 U/ml de enzima, se ajusta el volumen final a 5 ml. Se deja a 30°C y 150 rpm durante 96 horas. (\*)
- 500 mg de corteza deslignificada se le agregan 3 ml de buffer citrato 0.05M, pH 4.8, extracto parcialmente purificado de *Pseudozyma* sp. EBV 97-87 hasta una concentración final de 200 U/ml de enzima, se ajusta el volumen final a 5 ml. Se deja a 30°C y 150 rpm durante 96 horas. Este ensayo se llevó a cabo por duplicado. (\*)

(\*) La corteza con el buffer se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 15 minutos previo a la hidrólisis, luego se agregó la solución de enzima previamente filtrada por 0,22 μm.

#### 9.1.3.1.1. Caracterización analítica de los productos de hidrólisis obtenidos

Las muestras obtenidas se analizaron mediante cromatografía en capa fina (TLC) y cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

*Condiciones de TLC:*

La TLC (Silicagel 60 F<sub>254</sub>, Merck®), Fase móvil utilizada fue cloroformo : ácido acético : agua (3:6:1).

Revelador: Orcinol 20 mM en etanol/ácido sulfúrico 95:5.

*Condiciones de HPLC:*

Equipo Shimadzu LC – 20AT, detector de índice de refracción (Shimadzu RID – 10AT). La columna utilizada fue Supelcogel C610H (30 cm x 7.8 mm) con pre-columna Supelguard C610H (5 cm x 4.6 mm). Fase móvil, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,005 N, flujo de 0,5 ml/min. Los análisis se llevaron a cabo a 55°C. Se realizaron curvas de calibración de xilosa (X1), xilobiosa (X2), xilotriosa (X3) (Megazyme).

*Cálculo de rendimiento de hidrólisis*

$$\text{Rendimiento de hidrólisis (\%)} = \left( \frac{(\text{xilosa total liberada} * 0,88)}{\text{xilano inicial en el material}} \right) * 100$$

#### 9.1.3.2. Cribado de microorganismos para la producción de xilitol

Se realizó un cribado de una selección de microorganismos pertenecientes a la colección del Laboratorio de Biocatálisis y Biotransformaciones para la producción de xilitol a partir de xilosa comercial.

Se ensayaron 49 microorganismos, 26 bacterias, 12 levaduras, 11 hongos filamentosos.

*Levaduras*

Se realizaron cultivos en placas de Petri con medio PDA de las levaduras seleccionadas. Luego de ver colonias aisladas, se tomó una para realizar el inóculo en el pre-cultivo de medio YPX (extracto levadura 1%, peptona 2%, xilosa 3%) en agua. En un matraz de 100 ml con 40 ml de medio se incubaron a 150 rpm, 28 °C durante 24 horas.

Luego de las 24 horas de pre-inóculo, se centrifugaron las células a 4000 rpm durante 5 minutos a 10 °C, se lavaron dos veces con buffer fosfato 0.1M pH 6.5. El total de células se utilizó para inocular matraces de 100 ml con 40 ml de medio YPX en el mismo buffer.

Se tomaron muestras a las 24, 48, 72, 144 y 192 horas.

#### *Bacterias*

Se realizaron cultivos en placas de Petri con medio TSA de las bacterias seleccionadas. Luego de ver colonias aisladas, se tomó una para realizar el inóculo del pre-cultivo en tubo (5 ml) de medio M9+xilosa (xilosa 1%) en agua. Se crecieron a 150 rpm, 28 °C durante 48 horas.

Luego de las 48 horas de crecimiento se inocularon 100 µl en matraces de 25 ml con 5 ml de medio M9 + xilosa 3%.

Se tomaron muestras a las 48 y 120 horas.

#### *Hongos filamentosos*

Se realizaron cultivos en placas de Petri con medio PDA de los hongos seleccionados. Luego de ver crecimiento, se tomó con un sacabocado de un 1 cm de diámetro tres tarugos que se utilizaron para inocular el medio YPX (extracto levadura 1%, peptona 2%, xilosa 3%) en agua. En matraz de 100 ml con 20 ml de medio. Se crecieron a 150 rpm, 28 °C durante 6 días.

Se tomaron muestras a las 48 y 144 horas.

Se analizaron todas las muestras por HPLC utilizando la columna y las condiciones anteriormente mencionadas (9.1.3.1.1). Se realizaron curvas de xilosa y xilitol para cuantificar consumo y producción (Anexo 12.3.2).

### 9.1.3.3. Producción de xilitol con *Wickerhamomyces anomalus* Z1

#### *Inóculo de W. anomalus* Z1

Se creció la cepa de levadura en medio sólido PDA, durante 48 horas, se realizó un pre-cultivo pasando una colonia aislada a un matraz Erlenmeyer de 50 ml con 20 ml de medio YPX (extracto de levadura 1, peptona 2, xilosa comercial 3 %) en agua y se incubó a 28 °C, 150 rpm por 24 horas. El cultivo obtenido se repartió en volúmenes de 1 ml en eppendorffs, se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos a 10 °C, se descartó el sobrenadante de cada tubo y las células se enjuagaron con 1 ml de suero fisiológico. Se repitió esta operación y se descartó el sobrenadante. La biomasa húmeda de cada eppendorff (0.05 g) se utilizó como inóculo de cada fermentación.

#### *Fermentación*

##### 1) *Medio sintético*



Se realizó la fermentación en medio sintético YPX (extracto de levadura 1 % p/v, peptona 2 % p/v) y dos concentraciones de xilosa comercial, 4 y 9 mg/ml en los medios sintéticos 1 y 2 respectivamente con un volumen final de 1 ml en viales de 4 ml.

Se inoculó cada uno de estos viales con la biomasa húmeda de un tubo eppendorff. Se taparon con algodón y papel. Se incubaron a 28 °C y 150 rpm. Se tomaron muestras a tiempo 0 y 72 horas.

## 2) Hidrolizado enzimático de corteza

Al hidrolizado de corteza obtenido según el punto 9.1.3.1 se lo separó del material sólido. El líquido se concentró mediante evaporación a vacío hasta un volumen de 1 ml y una concentración de xilosa final de 6.8 mg/ml medida por HPLC. Se agregó extracto de levadura 1 % p/v y peptona 2 % p/v. Se inoculó este medio con la biomasa húmeda de un tubo eppendorff en un vial de 4 ml. Se tapó con algodón y papel. Se incubó a 28 °C y 150 rpm. Se tomaron muestras a tiempo 0 y 72 horas.

### Análisis de productos por HPLC

Se llevó a cabo en las condiciones descritas anteriormente en el apartado (9.1.3.1.1).

### Cálculo de parámetros de la fermentación

#### Rendimiento de xilitol

Se calculó el rendimiento de xilitol producido por xilosa utilizada al finalizar la fermentación (Latif y Rajoka, 2001).

$$\text{Rendimiento } (Y_p) \left( \frac{\text{mg xilitol}}{\text{mg xilosa}} \right) = \left( \frac{\text{mg de xilitol}}{\text{ml}} \right) / \left( \frac{\text{mg xilosa consumida}}{\text{ml}} \right)$$

#### Productividad volumétrica

$$Q_p = \frac{\text{mg xilitol}}{\text{ml} * \text{hora}}$$

## 9.1.4. Producción de etanol

### 9.1.4.1. Sacarificación y fermentación a partir de corteza deslignificada hidrolizada xilanasas

Se realizó un sistema de sacarificación simultánea a fermentación (SSF):

- 100 mg de cada corteza deslignificada e hidrolizada con las xilanasas de *Pseudozyma* sp. EBV 97-87 y *Bacillus* sp. EBV 12-22 en viales de 20 ml con tapón de goma y precinto se le agregó celulasa comercial de *Trichoderma reesei* ATCC

26921 (Sigma-Aldrich) en una concentración de 50 FPU/g de sustrato en un volumen final de 5 ml.

- Luego de dos horas de sacarificación a 50 °C se inoculó la levadura *Saccharomyces cerevisiae* con una concentración inicial de 0,1 g / ml de peso húmedo (1 ml de inóculo) y se incubó a 30 °C y 150 rpm. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* fue adquirida comercialmente en la forma de levadura seca para panificación. La misma fue cultivada en placas de Petri con PDA a 28 °C para obtener colonias aisladas. Una vez crecida en el laboratorio se tomó una colonia y se inoculó en un matraz Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de medio PDB y se incubó a 28 °C y 24 horas. El cultivo se centrifugó y la biomasa húmeda se utilizó para inocular la fermentación.

Se tomaron alícuotas de muestra a distintos tiempos. Las muestras se analizaron por HPLC, utilizando el mismo método descrito para el experimento anterior. Se realizó una curva de calibración de etanol, glucosa y celobiosa para su cuantificación (Anexo 12.3.2).

## 9.2. Resultados y discusión

### 9.2.1. Deslignificación química de la corteza de *Eucalyptus dunnii*

Se realizó previamente el paso de deslignificación de la corteza de *E. dunnii* ya que la estructura que forman los polímeros de lignina y carbohidratos la vuelven recalcitrante a la desconstrucción, por lo que su presencia en el material vegetal no permitiría observar cambios al utilizar las enzimas obtenidas (Mupondwa *et al.*, 2017). El material resultante es la corteza deslignificada y se obtienen 8 gramos de la misma partiendo de 10 gramos de corteza libre de extractivos. En la Tabla 11 se muestra la composición química de la corteza inicial y de la resultante luego de la etapa de deslignificación.

Tabla 11 - Composición de los polímeros de la corteza de *E. dunnii* sin tratar y tratada con ácido peracético.

%	Corteza libre de extractivos	Corteza deslignificada
<i>glucanos</i>	44	65,1
<i>xilanos</i>	13	16,2
<i>lignina insoluble</i>	17	5,1
<i>lignina soluble</i>	2.8	0

Como se puede ver principalmente aumentan los porcentajes de glucanos y xilanos por la degradación de la lignina. Este material fue el utilizado para la hidrólisis con las xilanasas.

El ácido peracético ha sido reconocido durante mucho tiempo como un reactivo eficaz para la eliminación de la lignina, aislando las fibras vegetales para su uso en algunas técnicas en el proceso de la pulpa y el papel (Brasileiro, Colodette y Piló-Veloso, 2001). Según los diferentes autores que estudiaron el proceso de deslignificación mediante este método indican que si el tiempo es suficiente, se puede perder además de la lignina una fracción de las hemicelulosas presentes en el material, por lo tanto para minimizar ese efecto, se trabajó en tiempos de deslignificación de media hora. Una vez finalizado el proceso se observó que el material quedó más blanco que el inicial.

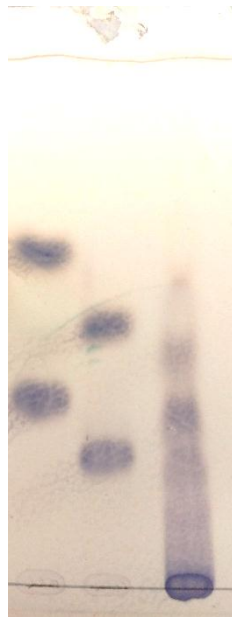
### 9.2.2. Hidrólisis de la corteza pre-tratada utilizando xilanasas obtenidas de los microorganismos seleccionados.

#### Ensayo inicial:

Se estudió el efecto del uso de las enzimas concentradas de *Pseudozyma* sp EBV 98-87 y *Bacillus* sp. EBV 12-22 sobre corteza de *E. dunnii* deslignificada.

*Bacillus* sp. EBV 12-22.

A los sobrenadantes de la hidrólisis de la corteza deslignificada con el extracto enzimático de *Bacillus* sp. a las 72 horas de reacción, se les realiza una TLC y los resultados se muestran en la Figura 61.



X1 X2 72hs  
X3 X4

Figura 61 - TLC del sobrenadante de la hidrólisis de la corteza deslignificada con el crudo enzimático parcialmente purificado de *Bacillus* sp. EBV 12-22 a las 72 horas de reacción.

Del análisis de los productos de hidrólisis obtenidos con las enzimas de *Bacillus* sp. EBV 12-22 en la TLC, se observan manchas de Rf similares a los de X2 y X1. Por HPLC se comprueba que son esos productos y se cuantifican. Además se distingue una mancha con similar Rf que la X3 y otra similar a X4. La identificación de estos compuestos no pudo ser corroborada por HPLC debido a que en la columna utilizada, estos productos no son resueltos.

Por otro lado, al medir la cantidad de azúcares reductores por el método del DNS se pudo determinar el total de azúcares reductores liberados y expresados como equivalentes de xilosa. En la Figura 62 se observa la cantidad de azúcares reductores liberados luego de las 72 horas de reacción y en la Tabla 12, los porcentajes de xilano en la corteza antes y luego de la hidrólisis con la xilanasa de *Bacillus* sp. EBV 12-22, el mismo disminuye un 54 %.

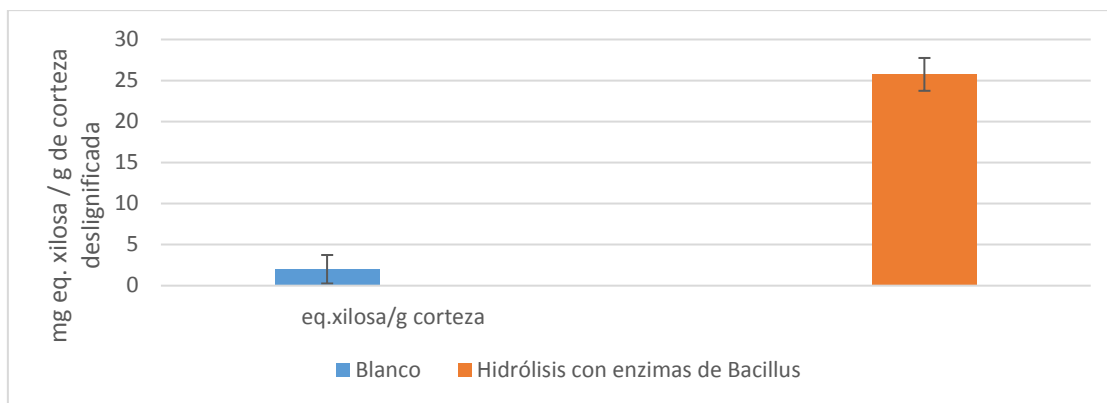


Figura 62 - Cuantificación de azúcares reductores de los sobrenadantes de la hidrólisis de la corteza con las enzimas de *Bacillus* sp. EBV 12-22 a las 72 horas de reacción.

Tabla 12- Porcentaje de xilanos de la corteza deslignificada y tratada con las xilanasas de *Bacillus* sp. EBV 12-22 a las 72 horas de reacción

% xilano en corteza deslignificada	% xilano en corteza deslignificada tratada con xilanasas de <i>Bacillus</i> sp. EBV 12-22
16.2	7.4

Del total de estos equivalentes (Figura 62), el 4 % corresponde a xilosa y el 9,3 % a X2 (los cuales se cuantificaron mediante HPLC y en el caso de X2 se relacionaron los gramos de equivalentes de xilosa / gramos de xilobiosa).

Los mismos productos excepto la xilosa se observaron en la hidrólisis del xilano de haya comercial, resumidos en el capítulo 8. La presencia de xilosa puede ser debida a la diferencia de tiempo en que se tomaron las muestras de las distintas hidrólisis (en el xilano comercial el tiempo fue de 15 minutos y en este ensayo fue de 72 horas). En los estudios realizados sobre diferentes xilanos o material lignocelulósico con xilanasas de *Bacillus* se han reportado los mismos productos mayoritarios. Se obtuvieron XOS de diferentes residuos agrícolas pre-tratados con álcalis mediante la acción del extracto con actividad xilanasas de *Bacillus amyloliquifaciens* NRRL B-14393 con un rendimiento entre 54,4% para el bagazo de la planta “jacinto de agua” y 85,5% para el salvado de trigo. Estos resultados indican que el mayor rendimiento de conversión enzimática se correlaciona con la menor complejidad estructural del sustrato como es el salvado de trigo (Rashad *et al.*, 2016). También se reporta la producción de XOS mediante la fermentación de diferentes sustratos lignocelulósicos mediante una cepa de *Bacillus subtilis* KCX006. Entre los diferentes sustratos utilizados, el salvado de trigo con el agregado del prensado que queda luego de la producción de aceite de nuez, fueron los que mostraron la mayor cantidad de XOS (24.92 mg/g sustrato) y los principales productos fueron X2, X3 y X4 (Reddy y Krishnan, 2016). Estos resultados, obtenidos con las células enteras son

similares en cantidad de azúcares reductores y tipos de XOS obtenidos en el ensayo realizado con las enzimas de *Bacillus* sp. EBV 12-22.

*Pseudozyma* sp. EBV 97-87

En la Figura 63 se muestra el análisis por la TLC de las hidrólisis realizada sobre 100 mg de corteza deslignificada y 50 U/ml de xilanasa de *Pseudozyma* sp. EBV 97-87 y en la Figura 64 se muestran los azúcares reductores obtenidos luego de las 72 horas de reacción. En la Tabla 13 se muestran los porcentajes de xilano antes y después de la hidrólisis con la xilanasa.

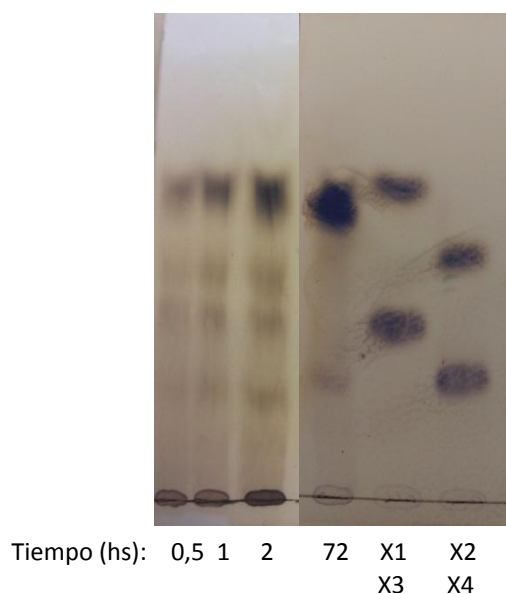


Figura 63 - TLC de los productos de hidrólisis de la corteza deslignificada con enzimas de *Pseudozyma* sp. EBV98-87 a distintos tiempos.

El perfil de la hidrólisis en los distintos tiempos de reacción es similar a los productos obtenidos en la hidrólisis del xilano comercial (Capítulo 8), al observarse que a las primeras horas de reacción se liberan pequeñas cantidades de xilosa junto a otros XOS de mayor tamaño pero con el transcurso de la reacción, el producto mayoritario termina siendo xilosa.

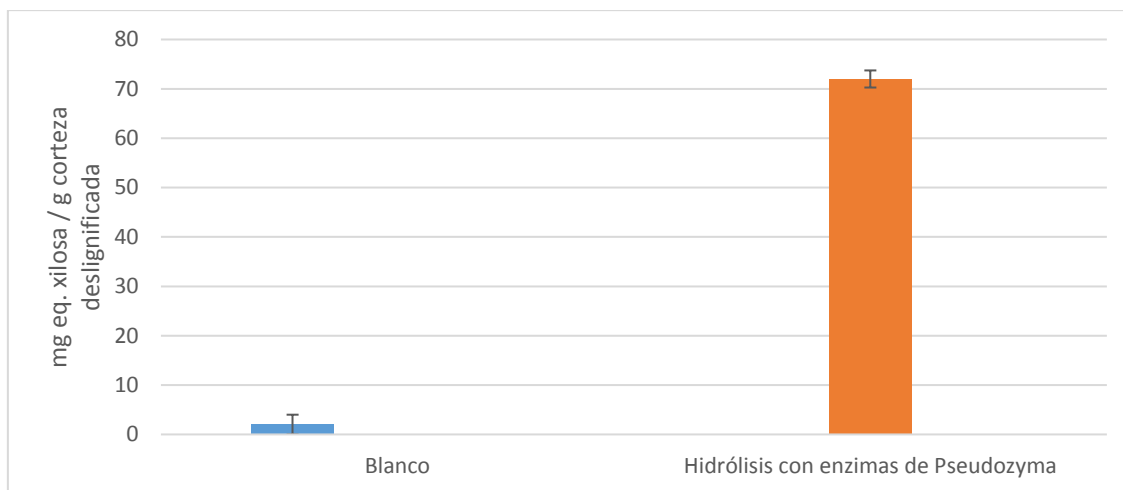


Figura 64 - Cuantificación de azúcares reductores de los sobrenadantes de la hidrólisis de la corteza con las enzimas de *Pseudozyma* sp. EBV 97-87.

Tabla 13 - Porcentaje de xilanos de la corteza deslignificada y tratada con las xilanasas de *Pseudozyma* sp. EBV 97-87 a las 72 horas de reacción

% xilano en corteza deslignificada	% xilano en corteza deslignificada tratada con xilanasas de <i>Pseudozyma</i> sp. EBV 97-87
16.2	5.2

Al relacionar la medida del total de los equivalentes de xilosa obtenidos por el método de DNS, con la cuantificación de xilosa por HPLC, se obtuvo que el 90 % corresponde efectivamente a xilosa. El 10 % restante pueden ser productos que se observan como manchas de menor Rf en la TLC de la Figura 63. La conversión de los xilanos en la corteza fue de un 68 % al comparar los porcentajes de xilano antes y después de la hidrólisis.

Se cuantificó además la cantidad de xilosa producida en el tiempo por HPLC, los resultados se muestran en la Figura 65.

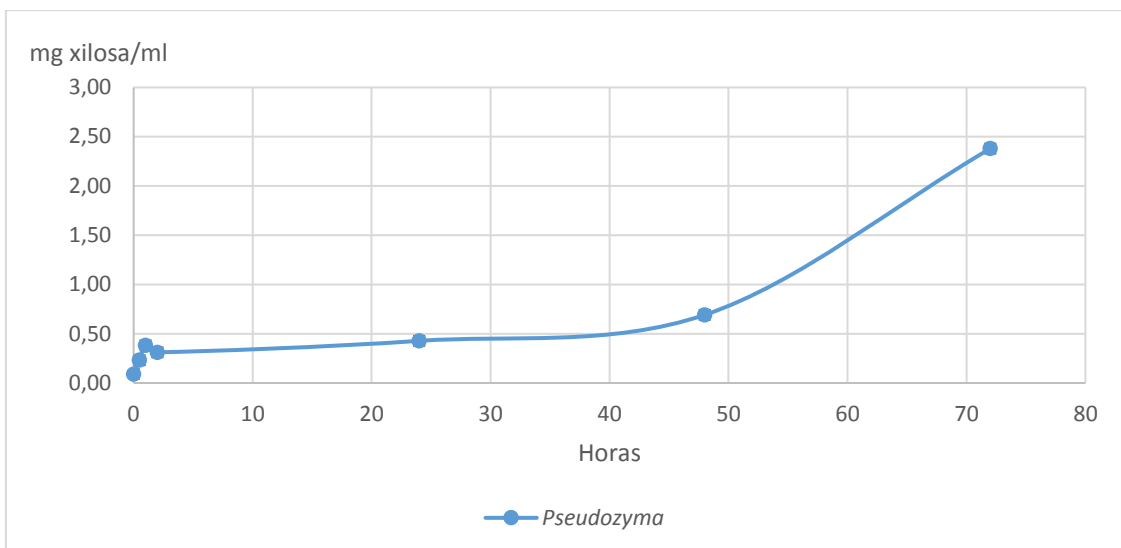


Figura 65 - Primer hidrólisis de corteza deslignificada con xilanasa de *Pseudozyma* sp. EBV 97-87

En este ensayo se evaluó la hidrólisis de la corteza deslignificada a un tiempo final de 72 horas. En el periodo ensayado no se observó un máximo de xilosa, por lo que se decidió realizar el mismo ensayo evaluando la reacción a distintos tiempos hasta las 144 horas para poder estudiar si la concentración de xilosa aumentaba. Los resultados se muestran en la Figura 66.

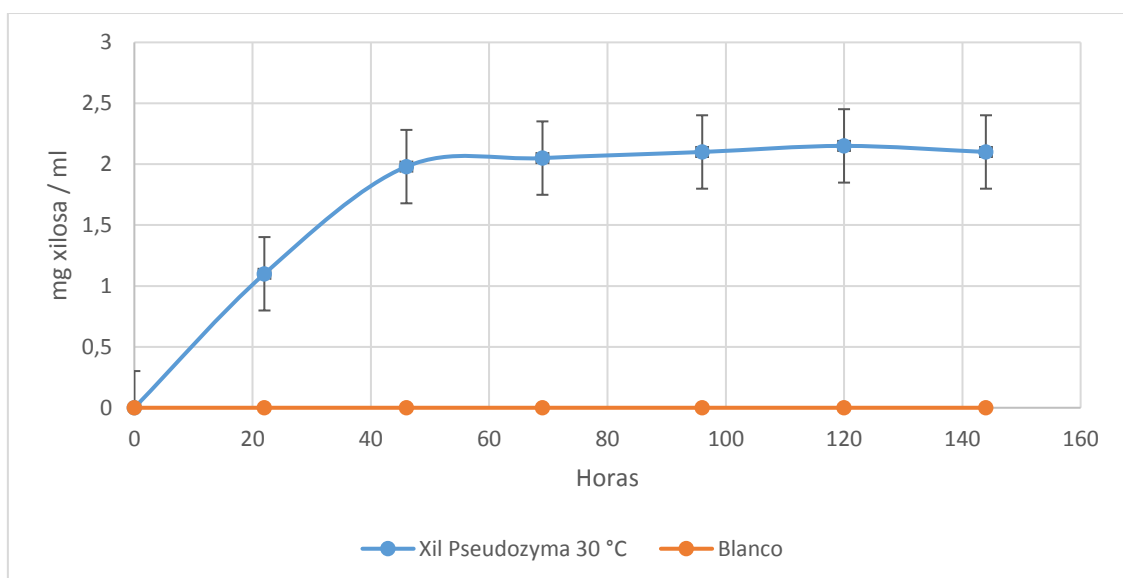


Figura 66 - Hidrólisis de la corteza de *E. dunnii* deslignificada con enzimas de *Pseudozyma* sp. EBV 97-87 a 30 °C.

En este experimento, se destaca la producción de xilosa a una velocidad mayor durante las 69 horas de reacción llegando a una concentración de 1.98 mg/ml, para luego crecer más lentamente y llegar a 2.15 mg/ml entre las 96 y 144 horas.

Por otra parte, se estudió la hidrólisis a mayor temperatura (50 °C) para evaluar si se obtenía un aumento en la producción de xilosa dado que es la temperatura óptima de la



enzima (ver capítulo 8), pero se estudió solo hasta las 24 horas ya que la enzima es inestable a esa temperatura.

Si bien a 50 °C la actividad es óptima, no se logra obtener una mayor concentración de xilosa en las primeras 24 horas de reacción (0.76 mg/ml). En el blanco no se liberó xilosa.

### 9.2.2.1. Análisis de la corteza resultante

La superficie del sólido resultante de los primeros ensayos de hidrólisis con las enzimas de *Bacillus* sp. EBV 12-22 y *Pseudozyma* sp. EBV 97-87 se analizaron mediante microscopía electrónica de barrido. En la Figura 67 se muestran las imágenes obtenidas de las diferentes cortezas hidrolizadas comparadas con la corteza deslignificada sin tratar con enzimas.

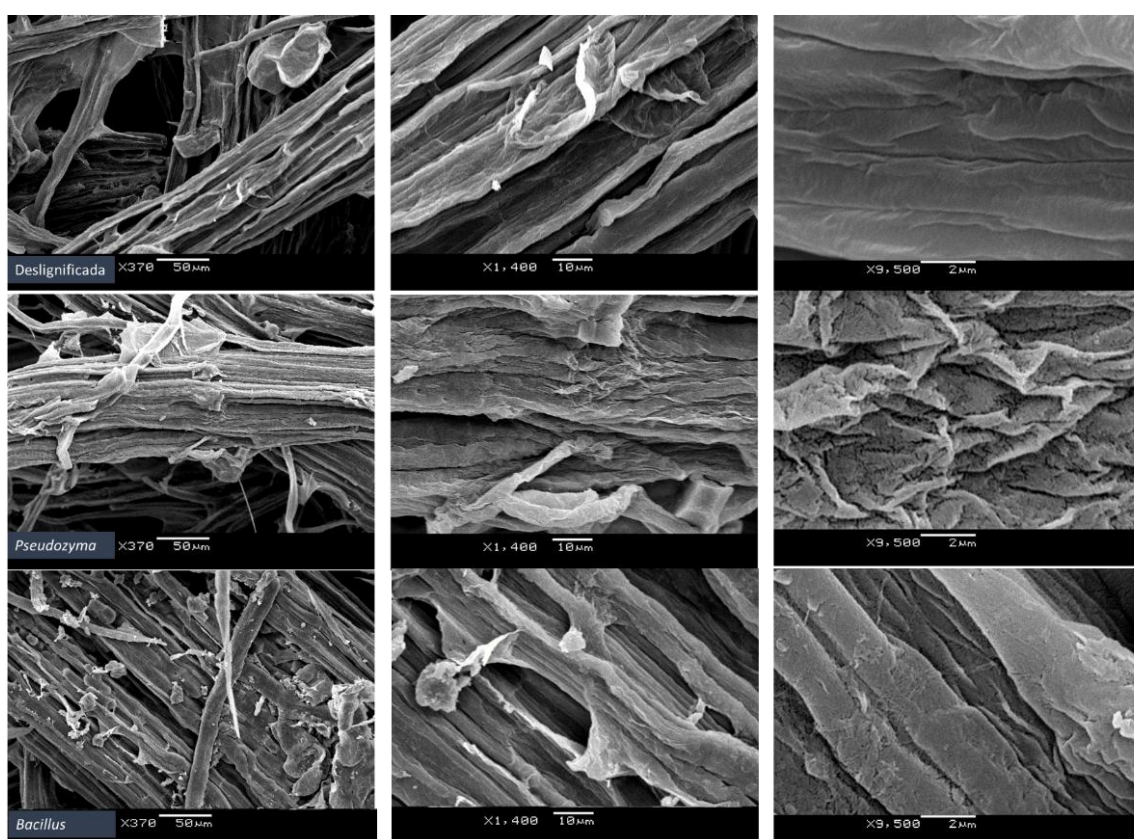


Figura 67 - Microscopía electrónica de barrido de las cortezas deslignificadas. Fila 1 – Sin tratar con enzimas. Fila 2 – tratada con xilanasa de *Pseudozyma* sp. EBV 97-87. Fila 3 – tratada con xilanasa de *Bacillus* sp. EBV 12-22. Se muestran los mismos aumentos para todos los casos para poder comparar los cambios en la superficie. Aumentos de izquierda a derecha, x370, x1400 y x9500.

La estructura y la degradación de las paredes celulares de las plantas se pueden evaluar por métodos químicos, pero tales métodos miden sólo los contenidos de los componentes de la pared celular. Los métodos físicos, como el microscopio electrónico, proporcionan información sobre la distribución de dichos componentes tanto dentro como entre las paredes celulares. Es posible comprender las diferencias en la digestibilidad por la presencia o no de lignina y el ataque selectivo por microorganismos

sobre los variados materiales lignocelulósicos al visualizar mediante microscopía electrónica los materiales antes y después del ataque (Grenet, 1989).

Los estudios de microscopía electrónica de barrido muestran que la acción de xilanasas provocó cambios en la superficie del material. En la corteza sin tratar con enzimas, las fibras se observan uniformes y con una superficie lisa. Por otro lado, las fibras en las cortezas tratadas con enzimas se observa que la superficie está áspera, heterogénea y estriada, lo que indica que se dio un proceso de pelado (“peeling”) de la superficie con la aparición de grietas. Este cambio se ve más acentuado en el caso de la corteza tratada con enzimas de *Pseudozyma* sp. EBV 97-87.

Este agrietado de la superficie, le da un aspecto estriado (se observa mejor en el aumento x 9.500) y las fibras quedan menos uniformes, como si se separaran entre ellas (se observa mejor en el aumento x 1.400). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por diferentes autores que han apoyado sus experimentos de degradación de materiales lignocelulósicos con imágenes tomadas por un microscopio electrónico de barrido, se encontró que varios de estos estudios son sobre diferentes materiales obtenidos del *Eucalyptus*. En el estudio llevado a cabo por Xiong y colaboradores sobre la degradación de corteza de *Eucalyptus* tras la inoculación con una cepa de *Trichoderma reesei*, indican que a diferencia de la muestra control, aquellas que fueron inoculadas con el hongo mostraron una pronunciada degradación de las células, con la formación de cavidades y fracturas en la superficie. También observaron las hifas del hongo creciendo a través de las capas de la corteza, y midieron altas concentraciones de actividad xilanasas y celulasas, por lo que estos autores demuestran que el hongo puede desintegrar la intrincada red lignocelulósica y utilizar la celulosa y hemicelulosa para su crecimiento y metabolismo (Xiong *et al.*, 2016). Este efecto se observó también en el bagazo de caña de azúcar tratado con una xilanasas purificada del hongo zigomiceto *Lichtheimia ramosa* (Alvarez-Zúñiga *et al.*, 2017).

Otros autores han evaluado la hidrólisis con xilanasas de pulpas de celulosa Kraft de *Eucalyptus* parcialmente deslignificadas y observaron por microscopía electrónica de barrido que se desprenden fibras y se abren grietas de la pared celular y encontraron que estas modificaciones facilitaron el acceso en las sucesivas etapas de blanqueo de los productos químicos, disminuyendo el uso de los mismos y mejorando las propiedades de la fibra obtenida (Torres *et al.*, 2000; Roncero *et al.*, 2005; Manisha y Yadav, 2017; Sridevi, Ramanjaneyulu y Suvarnalatha Devi, 2017).

En nuestros ensayos, los cambios fueron más evidentes en la corteza tratada con xilanasas de *Pseudozyma* sp. EBV 97-87 que con las xilanasas de *Bacillus* sp. EBV 12-22. Estos resultados pueden relacionarse a que el porcentaje de conversión de xilano fue mayor en

el caso de la xilanasas de *Pseudozyma* sp. EBV 97-87 que en la corteza tratada con la enzima de *Bacillus* sp. EBV 12-22 (Apartado 9.2.2 de este capítulo).

### 9.2.3. Producción de xilitol

#### 9.2.3.1. Estudio de distintas variables en la producción de xilosa por *Pseudozyma* sp. EBV 97-87:

Posteriormente, se llevó a cabo el estudio de la hidrólisis con diferentes cantidades de corteza y unidades de enzima, se analizó la producción de xilosa a diferentes tiempos. Los resultados de máxima producción se muestran en la Tabla 14 comparados con el ensayo inicial realizado.

Tabla 14 - Hidrólisis de corteza deslignificada con enzimas de *Pseudozyma* sp. EBV 97-87. Se muestra la concentración final de xilosa, el tiempo en la que se obtuvo la mayor concentración y el porcentaje final de conversión de xilano (aquellos con estimación del error son promedios de dos repeticiones).

Cantidad de corteza (mg)	Unidades de enzima (U/ml)	Concentración de xilosa final (mg/ml)	Hora de máxima concentración de xilosa (Hs)	Rendimiento hidrólisis (%)
100	50	2,1 ± 0,3	72	50
400	100	5,1	96	35
500	200	5,8 ± 0,2	56	32

En el primer ensayo de hidrólisis se obtuvo un rendimiento de hidrólisis del 50 % del xilano de la corteza deslignificada luego de 72 horas de hidrólisis, obteniendo como producto mayoritario xilosa (90 %). Este resultado es de gran interés ya que la xilosa se podría utilizar para obtener xilitol por fermentación en un bioproceso integrado.

Para mejorar las cantidades de xilosa obtenidas, con la finalidad de obtener la concentración de xilosa necesaria para llevar a cabo el proceso de fermentación a xilitol, se realizaron distintos ensayos en los que se variaron la cantidad de corteza y las unidades de enzima utilizada. En el ensayo con 400 mg de corteza y 100 U/ml de enzima, la cantidad de xilosa obtenida aumentó 2.4 veces. Cuando se pasó de 400 a 500 mg de corteza deslignificada y aumentar el doble las unidades de enzima, disminuyó el tiempo en llegar a la concentración máxima a 56 horas, sin embargo el incremento de la concentración de xilosa no fue muy marcado (se pasó de 5.1 a 5.8 mg/ml de xilosa) y los rendimientos de hidrólisis (xilosa a partir del xilano en la reacción) disminuyeron.

En literatura no se ha encontrado información sobre la producción de xilosa o XOS a partir de sustratos lignocelulósicos utilizando xilanasas producidas por el género *Pseudozyma*. Los resultados obtenidos en la presente tesis corresponderían al primer reporte de la degradación del xilano de maderas duras por enzimas expresadas en *Pseudozyma* sp. EBV 97-87.

Se ha encontrado un reporte en donde se evaluó el efecto de agregado de enzimas xilanasas en la producción de xilosa a partir de marlo de maíz. En este caso encontraron que, al igual que lo observado en esta tesis, la concentración de xilosa aumentó con el incremento de la dosificación de 5 a 30 U de enzima de *Aspergillus terreus* / g de mazorca de maíz pero un aumento adicional de enzima no pudo mejorar la hidrólisis de la mazorca de maíz (Li *et al.*, 2015).

También se reporta un trabajo en el que se ha probado incrementar la concentración de sustrato, en este caso analizaron la hidrólisis con xilanasas comerciales (Accelerase XY crudo enzimático de *Trichoderma reesei*) de los restos de los frutos de la palma, y observaron que a bajas concentraciones de sustrato (entre 0.5 y 5 %), un pequeño aumento en la concentración del mismo da como resultado un aumento del rendimiento (el mayor rendimiento fue de 51.9 % en una concentración de 5 %. Pero una alta concentración de sustrato disminuye el rendimiento de hidrólisis (entre 7 y 15 %). Estos autores atribuyen este efecto a problemas de transferencia de masa entre la enzima y el sustrato (Mardawati *et al.*, 2014). Similar al efecto observado al utilizar las enzimas de *Pseudozyma* sp. EBV 97-87 al aumentar la concentración de la corteza de *Eucalyptus dunnii*.

Por otro lado, en estos ensayos se pudo determinar mediante HPLC la presencia de ácido acético (ver anexo 12.8.2). La aparición de este compuesto en los productos de hidrólisis indica la presencia de actividad acetilxilano estearasa en los extractos parcialmente purificados de *Pseudozyma* sp. EBV 97-87. Esta enzima forma parte del grupo de enzimas auxiliares en la degradación del xilano (Biely *et al.*, 2013), ya que los residuos de acetato vuelven más recalcitrante a la estructura de xilano, e interfieren con la acción de las endoxilanasas (Ali El Enshasy *et al.*, 2016) es de gran importancia su presencia en el crudo enzimático.

La conclusión que se desprende de estos reportes y de los estudios realizados en esta tesis, es la importancia del conocimiento de la composición material que se va a utilizar para la hidrólisis y el comportamiento del extracto enzimático, es información clave para desarrollar el proceso de pre-tratamiento e hidrólisis.

#### 9.2.4. Cribado de microorganismos para la producción de xilitol

Se realizó un cribado de los microorganismos de la colección del laboratorio de Biocatálisis y Biotransformaciones para evaluar su capacidad de producir xilitol a partir de xilosa comercial. Los resultados se presentan a continuación en las Figuras 64, 65 y 66.

## Levaduras

Como se observa en la Figura 68 de las 12 levaduras ensayadas, dos no mostraron producción de xilitol (*Rhodotorula glutinis* H93 y *Pseudozyma* sp. EBV 97-87) mientras que la levadura *Wickerhamomyces anomalus* Z1 fue la que produjo mayor cantidad del poliol a las 72 horas de incubación.

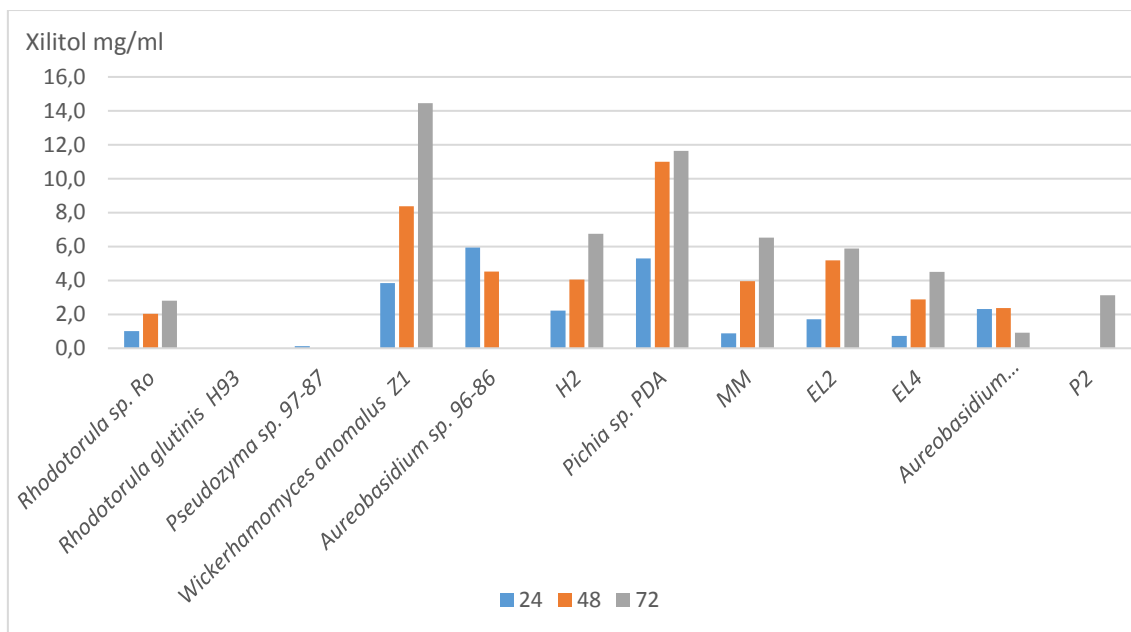


Figura 68 - Producción de xilitol mediante la fermentación de D-xilosa en levaduras de la colección del LBB.

## Bacterias

En el caso de las bacterias, se ensayaron 26 cepas. Sólo se observan cantidades apreciables de xilitol en *Pantoea* sp. PRII45C13, *Enterobacter agglomerans* PRII45C8 y *Citrobacter* sp. La concentración de xilitol encontrada en estas cepas fue mayor a las 48 horas (Figura 69).

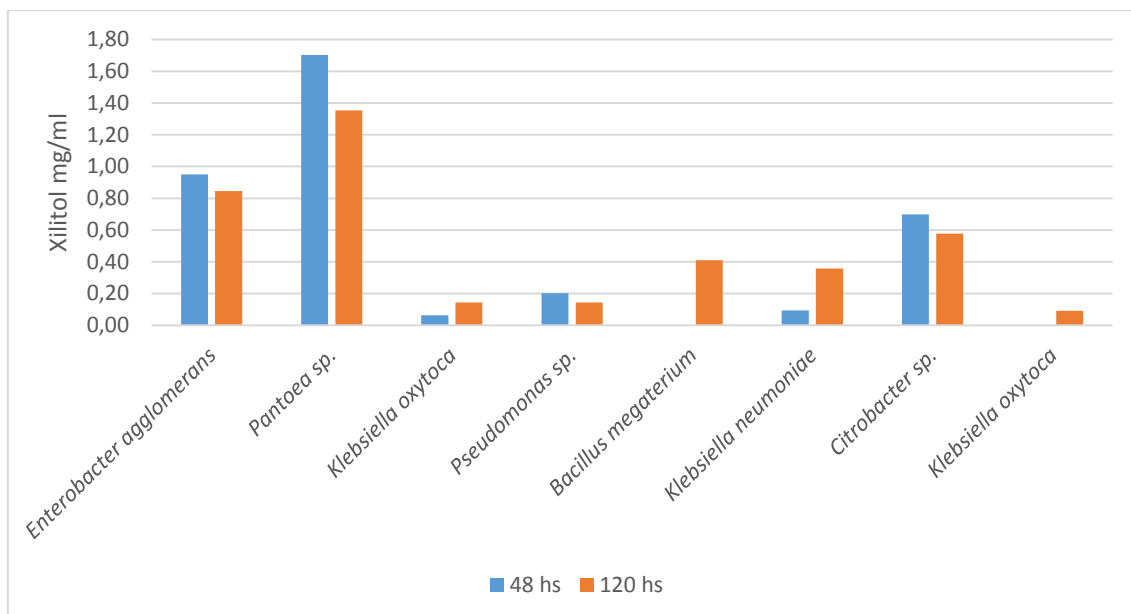


Figura 69 - Producción de xilitol mediante la fermentación de D-xilosa en bacterias de la colección del LBB.

### Hongos filamentosos

Se analizaron 11 hongos filamentosos, de ellos los que mostraron producción de xilitol fueron *Aspergillus* sp. Y6, y *Penicillium* sp. VA8 (Figura 70).

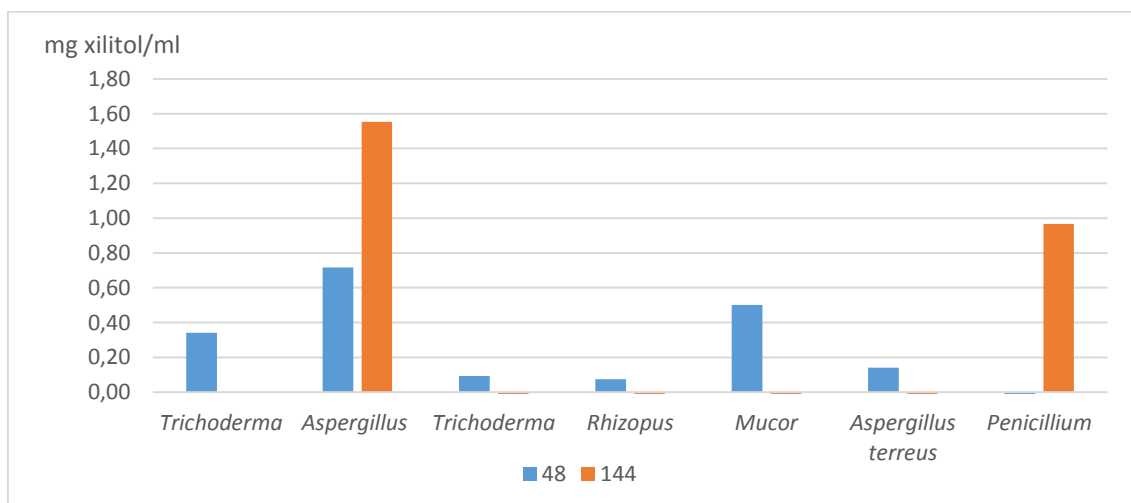


Figura 70 - Producción de xilitol mediante la fermentación de D-xilosa en hongos filamentosos de la colección del LBB.

Las levaduras fueron las mejores productoras de xilitol entre todos los microorganismos analizados. Las levaduras son los microorganismos que hasta el momento están considerados como los mejores productores de xilitol en comparación con bacterias y hongos filamentosos. Existe una amplia literatura referida a la producción de xilitol mediante levaduras tanto salvajes como genéticamente modificadas (Latif y Rajoka, 2001; Ali *et al.*, 2017; Ghaffar *et al.*, 2017; López-Linares *et al.*, 2018). Siendo el género *Candida* el más reportado (Wang *et al.*, 2013; Mattam *et al.*, 2016; Santana *et al.*, 2018).

Con los resultados obtenidos se decidió, continuar trabajando con la cepa *Wickerhamomyces anomalus* Z1 para la producción de xilitol a partir del hidrolizado de la corteza. Los resultados de esta levadura son prometedores ya que *W. anomalus* ha sido aislada de muchos hábitats diferentes y muestra una notable robustez fisiológica frente a las tensiones ambientales, como el pH extremo o la baja actividad del agua (Passoth, Olstorpe y Schnürer, 2011), lo que la hace una candidata interesante para su crecimiento en hidrolizados de residuos lignocelulósicos, los cuales presentan compuestos inhibitorios. Por otro lado, se ha reportado producción de xilitol por este género a partir de hidrolizados de cáscara de arroz, y encontraron que a escala matraz dio un rendimiento de xilitol / xilosa (g/g) de 0.38. En el caso de *W. anomalus* Z1 el rendimiento en el medio sintético fue de 0.61. En otro estudio de producción de xilitol por levaduras aisladas, una cepa de *Wickerhamomyces anomalus*, produjo una concentración de 4.28 g/l de xilitol luego de 72 horas de fermentación, a partir de un medio con la misma concentración inicial de xilosa que la realizada durante esta actividad, valor notoriamente menor al obtenido por la cepa *Wickerhamomyces anomalus* Z1 (Guamán-Burneo *et al.*, 2015). Otros aislamientos de *Wickerhamomyces* mostraron una baja producción de xilitol a partir de medios sintéticos, como el caso de la cepa *W. piperi*, se obtuvieron 0.98 g/l de xilitol a partir de una concentración inicial de xilosa de 20 g/l (Morais *et al.*, 2013). Por lo discutido anteriormente, la cepa *W. anomalus* Z1, mostró una prometedora producción de xilitol en las condiciones ensayadas, considerando su alta concentración de xilitol y rendimiento.

#### 9.2.4.1. Producción de xilitol a partir del hidrolizado de corteza

Se planteó realizar el estudio de la producción de xilitol mediante la fermentación de la xilosa obtenida del hidrolizado de la corteza deslignificada de *E. dunnii* por medio de las xilanasas de *Pseudozyma* sp. EBV 97-87. Para ello se seleccionó la levadura endófito *Wickerhamomyces anomalus* Z1. Una vez seleccionada la levadura a utilizar se evaluó la fermentación utilizando dos concentraciones de xilosa comercial (medios sintéticos) y se evaluó además la fermentación de la xilosa obtenida en la hidrólisis enzimática de la corteza de *E. dunnii*. Se utilizó la última condición ensayada para la hidrólisis de la corteza deslignificada con xilanasas de *Pseudozyma* sp. EBV 97-87, (500 mg de corteza y 200 U/ml de crudo parcialmente purificado) y se concentró el sobrenadante llegando a un valor de 6.8 mg/ml de xilosa. Se logró llegar a una concentración de xilosa intermedia entre la realizada para los dos medios de cultivo sintéticos para utilizar como fuente de carbono en la fermentación mediante *W. anomalus* Z1. Los resultados junto con los parámetros medidos para la fermentación se presentan en la Tabla 15.

Tabla 15 - Fermentación de xilosa del hidrolizado enzimático de corteza de *E. dunnii* y medios sintéticos. Concentración de xilosa inicial, xilitol y rendimiento (xilitol/xilosa) y productividad volumétrica.

	Hidrolizado de <i>E. dunnii</i>	Medio sintético 1	Medio sintético 2
CONCENTRACIÓN INICIAL DE XILOSA (mg/ml)	6.8	4.0	9.0
CONCENTRACIÓN DE XILITOL (mg/ml)	0.99	0.76	4.6
CONCENTRACIÓN FINAL DE XILOSA (mg/ml)	0.6	0.0	0.0
Productividad ( $Q_p$ ) (mg/ml*h-1)	0.014	0.011	0.064
rendimiento ( $Y_p$ ) (mg xilitol / mg xilosa consumida)	0.16	0.19	0.51

Del análisis de estos estudios se desprende que en todos los casos se obtuvo xilitol como producto, en el caso de los medios sintéticos a las 72 horas ya se había consumido toda la xilosa, en el medio hidrolizado aún quedaba un remanente (0.6 mg/ml). Si se compara el rendimiento de xilosa consumida transformada a xilitol, se encuentra que fue menor en el caso del medio con hidrolizado de *E. dunnii* que en los medios sintéticos, a pesar que la concentración de xilosa en el hidrolizado fue mayor que en el sintético 1. La velocidad de consumo de xilosa, junto con el menor rendimiento en el medio hidrolizado de *E. dunnii* podría explicarse por la presencia de ácido acético en el medio que provino de las enzimas acetilsterasas del extracto enzimático de *Pseudozyma* sp. EBV 97-87. Es conocido el efecto inhibitor del acético en la fermentación de las levaduras a partir de los hidrolizados de lignocelulósicos (Ceccato-Antonini, Codato, *et al.*, 2017). El ácido acético es un inhibidor prominente de la absorción de xilosa por las células (Novy *et al.*, 2013). En pH bajos, el ácido acético se vuelve liposoluble y es capaz de difundirse a través de la membrana plasmática. Dentro de la célula, se disocia debido al pH neutro y se acumula en el citoplasma. Los protones, liberados en el citoplasma, dan como resultado la disminución en el pH de la célula que causa la inhibición de la actividad celular y la muerte (Chandel, da Silva y Singh, 2013). Debería realizarse un control del pH para evitar que baje demasiado y ocurra este efecto, esto podría explicar que no se haya consumido toda la xilosa en las 72 horas. Por otro lado, un microorganismo puede adaptarse a inhibidores en un proceso a largo plazo bajo presión selectiva (Canilha *et al.*, 2012). En algunos reportes la adaptación a los hidrolizados lignocelulósicos dio como resultado un aumento en las tasas de fermentación y el rendimientos mayores (Parawira y Tekere, 2011).

Los resultados obtenidos concuerdan con estudios realizados por diferentes investigadores en términos de producción de xilitol a partir de hidrolizados enzimáticos de residuos lignocelulósicos diversos y cepas de otros géneros de levadura. Los reportes encontrados con mayor frecuencia son de la hidrólisis del marlo de maíz con xilanasas,



como en el caso de Li y colaboradores que utilizaron el sobrenadante de un cultivo de *Aspergillus terreus* Li-20 y lograron una concentración de 18.03 g/l de xilosa en 8 horas, que luego utilizaron para fermentar con una cepa de *Candida tropicalis* BIT-Xol-1, obteniendo en un principio una concentración de 2.67 g/l de xilitol y un rendimiento de 0.15 g xilitol / g xilosa consumida. Este rendimiento fue similar al obtenido con el hidrolizado enzimático de *E. dun nii*. Estos resultados los mejoraron luego de realizar una adaptación de la levadura al ácido acético (ya que fue uno de los productos de la hidrólisis enzimática del xilano) y llegaron a un rendimiento de 0.75 g xilitol /g xilosa consumida (Li *et al.*, 2015).

Otros reportes presentan la hidrólisis de residuos de frutos de palma, con xilanasa comercial (Accelerase XY), los resultados fueron más bajos que los anteriores citados, se obtuvo una concentración inicial de xilosa de 2 g/l y un rendimiento de 0.098 g xilitol/g xilosa consumida (0.11 g/l) con la cepa *Debaryomyces hans enii* ITB CC R85 (Kresnowati *et al.*, 2016). Estos autores concluyeron además que un aumento en la biomasa inicial de la levadura mejora la productividad de xilitol obtenida, ya que el crecimiento celular es menor y entonces la xilosa se utiliza para producir xilitol en vez de biomasa.

Por otro lado, si los resultados de la fermentación a partir de la hidrólisis enzimática se comparan con fermentaciones obtenidas por métodos químicos, que fueron detoxificados para la producción de xilitol, lo que se observa es que las concentraciones iniciales de xilosa son mayores y por lo tanto, lleva a mejoras en la concentración del producto, aumento en las productividades y rendimientos. Como en el caso del estudio realizado por Wang y colaboradores en el que estudiaron la producción de xilosa por explosión por vapor de mazorca de maíz pre-impregnada con ácido sulfúrico diluido, luego pasó el hidrolizado por una etapa de evaporación a vacío y adsorción por carbón activado. Para realizar la fermentación con *Candida tropicalis*, la concentración inicial de xilosa luego de la detoxificación fue de 100 g/l y la concentración final de xilitol fue de 75 g/l con un rendimiento de 0.75 g xilitol/g xilosa y una productividad de 2.01 g/l\*h (Wang *et al.*, 2013). En comparación a estos pretratamientos fisicoquímicos, la hidrólisis enzimática del material lignocelulósico tiene un impacto ambiental menor, se realiza en condiciones de proceso moderadas y se generan menor cantidad de inhibidores de fermentación. Por lo tanto, la hidrólisis enzimática podría ser un proceso alternativo para la preparación de hidrolizado de hemicelulosa en un bioproceso integrado.

Por último, al no haberse obtenido más productos metabólicos como etanol o glicerol, el trabajo con esta cepa hace que el proceso de separación del xilitol, en un eventual paso posterior, sea más sencillo que lo que ocurre con otras cepas que sí producen estos metabolitos.

Por lo tanto, si bien se obtuvieron valores bajos de xilitol en relación a las fermentaciones con hidrolizados por procesos químicos, en los que la concentración de xilosa inicial es mayor, la hidrólisis enzimática de la corteza de *E. dunnii* deslignificada es una alternativa con potencial a optimizarse y lograr un proceso que cuenta con la mayoría de sus pasos realizados a través de bio-catalizadores obtenidos y desarrollados a nivel local.

## 9.2.5. Producción de etanol

### 9.2.5.1. Sacarificación con celulasas comerciales de la corteza deslignificada resultante de la hidrólisis por xilanasas y fermentación con *Saccharomyces cerevisiae*

La corteza luego del tratamiento con las xilanasas resulta en un material con un mayor porcentaje de glucanos y una estructura más suelta, según se observó en las imágenes tomadas con el SEM. Este hecho la hace una buena fuente de celulosa, capaz de hidrolizarse con celulasas y utilizarse como fuente de carbono para la producción de etanol 2G por microorganismos. En esta actividad se realizó una sacarificación con un extracto de celulasas comercial de las cortezas hidrolizadas en el primer ensayo con xilanasas producidas por *Bacillus* sp. EBV 12-22 y *Pseudozyma* sp. EBV 97-87 (se muestra la cuantificación de glucosa y celobiosa en las Figuras 67 y 68). Luego de dos horas se inocularon los medios con *S. cerevisiae* para analizar si hubo un aumento en la producción de etanol gracias al tratamiento previo de la corteza con las xilanasas.

Se observó glucosa únicamente en la muestra tomada a tiempo cero ( $t_0$ ), se atribuye el hecho a un rápido consumo del azúcar simple por parte de *Saccharomyces cerevisiae* una vez generado. Al momento de inocular, o sea a tiempo cero de fermentación, la concentración de glucosa en el medio es producto de la acción de la enzima celulasa sobre la celulosa de las diferentes cortezas, su cuantificación se muestra en la Figura 71.

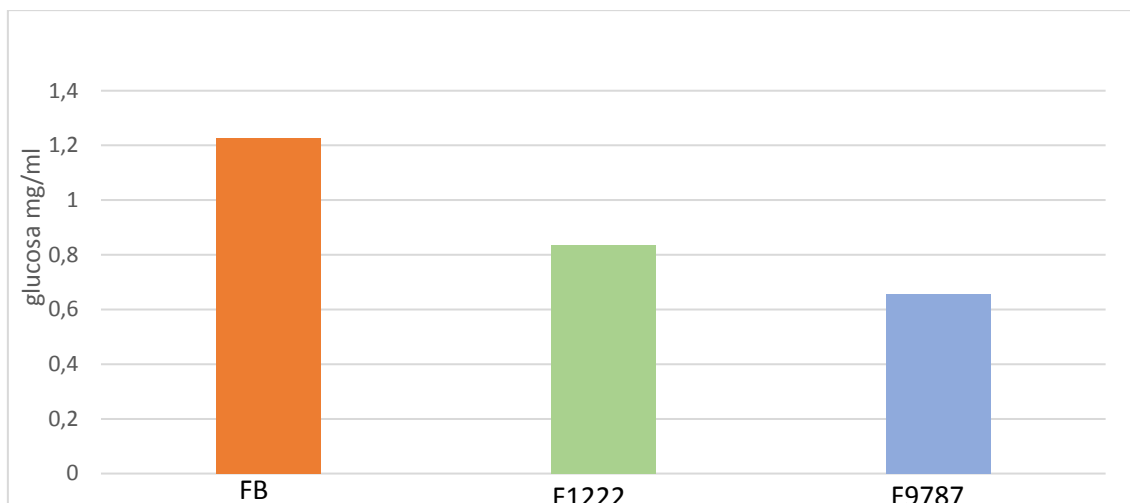


Figura 71 - Cantidad inicial de glucosa en las muestras tratadas con xilanasa bacteriana (F1222), de levadura (F9787) y blanco (FB).

Se observa una mayor concentración de glucosa inicial en la muestra blanco, que contiene corteza sin tratamiento previo con xilanasa. A su vez, dentro de las muestras tratadas previamente, se observa una mayor concentración de glucosa en aquella que fue tratada con xilanasa bacteriana. F9787, que tiene pretratamiento con xilanasa de levadura presenta la menor concentración inicial de glucosa.

A diferencia de la hipótesis manejada, el pretratamiento con xilanasas antes del agregado de celulasa no favorecería la liberación de glucosa en los primeros tiempos de reacción según los resultados de la concentración de glucosa.

Se muestra además, en la Figura 72, la producción del disacárido de glucosa (celobiosa) el cual durante la primer muestra, a las dos horas de sacarificación, hay una concentración ligeramente mayor de este oligosacárido en la corteza pretratada con las enzimas de la bacteria (F1222). Este resultado efectivamente indicaría un efecto positivo del tratamiento de la corteza con estas enzimas (a pesar de que la concentración de glucosa es menor que en blanco). En el transcurso de la reacción la curva de celobiosa disminuye en forma más pronunciada desde las 22 a las 69 horas. Podría indicar que la levadura, al ir consumiendo la glucosa, la celobiosa sea sustrato de la  $\beta$ -glucosidasa presente en el extracto enzimático comercial y el equilibrio se desplace, produciendo más glucosa y generando mayor concentración de etanol.

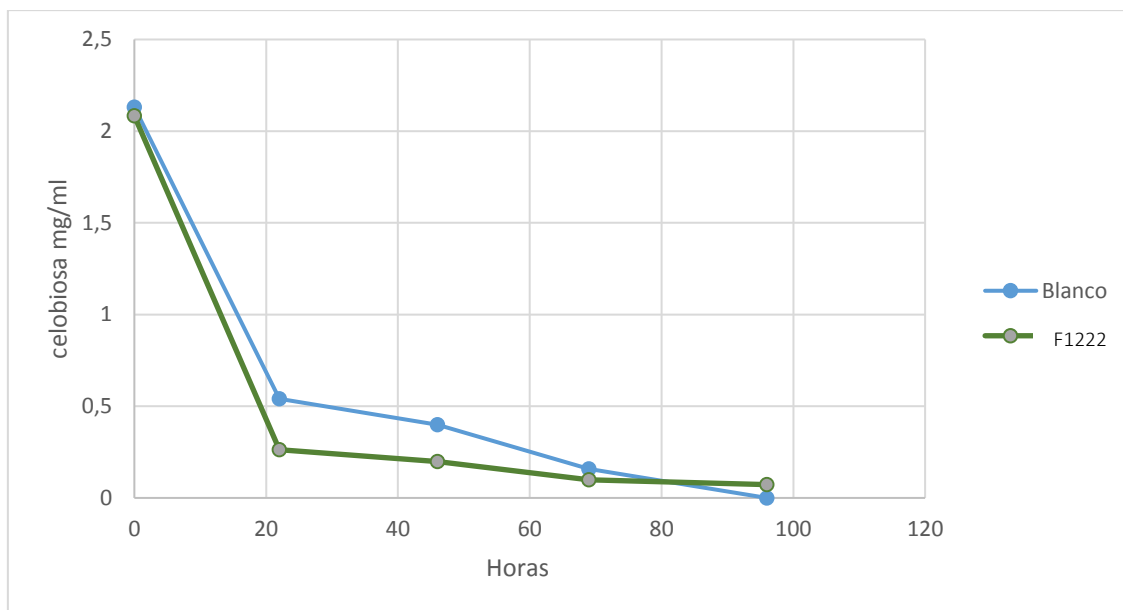


Figura 72 - Perfil de consumo de celobiosa en la producción de etanol B2G. Corteza tratada con xilanasa bacteriana (F1222) y blanco.

Se observa en el cromatograma liberación de xilosa ya que el extracto comercial de celulasa presenta, entre otras, actividad xilanasa. La concentración de xilosa varía poco a lo largo de la fermentación respecto a la concentración inicial observada, (Figura 73). La xilosa no es metabolizada por *S. cerevisiae*. Los resultados son concordantes ya que la corteza pretratada con la enzima de levadura (F9787) tiene un menor contenido de xilano, ya que fue degradado previamente por las xilanasas microbianas obtenidas.

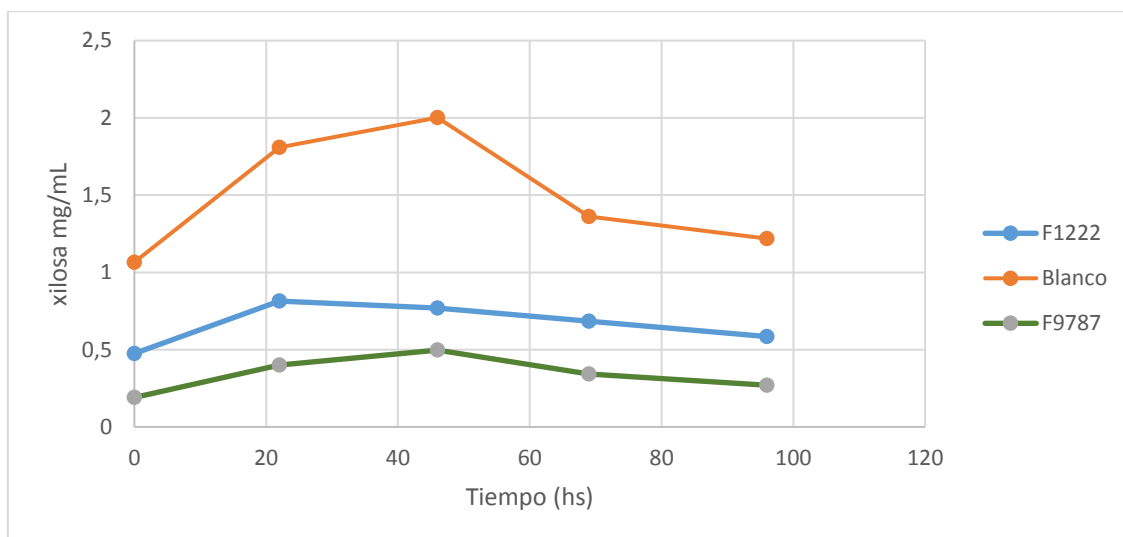


Figura 73 - Concentración de xilosa en la producción de etanol B2G. Corteza tratada con xilanasa bacteriana (F1222), de levadura (F9787) y blanco (FB).

Los perfiles de producción de etanol se comparan en la Figura 74 donde FBlanco corresponde a la fermentación llevada a cabo con la corteza sin previo tratamiento,

F1222 a la fermentación sobre la corteza tratada con xilanasa bacteriana y F9787 a la tratada con xilanasa de levadura.

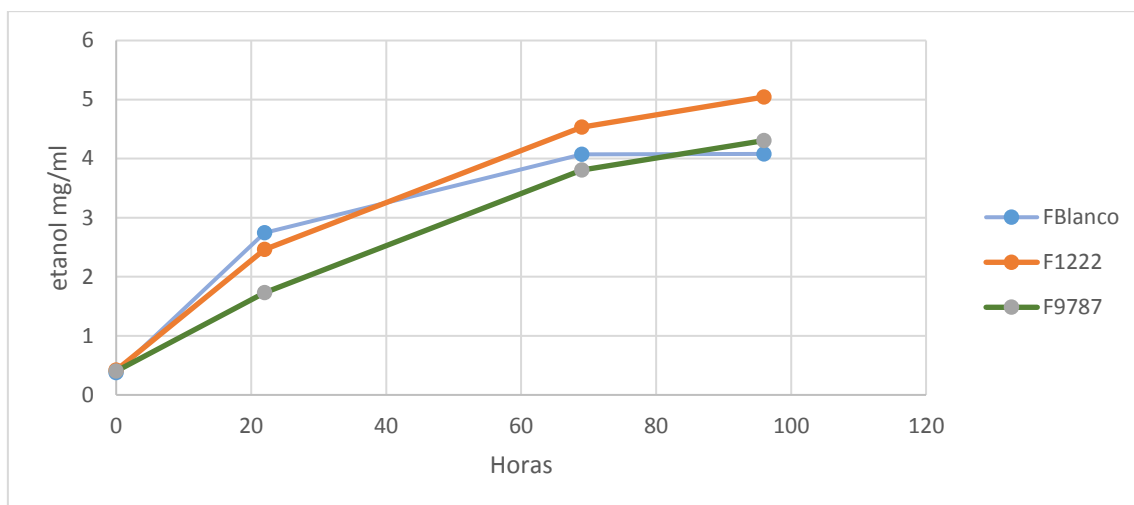


Figura 74 - Producción de etanol B2G, muestras pretatadas con xilanasa bacteriana (F1222), de levadura (F9787) y blanco (FB).

En términos absolutos, a las 96 horas la concentración de etanol en el sobrenadante del medio de ambas cortezas pretratadas con xilanasa es superior al blanco; siendo la corteza pretratada con xilanasas de origen bacteriano la que mayor etanol produjo. En términos de porcentaje, F1222 produjo **23.6%** más de etanol que el blanco y F9787 **5.5%** más. Es decir que, al finalizar la fermentación, hay una mayor producción de etanol en los medios que provienen de cortezas tratadas con las xilanasas, por lo tanto tendría un efecto positivo el tratamiento previo.

El tratamiento con xilanasas también fue positivo para la hidrólisis y fermentación del bagazo del maíz, Wu y su equipo encontraron que la adición de xilanasa en la etapa de sacarificación aumentó la concentración de etanol en comparación con el blanco (Wu *et al.*, 2017). Para observar cambios más significativos en las cortezas hidrolizadas con xilanasas, se debería realizar el mismo experimento pero con una celulasa purificada, sin la presencia de las otras enzimas componentes del extracto comercial, para comprobar la incidencia del pre-tratamiento.

La actividad de la xilanasa bacteriana produce XOS (de 2 y 3 unidades de xilosa); mientras que la enzima proveniente de *Pseudozyma* sp. EBV 97-87 se caracteriza por generar como producto mayoritario xilosa (datos mostrados en el apartado 9.2.2 de este capítulo). Este mayor carácter endo de la xilanasa bacteriana podría explicar un mayor acceso de la celulasa a las fibrillas de celulosa, mayor liberación de glucosa y mayor producción de etanol.

## 9.3. Conclusiones

---

- Es posible obtener mediante el pre-tratamiento de la corteza de *E. dunnii* con ácido peracético, durante media hora a 75 °C, un material con bajas cantidades de lignina y mayores concentraciones de xilanos y glucanos.
- A partir de la hidrólisis de este material con la xilanasas de *Bacillus* sp. EBV 12-22 se obtuvieron como productos mayoritarios XOS desde xilobiosa a xilotetrosa. Con una conversión del 54 % de los xilanos presentes en el material.
- Inicialmente, a partir de la hidrólisis de la corteza deslignificada con la xilanasas de *Pseudozyma* sp. EBV 97-87 se obtuvo como único producto xilosa (2 mg/ml). Con una conversión del 68 % de los xilanos presentes en el material. Posteriormente para obtener mayores concentraciones de xilosa, se modificaron la cantidad inicial de corteza deslignificada y la concentración enzimática y se logró un máximo de 5.8 mg/ml a partir de 500 mg de corteza y 200 U/ml de enzima.
- En ninguna de las reacciones de hidrólisis de la corteza deslignificada se observó ni por TLC ni por HPLC producción de glucosa. Este resultado es de gran interés ya que el material resultante es enriquecido en celulosa y por lo tanto se puede hidrolizar en una etapa posterior para utilizar la glucosa en otra aplicación.
- Se estudió por SEM la superficie de las cortezas luego de la hidrólisis enzimática, los resultados indican que en general el ataque de las xilanasas generan patrones de degradación en la superficie de las fibras, logrando la desintegración de la estructura al disminuir la cohesión celular y por lo tanto, quedando más abiertas y sueltas. Estos cambios son importantes para su aplicación en procesos de bio-blanqueo, sacarificación para la producción de biocombustibles y en la obtención de otros compuestos de mayor valor agregado.
- Se logró obtener xilitol como producto de mayor valor a partir de la fermentación de xilosa obtenida en la hidrólisis de la corteza deslignificada de *E. dunnii* por la xilanasas de *Pseudozyma* sp. EBV 97-87.
- El pre-tratamiento de la corteza con las enzimas xilanasas aisladas, tanto bacterianas como de levadura favorece la producción de etanol B2G en un sistema SSF (celulasa + *Saccharomyces cerevisiae*).
- El pretratamiento con xilanasas bacteriana (*Bacillus* sp. EBV 12-22) dio como resultado un aumento en la producción de etanol del **23,6%**, respecto a la corteza sin pretratamiento.

- El pretratamiento con xilanasa de levadura (*Pseudozyma* sp. EBV 97-87) dio como resultado un aumento en la producción de etanol del **5,5%**, respecto a la corteza sin pretratamiento.
- Este aumento en la producción de etanol no está asociado a la cantidad de glucosa observada en la etapa inicial del proceso (previa inoculación), pero si podría asociarse a un efecto en conjunto entre la producción de celobiosa y glucosa y la velocidad de consumo de la misma por la levadura, lo que daría como resultado un aumento en la producción de etanol.

## 10. Conclusiones finales y perspectivas

Durante el desarrollo de la presente tesis se obtuvieron biocatalizadores capaces de hidrolizar la celulosa y hemicelulosa a partir del aislamiento de cepas endófitas y epífitas de un árbol de *Eucalyptus globulus*. Las técnicas de cribado cualitativo y cuantitativo empleadas resultaron eficientes para la selección racional de los microorganismos con actividades xilanasas y celulasa.

Las cepas seleccionadas ya han sido reportadas como productoras de las enzimas de interés, para la producción de celulasas se seleccionaron la levadura *Aureobasidium* sp. EBV 96-86 y el hongo *Preussia* sp. EBV 96-24. Como microorganismos xilanolíticos se seleccionaron una bacteria del género *Bacillus* sp. EBV 12-22, una levadura del género *Pseudozyma* sp. EBV 97-87 y un hongo filamentoso del género *Penicillium* sp. EBV 95-17.

Posteriormente se estudió la producción enzimática en diferentes medios de cultivo para cada una de las cepas. En el caso de las celulasas, los distintos medios ensayados no permitieron lograr un aumento en la producción enzimática. Por esta razón se plantea como perspectiva un estudio más detallado sobre otros residuos lignocelulósicos como posibles inductores de la producción de esta enzima

Por otro lado, los mejores resultados para la producción de xilanasas se obtuvieron utilizando xilano de haya comercial en los medios de cultivo. Para el *Bacillus*, la actividad xilanasas fue más alta en un medio rico junto con el agregado del xilano mientras que para las cepas eucariotas la mayor producción se dio en el medio mínimo. Es importante señalar que es el primer reporte hasta la fecha en el que se estudió la producción de xilanasas por una cepa de *Pseudozyma* utilizando un residuo lignocelulósico como es la corteza de *Eucalyptus dunnii*.

Queda entonces planteada la posibilidad de ensayar otros residuos lignocelulósicos para lograr aumentar la actividad enzimática.

Se ensayó la purificación parcial de los crudos con actividad xilanasas a partir de los sobrenadantes de los cultivos de los microorganismos por la técnica de precipitación salina logrando extractos funcionales y con actividad específica superior a la inicial en todos los casos.

Se identificaron los productos de hidrólisis del xilano de haya por estos extractos enzimáticos y se encontró que si bien todos producen xilooligosacáridos (XOS), el perfil hidrolítico de las enzimas provenientes de los tres microorganismos es distinto. La principal diferencia es que el extracto de *Pseudozyma* sp. EBV 97-87 libera xilosa y otros xilooligosacáridos de DP mayor mientras que el extracto de *Bacillus* sp. EBV 12-22, libera XOS desde xilobiosa y el extracto de *Penicillium* sp. EBV 95-17 libera desde xilotriosa en adelante. Estos resultados son interesantes ya que las enzimas de cada microorganismo se podría utilizar para distintos objetivos, como ser la producción de XOS los cuales se



usan como pre-bióticos o la liberación de xilosa para su posterior transformación en xilitol, producto de mayor valor agregado).

La caracterización bioquímica de los extractos concentrados de *Pseudozyma* sp. EBV 97-87 y *Bacillus* sp. EBV 12-22, en relación al pH y temperatura mostró gran similitud con los resultados reportados por otros investigadores para los mismos géneros. En el caso de la xilanasa de *Bacillus* sp. EBV 12-22, el rango óptimo de pH fue entre 6.6 y 7.8 y temperatura óptima entre 50 y 60 °C.

En el caso de *Pseudozyma* sp. EBV 97-87 se encontró que si bien es activa en un amplio rango de pH el rango óptimo es entre 4.0 y 4.8 y la mejor temperatura es 50 °C. Este extracto fue estable durante 10 días a pH 4 y 4.8 y 30 °C perdiendo solo un 35 % de actividad, mientras que a 50 °C se observa únicamente un 10 % de su actividad inicial a las 24 horas. Este resultado es de gran interés ya que permite la producción de la enzima y su uso posterior si se mantienen las condiciones de almacenamiento adecuadas. Se purificó la enzima con actividad xilanasa de *Pseudozyma* sp. EBV 97-87 por cromatografía de exclusión por tamaño y se determinó que su peso molecular es de 19.9 kDa. El análisis de los productos de hidrólisis del xilano de haya con la enzima purificada, indican que se trata de una endo-xilanasa que es capaz de liberar xilosa.

En un intento de disminuir los costos de producción de la enzima, se utilizaron diferentes residuos agroindustriales para sustituir el xilano en el crecimiento de la cepa de *Pseudozyma* sp. En los medios con residuos de cebada usada y mazorca de maíz se logró obtener actividades similares a las obtenidas con el xilano. Se propone como estudio futuro la optimización de la producción de la enzima en estos medios y su purificación parcial.

Se ensayó en una etapa posterior la hidrólisis enzimática de una corteza de *Eucalyptus dunnii* previamente deslignificada por métodos químicos, con el objetivo de aplicar las enzimas obtenidas y valorizar este residuo forestal. De la hidrólisis de este material con la xilanasa de *Bacillus* sp. EBV 12-22 se obtuvieron como productos mayoritarios XOS desde xilobiosa a xilotetrosa. Con una conversión del 54 % de los xilanos presentes en el material. Con la xilanasa de *Pseudozyma* sp. EBV 97-87 se obtuvo como principal producto xilosa en una concentración inicial de 2 mg/ml) con una conversión del 68 % de los xilanos presentes en el material.

Se ensayaron diferentes cantidades de corteza inicial y concentración enzimática y se logró un máximo de 5.8 mg/ml a partir de 500 mg de corteza y 200 U/ml de enzima. Este hidrolizado se concentró y se fermentó con la levadura *Wickerhamomyces anomalus* Z1 para producir xilitol. Si bien los resultados fueron bajos, sería posible optimizar la concentración inicial de xilosa y de biomasa de levadura, este sería un estudio que se propone realizar a un futuro.

El material resultante de la hidrólisis con las xilanasas microbianas, resultó en un aumento de los glucanos ya que no se observó liberación de glucosa ni oligosacáridos de glucosa en el sobrenadante de la reacción.

Este material fue utilizado en un proceso de sacarificación y fermentación simultánea, con el agregado de celulasa comercial y un inóculo de *Saccharomyces cerevisiae*. El pre-tratamiento con xilanasas de *Bacillus* sp. EBV 12-22 dio como resultado un aumento en la producción de etanol del 23.6%, respecto a la corteza sin pretratamiento, sin embargo el pre-tratamiento con xilanasas de *Pseudozyma* sp. EBV 97-87 dio como resultado un aumento en la producción de etanol mucho menor (5.5%).

En suma, se logró producir xilanasas a partir de microorganismos nativos de Uruguay, con capacidad para obtener diferentes productos a partir de la hidrólisis de un residuo forestal como la corteza de *Eucalyptus dunnii*. Se ensayaron además otros residuos agroindustriales para la producción de una de las xilanasas, con el objetivo de lograr procesos de menor costo e integrar diferentes tipos de biomásas al proceso global.

La bioconversión de biomasa lignocelulósica es esencial para una producción sostenible en el futuro próximo. Según los estudios realizados y los resultados obtenidos es necesario seguir desarrollando e investigando estrategias para aumentar los rendimientos de la hidrólisis enzimática y reducir los costos operativos, con el fin de obtener productos que sean competitivos desde un punto de vista económico y de sustentabilidad.

## 11. Referencias

- Adhyaru, D. N., Bhatt, N. S. and Modi, H. A. (2014) 'Enhanced production of cellulase-free, thermo-alkali-solvent-stable xylanase from *Bacillus altitudinis* DHN8, its characterization and application in sorghum straw saccharification', *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(2), pp. 182–190.
- Adney, B. and Baker, J. (2008) *Measurement of Cellulase Activities Laboratory Analytical Procedure (LAP) Issue Date : 08 / 12 / 1996, Laboratory Analytical Procedure (LAP)*.
- Adsul, M. G., Bastawde, K. B. and Gokhale, D. V. (2009) 'Biochemical characterization of two xylanases from yeast *Pseudozyma hubeiensis* producing only xylooligosaccharides', *Bioresource Technology*, 100(24), pp. 6488–6495.
- Agger, J. W. *et al.* (2014) 'Discovery of LPMO activity on hemicelluloses shows the importance of oxidative processes in plant cell wall degradation', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(17), pp. 6287–6292.
- Ahmed, A., Babalola, O. and McKay, T. (2017) 'Cellulase-and Xylanase-Producing Bacterial Isolates with the Ability to Saccharify Wheat Straw and Their Potential Use in the Production of Pharmaceuticals and Chemicals from Lignocellulosic Materials', *Waste Biomass Valor*, pp. 1–11.
- Akhavan Sepahy, A., Ghazi, S. and Akhavan Sepahy, M. (2011) 'Cost-Effective Production and Optimization of Alkaline Xylanase by Indigenous *Bacillus mojavenis* AG137 Fermented on Agricultural Waste.', *Enzyme research*, 2011, pp. 593–624.
- Ali, S. S. *et al.* (2017) 'Screening and characterizing of xylanolytic and xylose-fermenting yeasts isolated from the wood-feeding termite, *Reticulitermes chinensis*', *PLoS ONE*, 12(7), pp. 1–21.
- Ali El Enshasy, H. *et al.* (2016) 'Microbial Xylanases: Sources, Types, and Their Applications', in Gupta, V. (ed.) *Microbial Enzymes in Bioconversions of Biomass*. Springer, pp. 151–213.
- De Almeida, M. N. *et al.* (2011) 'Cellulases and hemicellulases from endophytic *acremonium* species and its application on sugarcane bagasse hydrolysis', *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 165(2), pp. 594–610.
- Altschul, S. F. *et al.* (1990) 'Basic local alignment search tool.', *Journal of molecular biology*, 215(3), pp. 403–410.
- Alvarez-Zúñiga, M. T. *et al.* (2017) 'Taxonomic identification of the thermotolerant and fast-growing fungus *Lichtheimia ramosa* H71D and biochemical characterization of the thermophilic xylanase LrXynA', *AMB Express*. 7(1) pp. 194.
- Amore, A. *et al.* (2013) 'Cellulolytic bacillus strains from natural habitats - A review', *Chimica Oggi/Chemistry Today*, 31(2), pp. 49–52.
- Amore, A. *et al.* (2015) 'Application of a new xylanase activity from *Bacillus amyloliquefaciens* XR44A in brewer's spent grain saccharification', *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 90(3), pp. 573–581.

- Ang, S. K. *et al.* (2013) 'Production of cellulases and xylanase by *Aspergillus fumigatus* SK1 using untreated oil palm trunk through solid state fermentation', *Process Biochemistry*, 48(9), pp. 1293–1302.
- Anuradha, P. *et al.* (2007) 'Production and properties of alkaline xylanases from *Bacillus* sp. isolated from sugarcane fields', *Current Science*, 92(9), pp. 1283–1286.
- Arantes, V. and Goodell, B. (2014) 'Current Understanding of Brown-Rot Fungal Biodegradation Mechanisms: A Review', in Schultz (ed.) *Deterioration and Protection of Sustainable Biomaterials*. Washington: American Chemical Society. Available at: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/bk-2014-1158.ch001>.
- Arenal, F., Platas, G. and Peláez, F. (2007) 'A new endophytic species of *Preussia* (Sporormiaceae) inferred from morphological observations and molecular phylogenetic analysis', *Fungal Diversity*, 25, pp. 1–17. Available at: <http://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/25-1.pdf>.
- Arenas-Cárdenas, P. *et al.* (2017) 'Current Pretreatments of Lignocellulosic Residues in the Production of Bioethanol'. *Waste and Biomass Valorization*, 8(1), pp.161-181.
- Arola, S. (2015) *Biochemical modification and functionalization of nanocellulose surface*. VTT Technical Research Centre of Finland Ltd.
- Asha, B. M. *et al.* (2012) 'Purification and characterization of a thermophilic cellulase from a novel cellulolytic strain, *Paenibacillus barcinonensis*', *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(11), pp. 1501–1509.
- Askey, T. (no date) *Thomas Tomkinson 1804-1879*, <http://www.natgould.org/>. Available at: [http://www.natgould.org/thomas\\_tomkinson\\_1804-1879](http://www.natgould.org/thomas_tomkinson_1804-1879) (Accessed: 20 March 2018).
- Baek, C. U. *et al.* (2012) 'Cloning of a Family 11 Xylanase Gene from *Bacillus amyloliquefaciens* CH51 Isolated from Cheonggukjang', *Indian Journal of Microbiology*, 52(4), pp. 695–700.
- Bagewadi, Z. K., Mulla, S. I. and Ninnekar, H. Z. (2016) 'Purification, characterization, gene cloning and expression of GH-10 xylanase (*Penicillium citrinum* isolate HZN13)', *3 Biotech*. Springer Berlin Heidelberg, 6(2), pp. 1–9.
- Bailey, M. J., Biely, P. and Poutanen, K. (1992) 'Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity', *Journal of Biotechnology*, 23(3), pp. 257–270.
- Baldrian, P. and Valášková, V. (2008) 'Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi', *FEMS Microbiology Reviews*, 32(3), pp. 501–521.
- Baldwin, E. L. (2017) *Enhancing Cellulase Production of *Aureobasidium Pullulans* for Use in Converting Dried Distillers' Grains with Solubles into a Higher Protein Feed*. South Dakota State University. Available at: <https://openprairie.sdstate.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=2843&context=etd>.
- Banik, M., Garrett, T. P. J. and Fincher, G. B. (1996) 'Molecular cloning of cDNAs encoding (1-4)- $\beta$ -xylan endohydrolases from the aleurone layer of germinated barley (*Hordeum vulgare*)', *Plant Molecular Biology*, 31(6), pp. 1163–1172.

Barnett, C. C., Berka, R. M. and Fowler, T. (1991) 'Cloning and amplification of the gene encoding an extracellular beta-glucosidase from *Trichoderma reesei*: evidence for improved rates of saccharification of cellulosic substrates.', *Bio/technology (Nature Publishing Company)*, 9(6), pp. 562–567.

Bayer, E. A. *et al.* (2004) 'The Cellulosomes: Multienzyme Machines for Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides', *Annual Review of Microbiology*, 58, pp. 521-554.

Beeson, W. T. *et al.* (2015) 'Cellulose Degradation by Polysaccharide Monooxygenases', *Annual Review of Biochemistry*, 84(1), pp. 923–946.

Bertrand, E. *et al.* (2016) 'Exploration of fungal biodiversity for the deconstruction of lignocellulosic biomass and the implementation of new biosynthetic pathways for', in *Europe and Sustainable Development: Challenges and Prospects Exploration*. Editions Oeconomia, pp. 120–139.

Bettucci, L. and Alonso, R. (1997) 'A comparative study of fungal populations in healthy and symptomatic twigs of *Eucalyptus grandis* in Uruguay', *Mycological Research*, 101(9), pp. 1060–1064.

Bettucci, L., Alonso, R. and Tiscornia, S. (1999) 'Endophytic mycobiota of healthy twigs and the assemblage of species associated with twig lesions of *Eucalyptus globulus* and *E. grandis* in Uruguay', *Mycological Research*, 103(4), pp. 468–472.

Bettucci, L. and Saravay, M. (1993) 'Endophytic fungi of *Eucalyptus globulus*: a preliminary study', *Mycological Research*. British Mycological Society, 97(6), pp. 679–682.

Bezerra, J. D. P. *et al.* (2012) 'Richness of endophytic fungi isolated from *Opuntia ficus-indica* Mill. (Cactaceae) and preliminary screening for enzyme production', *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(5), pp. 1989–1995.

Bhalla, A., Bischoff, K. M. and Sani, R. K. (2014) 'Highly thermostable GH39  $\beta$ -xylosidase from a *Geobacillus* sp. strain WSUCF1', *BMC Biotechnology*, 14(1), pp. 7–11.

Biely, P. *et al.* (1997) 'Endo- $\beta$ -1,4-xylanase families: Differences in catalytic properties', *Journal of Biotechnology*, 57(1–3), pp. 151–166..

Biely, P. *et al.* (2000) 'Inverting character of alpha-glucuronidase A from *Aspergillus tubingensis*.', *Biochimica et biophysica acta*, 1474(3), pp. 360–364.

Biely, P. *et al.* (2004) 'Enzyme-coupled assay of acetylxylan esterases on monoacetylated 4-nitrophenyl beta-D-xylopyranosides.', *Analytical biochemistry*, 332(1), pp. 109–115.

Biely, P. *et al.* (2013) 'Mode of action of acetylxylan esterases on acetyl glucuronoxylan and acetylated oligosaccharides generated by a GH10 endoxylanase.', *Biochimica et biophysica acta*, 1830(11), pp. 5075–5086.

Biely, P., Singh, S. and Puchart, V. (2016) 'Towards enzymatic breakdown of complex plant xylan structures: State of the art', *Biotechnology Advances*, 34(7), pp. 1260–1274.

Bih, F. Y. *et al.* (1999) 'The predominant protein on the surface of maize pollen is an endoxylanase synthesized by a tapetum mRNA with a long 5' leader.', *The Journal of biological chemistry*, 274(32), pp. 22884–22894.

- Bischof, R. H., Ramoni, J. and Seiboth, B. (2016) 'Cellulases and beyond: the first 70 years of the enzyme producer *Trichoderma reesei*', *Microbial Cell Factories*. BioMed Central, 15(1), p. 106.
- Bischoff, K. M. *et al.* (2009) 'Extracellular hemicellulolytic enzymes from the maize endophyte *acremonium zeae*', *Current Microbiology*, 58(5), pp. 499–503.
- Black, G. W. *et al.* (1996) 'Evidence that linker sequences and cellulose-binding domains enhance the activity of hemicellulases against complex substrates.', *Biochemical Journal*, pp. 515–520.
- Black, G. W. *et al.* (1997) 'Cellulose binding domains and linker sequences potentiate the activity of hemicellulases against complex substrates.', *Journal of biotechnology*, 57(1–3), pp. 59–69.
- Boraston, A. B. *et al.* (2004) 'Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition.', *The Biochemical journal*, 382(Pt 3), pp. 769–781.
- Borges, T. A. *et al.* (2014) 'Biochemical characterization of an endoxylanase from *Pseudozyma brasiliensis* sp. nov. strain GHG001 isolated from the intestinal tract of Chrysomelidae larvae associated to sugarcane roots', *Process Biochemistry*, 49(1), pp. 77–83.
- Boscana, M. and Boragno, L. (2017) *Estadísticas Forestales 2017*. Montevideo. Available at: [http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/dgf\\_boletin\\_estadistico\\_2016\\_0.pdf](http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/dgf_boletin_estadistico_2016_0.pdf).
- Bozell, J. J. and Petersen, G. R. (2010) 'Technology development for the production of biobased products from biorefinery carbohydrates—the US Department of Energy's "Top 10" revisited', *Green Chemistry*, 12(4), p. 539.
- Bradford, M. M. (1976) 'A rapid and sensitive method for the quantiation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye-binding', *Anal. Biochem.*, 72, pp. 248–254.
- Bragatto, J., Segato, F. and Squina, F. M. (2013) 'Production of xylooligosaccharides (XOS) from delignified sugarcane bagasse by peroxide-HAc process using recombinant xylanase from *Bacillus subtilis*', *Industrial Crops and Products*, 51, pp. 123–129.
- Brasileiro, L. B., Colodette, J. L. and Piló-Veloso, D. (2001) 'A utilização de perácidos na deslignificação e no branqueamento de polpas celulósicas', *Química Nova*, 24, pp. 819–829.
- Brunecky, R. *et al.* (2013) 'Revealing Nature ' s Cellulase Diversity ':', *Science*, 342(December), pp. 1513–1516.
- van den Burg, B. (2003) 'Extremophiles as a source for novel enzymes.', *Current opinion in microbiology*, 6(3), pp. 213–218.
- Bussamara, R. *et al.* (2010) 'Isolation of a lipase-secreting yeast for enzyme production in a pilot-plant scale batch fermentation.', *Bioresource technology*, 101(1), pp. 268–275.
- Butt, M. S. *et al.* (2008) 'Xylanases and their applications in baking industry', *Food Technology and Biotechnology*, 46(1), pp. 22–31.

- Canilha, L. *et al.* (2012) 'Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: An overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation', *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012, pp. 1-15.
- Carro, J. *et al.* (2016) *Microbial Enzymes in Bioconversions of Biomass, Microbial Enzymes in Bioconversions of Biomass*. Edited by V. K. Gupta and M. G. Tuohy. Springer International Publishing.
- Ceccato-Antonini, S. R., Brito Codato, C., *et al.* (2017) 'Yeast for Pentose Fermentation: Isolation, Screening, Performance, Manipulation, and Prospects', in Buckeridge, M. S. and De Souza, A. P. (eds) *Advances of Basic Science for Second Generation Bioethanol from Sugarcane*. Springer International Publishing, pp. 133–157.
- Chakdar, H. *et al.* (2016) 'Bacterial xylanases: biology to biotechnology', *3 Biotech*, 6(2), p. 150.
- Chandel, A. K., da Silva, S. S. and Singh, O. V (2013) 'Detoxification of Lignocellulose Hydrolysates: Biochemical and Metabolic Engineering Toward White Biotechnology', *BioEnergy Research*, 6(1), pp. 388–401.
- Chang, S. *et al.* (2017) 'Extracellular expression of alkali tolerant xylanase from *Bacillus subtilis* Lucky9 in *E. coli* and application for xylooligosaccharides production from agro-industrial waste', *International Journal of Biological Macromolecules*, 96, pp. 249–256.
- Chapman, J., Ismail, A. and Dinu, C. (2018) 'Industrial Applications of Enzymes: Recent Advances, Techniques, and Outlooks', *Catalysts*, 8(6), p. 238.
- Chavez, R., Bull, P. and Eyzaguirre, J. (2006) 'The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium*.', *Journal of biotechnology*, 123(4), pp. 413–433.
- Chen, H. *et al.* (2017) 'A review on the pretreatment of lignocellulose for high-value chemicals', *Fuel Processing Technology*, 160, pp. 196-206.
- Chi, Z. *et al.* (2008) 'Diversity of marine yeasts with high protein content and evaluation of their nutritive compositions', *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 2008/07/01. Cambridge University Press, 88(7), pp. 1347–1352.
- Chi, Z. *et al.* (2009) 'Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a biotechnologically important yeast', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82(5), pp. 793–804.
- Collins, T., Gerday, C. and Feller, G. (2005) 'Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases', *FEMS Microbiology Reviews*, 29(1), pp. 3–23.
- Cook, J. *et al.* (2016) 'Consensus on consensus: A synthesis of consensus estimates on human-caused global warming', *Environmental Research Letters*. IOP Publishing, 11(4), pp. 1-8.
- Corrêa, R. C. G. *et al.* (2014) 'Endophytic fungi: expanding the arsenal of industrial enzyme producers', *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 41(10), pp. 1467–1478.
- Costa, D. *et al.* (2018) 'Life Cycle Assessment of Bioethanol Production from Sweet Potato (*Ipomoea batatas* L.) in an Experimental Plant', *Bioenergy Research*, pp. 715–725.

Coutinho, P. M. *et al.* (2009) 'Post-genomic insights into the plant polysaccharide degradation potential of *Aspergillus nidulans* and comparison to *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae*.', *Fungal genetics and biology: FG & B*, 46 Suppl 1, pp. S161–S169.

Cragg, S. M. *et al.* (2015) 'Lignocellulose degradation mechanisms across the Tree of Life', *Current Opinion in Chemical Biology*, 29, pp. 108–119.

Dan, S. *et al.* (2000) 'Cloning, expression, characterization, and nucleophile identification of family 3, *Aspergillus niger* beta-glucosidase.', *The Journal of biological chemistry*, 275(7), pp. 4973–4980.

Dar, M. A. *et al.* (2015) 'Isolation of cellulolytic bacteria from the gastro-intestinal tract of *Achatina fulica* (Gastropoda: Pulmonata) and their evaluation for cellulose biodegradation', *International Biodeterioration and Biodegradation*, 98, pp. 73–80.

Deak, T. (2009) 'Ecology and Biodiversity of Yeasts with Potential Value in Biotechnology', in Satyanarayana, T. and Kunze, G. (eds) *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*. Springer Science + Business Media, pp. 151–168.

Dekker, R. F. (1983) 'Bioconversion of hemicellulose: aspects of hemicellulase production by *Trichoderma reesei* QM 9414 and enzymic saccharification of hemicellulose.', *Biotechnology and bioengineering*, 25(4), pp. 1127–1146.

Deutscher, M. (ed.) (1990) *Guide to Protein Purification - Methods in Enzymology*. 1st edn. California: Academic Press.

Doldán, J., Fariña, I. and Tarigo, F. (2008) 'Utilización de *Eucalyptus* spp . Alternativas de plantaciones uruguayas para pulpa Kraft', *Publicación Anual del Laboratorio Tecnológico del Uruguay*, (3), pp. 30–34.

Driss, D. *et al.* (2014) 'Production and in vitro evaluation of xylooligosaccharides generated from corncobs using immobilized *Penicillium occitanis* xylanase', *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 102, pp. 146–153.

Duan, X. *et al.* (2008) 'Influence of different sugars on pullulan production and activities of alpha-phosphoglucose mutase, UDPG-pyrophosphorylase and glucosyltransferase involved in pullulan synthesis in *Aureobasidium pullulans* Y68.', *Carbohydrate polymers*, 73(4), pp. 587–593.

Duarte, A. W. F. *et al.* (2018) 'Cold-adapted enzymes produced by fungi from terrestrial and marine Antarctic environments', *Critical Reviews in Biotechnology*. Taylor & Francis, 38(4), pp. 600–619.

Duong-Ly, K. C. and Gabelli, S. B. (2014) 'Salting out of proteins using ammonium sulfate precipitation.', *Methods in enzymology*, 541, pp. 85–94.

E4tech, Re-Cord and Wur (2015) 'From the Sugar Platform to biofuels and biochemicals', *Final report for the European Commission Directorate-General Energy*, p. 183.

Eggleston, G. and Vercellotti, J. R. (2007) *Industrial Application of Enzymes on Carbohydrate- Based Material*. Washington: American Chemical Society.

El-Gendy, M. M. (2014) 'Optimization of Solid State Fermentation and Leaching Process Parameters for Improvement Xylanase Production by Endophytic *Streptomyces* sp.



- ESRAA-301097', *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, 6(3), pp. 154–166.
- Evtuguin, D. V. *et al.* (2003) 'Characterization of an acetylated heteroxylan from *Eucalyptus globulus* Labill', *Carbohydrate Research*, 338(7), pp. 597–604.
- FAO (1991) *Conservación de energía en las industrias mecánicas forestales*. Roma.
- FAO (2014) *Aprovechamiento forestal y mercados de la madera en la Amazonía Ecuatoriana*.
- Faria, N. *et al.* (2014) 'Conversion of cellulosic materials into glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by *Pseudozyma* spp. under SHF and SSF processes.', *Microbial Cell Factories*, 13(1), p. 155.
- Florencio, C. *et al.* (2016) 'Secretome analysis of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* cultivated by submerged and sequential fermentation processes: Enzyme production for sugarcane bagasse hydrolysis', *Enzyme and Microbial Technology*, 90, pp. 53–60.
- Fujimoto, Z. *et al.* (2004) 'Crystal structures of decorated xylooligosaccharides bound to a family 10 xylanase from *Streptomyces olivaceoviridis* E-86.', *The Journal of biological chemistry*, 279(10), pp. 9606–9614..
- Gabova, O. (2018) *Functionalization of cellulosic fibers via adsorption of native and light-responsive polysaccharides of cellulosic Gabova fibers via adsorption of native and light-responsive polysaccharides* Functionalization of cellulosic fibers via adsorption of native. Åbo Akademi University.
- García-Torreiro, M. *et al.* (2016) 'Fungal pretreatment of agricultural residues for bioethanol production', *Industrial Crops and Products*, 89, pp. 486–492.
- Gatenholm, P. and Tenkanen, M. (2003) *Hemicelluloses : Science and Technology; ACS Symposium Series ; American Chemical Society, Washington, DC., International Symposium on Xylans, Mannans and Other Hemicelluloses*.
- Gellerstedt, G., Ek, M. and Henriksson, G. (2009) *Wood Chemistry and Wood Biotechnology*, Walter de Gruyter , p. 308.
- Ghaffar, A. *et al.* (2017) 'Acidic and enzymatic saccharification of waste agricultural biomass for biotechnological production of xylitol', *Chemistry Central Journal*. Springer International Publishing, 11(1), pp. 1–6.
- Ghio, S. *et al.* (2012) 'Isolation of *Paenibacillus* sp. and *Variovorax* sp. strains from decaying woods and characterization of their potential for cellulose deconstruction', *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 3(4), pp. 352–364.
- Ghio, S. *et al.* (2016) 'GH10 XynA is the main xylanase identified in the crude enzymatic extract of *Paenibacillus* sp. A59 when grown on xylan or lignocellulosic biomass', *Microbiological Research*, 186–187, pp. 16–26.
- Gilbert, H. J. and Hazlewood, G. P. (1993) 'Bacterial cellulases and xylanases', *Journal of General Microbiology*, 139(2), pp. 187–194.
- Girio, F. M. *et al.* (2010) 'Hemicelluloses for fuel ethanol: A review', *Bioresource Technology*, 101(13), pp. 4775–4800.

Goddard Institute for Space Studies (2018) *Long-Term Warming Trend Continued in 2017: NASA, NOAA, NASA News & Feature Releases*. Available at: <https://www.giss.nasa.gov/research/news/20180118/> (Accessed: 9 July 2018).

Gomes, F. C. O. *et al.* (2015) 'The diversity and extracellular enzymatic activities of yeasts isolated from water tanks of *Vriesea minarum*, an endangered bromeliad species in Brazil, and the description of *Occultifur brasiliensis* f.a., sp. nov.', *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 107(2), pp. 597–611.

Grenet, E. (1989) 'Electron Microscopy as a Method to Evaluate Structure and Degradation of Plant Cell Walls', *Physico-Chemical Characterisation of Plant Residues for Industrial and Feed Use*, pp. 65–79.

Grunwald, P. (2012) *Carbohydrate-modifying biocatalysis*. Boca Ratón: CRC Press.

Guamán-Burneo, M. C. *et al.* (2015) 'Xylitol production by yeasts isolated from rotting wood in the Galápagos Islands, Ecuador, and description of *Cyberlindnera galapagoensis* f.a., sp. nov.', *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 108(4), pp. 919–931.

Hadar, Y. (2013) *Lignocellulose Conversion*. Edited by V. Faraco. Berlin.

Haddar, A. *et al.* (2012) 'Alkaline xylanases from *Bacillus mojavenis* A21: Production and generation of xylooligosaccharides', *International Journal of Biological Macromolecules*, 51(4), pp. 647–656.

Hahn-Hagerdal, B. *et al.* (2006) 'Bio-ethanol--the fuel of tomorrow from the residues of today.', *Trends in biotechnology*, 24(12), pp. 549–556.

Hakulinen, N. *et al.* (2003) 'Three-dimensional structures of thermophilic b-1,4-xylanases from *Chaetomium thermophilum* and *Nonomuraea flexuosa*: Comparison of twelve xylanases in relation to their thermal stability', *European Journal of Biochemistry*, 270(7), pp. 1399–1412.

Hames, B. *et al.* (2008) 'Preparation of Samples for Compositional Analysis Laboratory Analytical Procedure ( LAP ) Issue Date : 8 / 06 / 2008 Preparation of Samples for Compositional Analysis Laboratory Analytical Procedure ( LAP )', *National Renewable Energy Laboratory*, (August), pp. 1–9.

Hansen, G. H. *et al.* (2015) 'Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: Comparison of solid state and submerged fermentation', *Process Biochemistry*, 50(9), pp. 1327–1341.

Harris, A. D. and Ramalingam, C. (2010) 'Xylanases and its Application in Food Industry: A Review', *Journal of Experimental Sciences*, 1(7), pp. 1–11. Available at: [www.jexpsciences.com](http://www.jexpsciences.com).

Hayashi, H. *et al.* (1997) 'Sequence of xynC and properties of XynC, a major component of the *Clostridium thermocellum* cellulosome.', *Journal of Bacteriology*, pp. 4246–4253.

Hearle, J. W. S. (1958) 'A fringed fibril theory of structure in crystalline polymers', *Journal of Polymer Science*, XXVIII(117), pp. 432–435.

Heggset, E. B., Syverud, K. and Øyaas, K. (2016) 'Novel pretreatment pathways for

dissolution of lignocellulosic biomass based on ionic liquid and low temperature alkaline treatment', *Biomass and Bioenergy*, 93, pp. 194–200.

Henrissat, B. and Bairoch, A. (1996) 'Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases.', *The Biochemical journal*, 316 (Pt 2), pp. 695–696.

Henrissat, B., Vegetales, M. and Grenoble, F. (1991) 'A classification of glycosyl hydrolases based sequence similarities amino acid', *Biochemical Journal*, 280(( Pt 2)), pp. 309–316.

Hero, J. S. *et al.* (2017) 'Endoglucanase and Xylanase Production by Bacillus sp. AR03 in Co-Culture Glycosyl Hydrolases by Bacillus sp. AR03 in Co-Culture', *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 47(6), pp. 589–596.

Hidaka, M. *et al.* (2004) 'Chitobiose phosphorylase from *Vibrio proteolyticus*, a member of glycosyl transferase family 36, has a clan GH-L-like ( $\alpha/\alpha$ )<sub>6</sub> barrel fold', *Structure*, 12(6), pp. 937–947.

Ben Hmad, I. and Gargouri, A. (2017) 'Neutral and alkaline cellulases: Production, engineering, and applications', *Journal of Basic Microbiology*, 57(8), pp. 653–658.

International Energy Agency (2009) *Biorefineries: Adding Value to the Sustainable Utilisation of Biomass*, IEA Bioenergy. Available at: [www.iea-bioenergy.task42-biorefineries.com%0ATask](http://www.iea-bioenergy.task42-biorefineries.com%0ATask) (Accessed: 18 August 2018).

Irwin, D., Jung, E. D. and Wilson, D. B. (1994) 'Characterization and sequence of a Thermomonospora fusca xylanase.', *Applied and Environmental Microbiology*, pp. 763–770.

Isikgor, F. H. and C. Remzi Becer (2015) 'Lignocellulosic Biomass: a sustainable platform for production of bio-based chemicals and polymers', *Polymer Chemistry*. Royal Society of Chemistry, 6, pp. 4497–4559.

Jaejung, L. *et al.* (2012) 'Screening for xylanase and  $\beta$ -xylosidase production from wood-inhabiting Penicillium strains for potential use in biotechnological applications', *Holzforschung*, 66, p. 267.

Jiménez, M. *et al.* (1991) 'Screening of yeasts isolated from decayed wood for lignocellulose-degrading enzyme activities', *Mycological Research*, 95(11), pp. 1299–1302.

Jung, Y. R. *et al.* (2015) 'Cellulolytic enzymes produced by a newly isolated soil fungus Penicillium sp. TG2 with potential for use in cellulosic ethanol production', *Renewable Energy*, 76, pp. 66–71.

Jungmeier, G. *et al.* (2015) *Assessing Biorefineries Using Wood for the BioEconomy – Current Status and Future Perspective of IEA Bioenergy Task 42 'Biorefining'*. Available at: <http://www.iea-bioenergy.task42-biorefineries.com> (Accessed: 18 August 2018).

Juturu, V. and Wu, J. C. (2014) 'Microbial cellulases: Engineering, production and applications', *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 33, pp. 188–203.

Kalim, B. and Mazhar, N. (2016) 'Optimization of fermentation media and growth conditions for microbial xylanase production', *3 Biotech*, pp. 122–129.

- Kallel, F. *et al.* (2016) 'Statistical optimization of low-cost production of an acidic xylanase by *Bacillus mojavensis* UEB-FK: Its potential applications', *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 5, pp. 1–10.
- Kane, S. (2015) *The Degradation of Cellulosic Material by Cellulomonas fimi*. University of Edinburgh.
- Kawa-Rygielska, J. and Pietrzak, W. (2014) 'Ethanol fermentation of very high gravity (VHG) maize mashes by *Saccharomyces cerevisiae* with spent brewer's yeast supplementation', *Biomass and Bioenergy*, 60, pp. 50–57.
- Kerem, Z., Jensen, K. A. and Hammel, K. E. (1999) 'Biodegradative mechanism of the brown rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*: Evidence for an extracellular hydroquinone-driven fenton reaction', *FEBS Letters*, 446(1), pp. 49–54.
- Khan, A. L. *et al.* (2016) 'Endophytic fungi from frankincense tree improves host growth and produces extracellular enzymes and indole acetic acid', *PLoS ONE*, 11(6), pp. 1–19.
- Kolenová, K., Vrsanská, M. and Biely, P. (2006) 'Mode of action of endo-beta-1,4-xylanases of families 10 and 11 on acidic xylooligosaccharides.', *Journal of biotechnology*, 121(3), pp. 338–345.
- Kraus, G. A., Stankiewicz, A. and Siedl, P. (2015) *Biomass Sugars for Non-Fuel Applications*. Edited by D. Murzin and O. Simakova. Cambridge: Royal Society of Chemistry.
- Kresnowati, M. T. A. P. *et al.* (2016) 'Microbial Production of Xylitol from Oil Palm Empty Fruit Bunch Hydrolysate: Effects of Inoculum and pH', *Journal of Engineering and Technological Sciences*, 48(5), pp. 523–533.
- Kshirsagar, S. D. *et al.* (2016) 'An isolated *Amycolatopsis* sp. GDS for cellulase and xylanase production using agricultural waste biomass', *Journal of Applied Microbiology*, 120(1), pp. 112–125.
- Kuhad, R. C., Gupta, R. and Singh, A. (2011) 'Microbial Cellulases and Their Industrial Applications', *Enzyme Research*, 2011, pp. 1–10.
- Kumar, S. *et al.* (2017) 'Purification, characterization and thermostability improvement of xylanase from *Bacillus amyloliquefaciens* and its application in pre-bleaching of kraft pulp', *3 Biotech*. Springer Berlin Heidelberg, 7(1), pp. 1–12.
- Kumar, S. and Sani, R. K. (2017) *Biorefining of biomass to biofuels : opportunities and perception*. Available at: <https://books.google.co.cr/books?id=A2c9DwAAQBAJ&pg=PA346&dq=cartridge+filter+biodiesel&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwix68DozbfZAhWP2FMKHcHFDHwQ6AEIjAA#v=onepage&q=cartridge filter biodiesel&f=false>.
- Langston, J., Sheehy, N. and Xu, F. (2006) 'Substrate specificity of *Aspergillus oryzae* family 3 beta-glucosidase.', *Biochimica et biophysica acta*, 1764(5), pp. 972–978.
- Lara, C. A. *et al.* (2014) 'Identification and characterisation of xylanolytic yeasts isolated from decaying wood and sugarcane bagasse in Brazil', *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 105(6), pp. 1107–1119.

- Latif, F. and Rajoka, M. I. (2001) 'Production of ethanol and xylitol from corn cobs by yeasts', *Bioresource Technology*, 77(1), pp. 57–63.
- Leite, R. S. R. *et al.* (2007) 'Production of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes from *Aureobasidium pulluans* on solid state fermentation', *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 137–140(1–12), pp. 281–288.
- Li, Q. *et al.* (2018) 'Characterization of a novel thermostable and xylose-tolerant GH 39  $\beta$ -xylosidase from *Dictyoglomus thermophilum*', *BMC Biotechnology*, 18(1), pp. 1–11.
- Li, Z. *et al.* (2015) 'An environment friendly and efficient process for xylitol bioconversion from enzymatic corncob hydrolysate by adapted *Candida tropicalis*', *Chemical Engineering Journal*, 263, pp. 249–256.
- Liebl, W. *et al.* (2008) 'Xylanase attachment to the cell wall of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*', *Journal of Bacteriology*, 190(4), pp. 1350–1358.
- Lin, C. *et al.* (2015) 'Newly isolated *Penicillium ramulosum* n1 is excellent for producing protease-resistant acidophilic xylanase', *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 25(5), pp. 320–326.
- Liu, X. *et al.* (2018) 'Biochemical characterization of a novel xylanase from *Paenibacillus barengoltzii* and its application in xylooligosaccharides production from corncobs', *Food Chemistry*, 264, pp. 310–318.
- Lombard, V. *et al.* (2014) 'The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013', *Nucleic Acids Research*, 42(D1), pp. 490–495.
- López-Linares, J. C. *et al.* (2018) 'Xylitol production by *Debaryomyces hansenii* and *Candida guilliermondii* from rapeseed straw hemicellulosic hydrolysate', *Bioresource Technology*, 247, pp. 736–743.
- Mandelli, F. *et al.* (2014) 'Simultaneous production of xylooligosaccharides and antioxidant compounds from sugarcane bagasse via enzymatic hydrolysis', *Industrial Crops and Products*, 52, pp. 770–775.
- Mandels, M., Hontz, L. and Nystrom, J. (1974) 'Enzymatic hydrolysis of waste cellulose', *Biotechnology and Bioengineering*, 16(11), pp. 1471–1493.
- Manisha and Yadav, S. K. (2017) 'Technological advances and applications of hydrolytic enzymes for valorization of lignocellulosic biomass', *Bioresource Technology*, pp. 1727–1739.
- Mantero, C., Fernández, V. and Ros, a. (2008) 'Anatomía, peso específico aparente de la madera y porcentaje de corteza en orígenes de dos especies de', *Agrociencia*, 12, pp. 20–30.
- Marchand, G. *et al.* (2009) 'Identification of genes potentially involved in the biocontrol activity of *Pseudozyma flocculosa*.', *Phytopathology*, 99(10), pp. 1142–1149.
- Mardawati, E. *et al.* (2014) 'The Enzymatic Hydrolysis of Oil Palm Empty Fruit Bunches to Xylose', *Journal of the Japan Institute of Energy*, 93, pp. 973–978.
- Marjamaa, K. *et al.* (2013) 'Novel *Penicillium* cellulases for total hydrolysis of

- lignocellulosics', *Enzyme and Microbial Technology*, 52(6–7), pp. 358–369.
- Marques, N. P. *et al.* (2018) 'Cellulases and xylanases production by endophytic fungi by solid state fermentation using lignocellulosic substrates and enzymatic saccharification of pretreated sugarcane bagasse', *Industrial Crops and Products*, 122, pp. 66–75.
- Matsui, I. *et al.* (2000) 'Novel substrate specificity of a membrane-bound beta-glycosidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii*.' , *FEBS letters*, 467, pp. 195–200.
- Mattam, A. J. *et al.* (2016) 'Cellulolytic enzyme expression and simultaneous conversion of lignocellulosic sugars into ethanol and xylitol by a new *Candida tropicalis* strain', *Biotechnology for Biofuels*, 9(1), p. 157.
- McCarter, J. D. and Withers, S. G. (1994) 'Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis.' , *Current opinion in structural biology*, 4(6), pp. 885–892.
- Meddeb-Mouelhi, F., Moisan, J. K. and Beauregard, M. (2014) 'A comparison of plate assay methods for detecting extracellular cellulase and xylanase activity', *Enzyme and Microbial Technology*, 66, pp. 16–19.
- Menezes, da Silva, B., Daniele, Rossi, M. and Ayub Záchia, M. A. (2017) 'Screening of filamentous fungi to produce xylanase and xylooligosaccharides in submerged and solid-state cultivations on rice husk, soybean hull, and spent malt as substrates', *World J Microbiol Biotechnol*, (33), p. 58.
- Messia, M. C. *et al.* (2016) 'Effects of pre-fermented wheat bran on dough and bread characteristics', *Journal of Cereal Science*, 69, pp. 138–144.
- Mhetras, N., Liddell, S. and Gokhale, D. (2016) 'Purification and characterization of an extracellular  $\beta$ -xylosidase from *Pseudozyma hubeiensis* NCIM 3574 (PhXyl), an unexplored yeast', *AMB Express*, 6(1).
- Middelhoven, W. J. (1997) 'Identity and biodegradative abilities of yeasts isolated from plants growing in an arid climate', *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 72(2), pp. 81–89.
- Milagres, A. M. F. and Prade, R. A. (1994) 'Production of xylanases from *Penicillium janthinellum* and its use in the recovery of cellulosic textile fibers', *Enzyme and Microbial Technology*, 16(7), pp. 627–632.
- Morais, C. G. *et al.* (2013) 'D-xylose-fermenting and xylanase-producing yeast species from rotting wood of two Atlantic Rainforest habitats in Brazil', *Fungal Genetics and Biology*, 60, pp. 19–28.
- Moure, A. *et al.* (2006) 'Advances in the manufacture, purification and applications of xylo-oligosaccharides as food additives and nutraceuticals', *Process Biochemistry*, 41(9), pp. 1913–1923.
- Mupondwa, E. *et al.* (2017) 'Status of Canada's lignocellulosic ethanol: Part I: Pretreatment technologies', *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 72, pp. 178–190.
- Mussatto, S. (ed.) (2016) *Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic*

*Feedstock Based Biorefinery*. Amsterdam: Elsevier.

Nagae, M. *et al.* (2007) 'Structural basis of the catalytic reaction mechanism of novel 1,2-alpha-L-fucosidase from *Bifidobacterium bifidum*.' , *The Journal of biological chemistry*, 282(25), pp. 18497–18509.

National Oceanic and Atmospheric Administration (2018) *NOAA : 2017 was 3rd warmest year on record for the globe*, U.S. Department of Commerce. Available at: <http://www.noaa.gov/news/noaa-2017-was-3rd-warmest-year-on-record-for-globe> (Accessed: 9 August 2018).

Neto, A. A. K. *et al.* (2016) 'Insights into the plant polysaccharide degradation potential of the xylanolytic yeast *Pseudozyma brasiliensis*' , *FEMS Yeast Research*, 16(2), pp. 1–12.

Neumuller, K. G. *et al.* (2015) 'Positional preferences of acetyl esterases from different CE families towards acetylated 4-O-methyl glucuronic acid-substituted xylo-oligosaccharides.' , *Biotechnology for biofuels*, 8(1), p. 7.

Ni, J. and Tokuda, G. (2013) 'Lignocellulose-degrading enzymes from termites and their symbiotic microbiota' , *Biotechnology Advances*, 31(6), pp. 838–850.

Nieto-Domínguez, M. *et al.* (2017) 'Prebiotic effect of xylooligosaccharides produced from birchwood xylan by a novel fungal GH11 xylanase' , *Food Chemistry*, 232, pp. 105–113.

Novy, V. *et al.* (2013) 'Co-fermentation of hexose and pentose sugars in a spent sulfite liquor matrix with genetically modified *Saccharomyces cerevisiae*.' , *Bioresource technology*, 130, pp. 439–448.

Oliveira, J. V. de C. *et al.* (2014) '*Pseudozyma brasiliensis* sp. nov., a xylanolytic, ustilaginomycetous yeast species isolated from an insect pest of sugarcane roots' , *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64, pp. 2159–2168.

Oses, R. *et al.* (2006) 'Evaluation of fungal endophytes for lignocellulolytic enzyme production and wood biodegradation' , *International Biodeterioration and Biodegradation*, 57(2), pp. 129–135.

Parawira, W. and Tekere, M. (2011) 'Biotechnological strategies to overcome inhibitors in lignocellulose hydrolysates for ethanol production: review.' , *Critical reviews in biotechnology*, 31(1), pp. 20–31.

Passoth, V., Olstorpe, M. and Schnürer, J. (2011) 'Past, present and future research directions with *Pichia anomala*' , *Antonie van Leeuwenhoek*, 99(1), pp. 121–125.

Pennacchio, A. *et al.* (2018) 'Isolation of new cellulase and xylanase producing strains and application to lignocellulosic biomasses hydrolysis and succinic acid production' , *Bioresource Technology*, 259, pp. 325–333.

Pinkert, A. *et al.* (2009) 'Ionic liquids and their interaction with cellulose' , *Chemical Reviews*, 109(12), pp. 6712–6728.

Pitt, J. I. and Hocking, A. D. (2009) *Fungi and Food Spoilage*. Third. New York: Springer Berlin Heidelberg.

- Polizeli, M. L. T. M. *et al.* (2005) 'Xylanases from fungi: Properties and industrial applications', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67(5), pp. 577–591.
- Procópio, R. E. L. *et al.* (2009) 'Characterization of an endophytic bacterial community associated with Eucalyptus spp', *Genetics and Molecular Research*, 8(4), pp. 1408–1422.
- Puchart, V. *et al.* (2016) 'Comparison of fungal carbohydrate esterases of family CE16 on artificial and natural substrates.', *Journal of biotechnology*, 233, pp. 228–236.
- Qaisar, S. *et al.* (2014) 'Enhanced production of cellulose degrading CMCase by newly isolated strain of *Aspergillus versicolor*', *Carbohydrate Polymers*, 104(1), pp. 199–203.
- Quiroz-Castañeda, R. E. and Folch-Mallol, J. L. (2013) 'Hydrolysis of biomass mediated by cellulases for the production of sugars', *Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization*, pp. 119–155.
- Rai, R. *et al.* (2016) 'Evaluation of secretome of highly efficient lignocellulolytic *Penicillium* sp. Dal 5 isolated from rhizosphere of conifers', *Bioresource Technology*, 216, pp. 958–967.
- Raj Xavier, J., Ramana, K. V. and Sharma, R. K. (2018) 'Production of a thermostable and alkali resistant endoxylanase by *Bacillus subtilis* DFR40 and its application for preparation of prebiotic xylooligosaccharides', *Journal of Food Biochemistry*, pp. 1-11.
- Rajesh, P. S. and Ravishankar Rai, V. (2013) 'Hydrolytic enzymes and quorum sensing inhibitors from endophytic fungi of *Ventilago madraspatana* Gaertn', *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2(2), pp. 120–124.
- Ramarajan, R. and Sumathi Manohar, C. (2017) 'Biological pretreatment and bioconversion of agricultural wastes, using ligninolytic and cellulolytic fungal consortia', *BIOREMEDIATION JOURNAL*. pp. 1-12.
- Ramawat, G. K. and Mérillon, J.-M. (2015) *Polysaccharides. Bioactivity and Biotechnology, Polysaccharides*. Switzerland: Springer.
- Rashad, M. M. *et al.* (2016) 'Production of antioxidant xylooligosaccharides from lignocellulosic materials using *Bacillus amyloliquifaciens* NRRL B-14393 xylanase', *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 6(6), pp. 30–36.
- Reddy, S. S. and Krishnan, C. (2016) 'Production of xylooligosaccharides in SSF by *Bacillus subtilis* KCX006 producing  $\beta$ -xylosidase-free endo-xylanase and multiple xylan debranching enzymes', *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 46(1), pp. 49–55.
- Reina, L. *et al.* (2016) 'Production of second generation ethanol using Eucalyptus dunnii bark residues and ionic liquid pretreatment', *Biomass and Bioenergy*, 93, pp. 116-121.
- Rizzatti, A. C. S. *et al.* (2001) 'Purification and properties of a thermostable extracellular  $\beta$ -D-xylosidase produced by a thermotolerant *Aspergillus phoenicis*', *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 26(3), pp. 156–160.
- Robert, V. *et al.* (2013) 'MycoBank gearing up for new horizons.', *IMA Fungus*, 4(2), pp. 371–379.
- Robl, D. *et al.* (2013) 'The capability of endophytic fungi for production of hemicellulases



and related enzymes.', *BMC biotechnology*, 13, p. 94.

Robledo, A. *et al.* (2015) 'Production of thermostable xylanase by thermophilic fungal strains isolated from maize silage', *CyTA - Journal of Food*, 6337, pp. 1–7.

Rocha dos Santos Mathias, T., Moretzsohn de Mello, P. P. and Camporese Srvulo, E. F. (2014) 'Solid wastes in brewing process: A review', *Journal of Brewing and Distilling*, 5(1), pp. 1–9.

Rodríguez, P. *et al.* (2007) 'Are endophytic microorganisms involved in the stereoselective reduction of ketones by *Daucus carota* root?', *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 49(1–4), pp. 8–11.

Rodríguez, P., Gonzalez, D. and Rodríguez Giordano, S. (2016) 'Endophytic microorganisms: A source of potentially useful biocatalysts', *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, pp. 569-581.

Roncero, M. B. *et al.* (2005) 'The effect of xylanase on lignocellulosic components during the bleaching of wood pulps', *Bioresource Technology*, 96(1), pp. 21–30.

Rong, Y. *et al.* (2015) 'A carboxymethyl cellulase from a marine yeast (*Aureobasidium pullulans* 98): Its purification, characterization, gene cloning and carboxymethyl cellulose digestion', *Journal of Ocean University of China*, 14(5), pp. 913–921.

Saikonnen, K. *et al.* (1998) 'FUNGAL ENDOPHYTES : A Continuum of Interactions with Host Plants', *Annual Review of Ecology and Systematics*, 29, pp. 319–343.

Saini, R. *et al.* (2015) 'Enhanced cellulase production by *Penicillium oxalicum* for bio-ethanol application', *Bioresource Technology*, 188, pp. 240–246.

Santana, N. B. *et al.* (2018) 'Production of xylitol and bio-detoxification of cocoa pod husk hemicellulose hydrolysate by *Candida boidinii* XM02G', *PLoS ONE*, 13(4), pp. 1–15.

dos Santos Mathias, T. R. *et al.* (2015) 'Characterization and determination of brewer's solid wastes composition', *Journal of the Institute of Brewing*, 121(3), pp. 400–404.

Schubot, F. D. *et al.* (2004) 'Structural Basis for the Exocellulase Activity of the Cellobiohydrolase CbhA from *Clostridium thermocellum*', *Biochemistry*, 43(5), pp. 1163–1170.

Seo, H.-S. *et al.* (2007) 'Pseudozyma jejuensis sp. nov., a novel cutinolytic ustilaginomycetous yeast species that is able to degrade plastic waste.', *FEMS yeast research*, 7(6), pp. 1035–1045.

Serventi, L., Skibsted, L. H. and Kidmose, U. (2016) 'Individual and combined effects of water addition with xylanases and laccase on the loaf quality of composite wheat cassava bread', *European Food Research and Technology*, 242(10), pp. 1663–1672.

Shao, W. *et al.* (2011) 'Characterization of a novel  $\beta$ -xylosidase, XylC, from thermoanaerobacterium saccharolyticum JW/SL-YS485', *Applied and Environmental Microbiology*, 77(3), pp. 719–726.

Sharma, M. and Kumar, A. (2013) 'Xylanases : An Overview', 3(1), pp. 1–28.

Shi, H. *et al.* (2013) 'Biochemical properties of a novel thermostable and highly xylose-

- tolerant beta-xylosidase/alpha-arabinosidase from *Thermotoga thermarum*', *Biotechnology for Biofuels*, 6, pp. 1–10.
- Silva, C. O. G., Vaz, R. P. and Filho, E. X. F. (2018) 'Bringing plant cell wall-degrading enzymes into the lignocellulosic biorefinery concept', *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 12(2), pp. 277–289.
- Silva, N. F. D. S. *et al.* (2016) 'Improvement in the bleaching of kraft pulp with xylanase from *Penicillium crustosum* FP 11 isolated from the Atlantic forest', *Biocatalysis and Biotransformation*, 34(3), pp. 119–127.
- da Silva Delabona, P. *et al.* (2016) 'Enhanced cellulase production by *Trichoderma harzianum* by cultivation on glycerol followed by induction on cellulosic substrates', *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Springer Berlin Heidelberg, 43(5), pp. 617–626.
- Simeto, S. *et al.* (2005) 'Fungal community of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus maidenii* stems in Uruguay', *Sydowia*, 57(2), pp. 246–258. Available at: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-33744949935&partnerID=40&md5=43c5367cf727ea5c9f70e87e65b82c93>.
- Singh, S. *et al.* (2014) 'Production, optimization and evaluation of multicomponent holocellulase produced by *Streptomyces* sp. sssr-198', *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 45(5), pp. 2379–2386.
- Singh, S. M. *et al.* (2012) 'Filamentous soil fungi from Ny-Ålesund, spitsbergen, and screening for extracellular enzymes', *Arctic*, 65(1), pp. 45–55.
- Singhania, R. R. *et al.* (2010) 'Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases', *Enzyme and Microbial Technology*, 46(7), pp. 541–549.
- Singhania, R. R. *et al.* (2015) 'An integrative process for bio-ethanol production employing SSF produced cellulase without extraction', *Biochemical Engineering Journal*, 102, pp. 45–48.
- Sluiter, A. *et al.* (2008) 'Determination of Extractives in Biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP); Issue Date 7/17/2005 - 42619.pdf', *Technical Report NREL/TP-510-42619*, (January), pp. 1–9.
- Sluiter, A. *et al.* (2012) 'NREL/TP-510-42618 analytical procedure - Determination of structural carbohydrates and lignin in Biomass', *Laboratory Analytical Procedure (LAP)*, (April 2008), p. 17.
- Song, Y. *et al.* (2016) 'Cellulosic bioethanol production from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) using hydrogen peroxide-acetic acid (HPAC) pretreatment', *Bioresource Technology*, 214, pp. 30–36.
- Souza, T. V *et al.* (2016) 'Chemical stability of a cold-active cellulase with high tolerance toward surfactants and chaotropic agent', *Biotechnology Reports*, 9, pp. 1–8.
- Sridevi, A., Ramanjaneyulu, G. and Suvarnalatha Devi, P. (2017) 'Biobleaching of paper pulp with xylanase produced by *Trichoderma asperellum*', *3 Biotech*, 7(4), pp. 1–9.

- Srivastava, K. K., Verma, P. K. and Srivastava, R. (1999) 'A recombinant cellulolytic *Escherichia coli*: Cloning of the cellulase gene and characterization of a bifunctional cellulase', *Biotechnology Letters*, 21(4), pp. 293–297.
- Strauss, M. L. A. *et al.* (2001) 'Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non- *Saccharomyces* wine yeasts', *Journal of applied microbiology*, 91, pp. 182–190.
- Sun, Y. and Cheng, J. (2002) 'Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production : a review q', *Bioresource technology*, 83(1), pp. 1–11.
- Suto, M. *et al.* (2002) 'Endophytes as producers of xylanase', *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 93(1), pp. 88–90.
- Sweeney, M. D. and Xu, F. (2012) 'Biomass Converting Enzymes as Industrial Biocatalysts for Fuels and Chemicals: Recent Developments', *Catalysts*, 2(4), pp. 244–263.
- Talia, P. *et al.* (2012) 'Biodiversity characterization of cellulolytic bacteria present on native Chaco soil by comparison of ribosomal RNA genes', *Research in Microbiology*, 163(3), pp. 221–232.
- Taniguchi, H. (2004) 'Carbohydrate Research and Industry in Japan and the Japanese Society of Applied Glycoscience', *Starch - Stärke*, pp. 1-5.
- Teather, R. M. and Wood, P. J. (1982) 'Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen', *Applied and Environmental Microbiology*, 43(4), pp. 777–780.
- Tenkanen, M. and Siika-aho, M. (2000) 'An alpha-glucuronidase of *Schizophyllum commune* acting on polymeric xylan.', *Journal of biotechnology*, 78(2), pp. 149–161.
- Terrasán, C. R. F., Guisan, J. M. and Carmona, E. C. (2016) 'Xylanase and  $\beta$ -xylosidase from *Penicillium janczewskii*: Purification, characterization and hydrolysis of substrates', *Electronic Journal of Biotechnology*, 23, pp. 54–62.
- Thite, V. S. and Nerurkar, A. S. (2015) 'Xylanases of *Bacillus* spp. isolated from ruminant dung as potential accessory enzymes for agro-waste saccharification', *Letters in Applied Microbiology*, 60(5), pp. 456–466.
- Timell, T. E. (2004) *Association between Lignin and Carbohydrates in Wood and other Plant Tissues, Forestry*. New York: Springer.
- Torres, A. L. *et al.* (2000) 'Effect of a novel enzyme on fibre morphology during ECF bleaching of oxygen delignified Eucalyptus kraft pulps', *Bioresource Technology*, 74, pp. 135-140.
- Uhliaríkova, I. *et al.* (2013) 'Positional specificity of acetylxylan esterases on natural polysaccharide: an NMR study.', *Biochimica et biophysica acta*, 1830(6), pp. 3365–3372.
- Urzi, C. *et al.* (1999) 'Intra-specific diversity of *Aureobasidium pullulans* strains isolated from rocks and other habitats assessed by physiological methods and by random amplified polymorphic DNA (RAPD).', *Journal of microbiological methods*, 36(1–2), pp. 95–105.

- Vaaje-Kolstad, G. *et al.* (2010) 'An oxidative enzyme boosting the enzymatic conversion of recalcitrant polysaccharides', *Science*, 330(6001), pp. 219–222.
- Valls, C. *et al.* (2011) 'Performance of new and commercial xylanases for ECF and TCF bleaching of eucalyptus kraft pulp', *Wood Science and Technology*, 45(3), pp. 433–448.
- de Vargas Andrade, S. *et al.* (2004) 'Effect of carbon source on the biochemical properties of  $\beta$ -xylosidases produced by *Aspergillus versicolor*', *Process Biochemistry*, 39(12), pp. 1931–1938.
- Vega, B. *et al.* (2015) 'Advances in Sugar-based Polymers: Xylan and its Derivatives for Surface Modification of Pulp Fibres', *Biomass Sugars for Non-Fuel Applications*, (44), pp. 134–158.
- Vega, B. (2017) *Fibre surface engineering using polysaccharide derivatives*. Åbo Akademi University.
- Ventorino, V. *et al.* (2015) 'Exploring the microbiota dynamics related to vegetable biomasses degradation and study of lignocellulose-degrading bacteria for industrial biotechnological application', *Scientific Reports*, 5, pp. 1–13.
- Vermelho, A. B. and Couri, S. (eds) (2013) *Methods to Determine Enzymatic Activity*. Bentham Books. Available at: <https://ebooks.benthamscience.com/book/9781608053001/chapter/118256/>.
- Villares, A. *et al.* (2017) 'Lytic polysaccharide monooxygenases disrupt the cellulose fibers structure', *Scientific Reports*, 7, pp. 1–9.
- Vlasenko, E. *et al.* (2010) 'Substrate specificity of family 5, 6, 7, 9, 12, and 45 endoglucanases', *Bioresource technology*, 101(7), p. 2405–2411.
- Vyas, S. and Chhabra, M. (2017) 'Isolation, identification and characterization of *Cystobasidium oligophagum* JRC1: A cellulase and lipase producing oleaginous yeast', *Bioresource Technology*, 223, pp. 250–258.
- Wang, L. *et al.* (2013) 'Xylitol fermentation using hemicellulose hydrolysate prepared by acid pre-impregnated steam explosion of corncob', *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 88(11), pp. 2067–2074.
- Wang, W. *et al.* (2016) 'Biochemical and Structural Characterization of a Five-domain GH115 alpha-Glucuronidase from the Marine Bacterium *Saccharophagus degradans* 2-40T.', *The Journal of biological chemistry*, 291(27), pp. 14120–14133.
- Watanabe, T. *et al.* (2015) 'Simultaneous bioethanol distillery wastewater treatment and xylanase production by the phyllosphere yeast *Pseudozyma antarctica* GB - 4 ( 0 )', *AMB Express*, 5, pp. 1–9.
- Weisburg, W. G. *et al.* (1991) '16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study', *Journal of Bacteriology*, 173(2), pp. 697–703.
- Werpy, T. and Petersen, G. (2004) *Top Value Added Chemicals from Biomass Volume I — Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas Top Value Added Chemicals From Biomass Volume I : Results of Screening for Potential Candidates, Program*. Available at: <http://www.osti.gov/bridge%00Aavailable>.

Wertz, J.-L., Bédué, O. and Mercier, J. P. (2010) *Cellulose Science and Technology*. Lausanne: EPFL Press.

Wingfield, P. T. (2001) 'Protein Precipitation Using Ammonium Sulfate', *Current protocols in protein science / editorial board, John E. Coligan ... [et al.]*, p. Appendix-3F.

Wu, Y. *et al.* (2017) 'Comparison of several ethanol productions using xylanase, inorganic salts, surfactant', *2nd International Conference on Advances in Energy Resources and Environment Engineering, IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science 59 (2017) 012048*, 59(1), pp. 427–436.

Xiong, L. *et al.* (2016) 'The ACEII recombinant *Trichoderma reesei* QM9414 strains with enhanced xylanase production and its applications in production of xylitol from tree barks', *Microbial Cell Factories*. BioMed Central, 15(1), pp. 1–18.

Yan, Z. *et al.* (2015) 'Lignin relocation contributed to the alkaline pretreatment efficiency of sweet sorghum bagasse', *Fuel*, 158, pp. 152–158.

Yang, W. *et al.* (2017) 'Improved thermostability of an acidic xylanase from *Aspergillus sulphureus* by combined disulphide bridge introduction and proline residue substitution', *Scientific Reports*, 7(1), p. 1587.

Yoon, L. W. *et al.* (2014) 'Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production', *Biomass and Bioenergy*, 67, pp. 319–338.

Zaferanloo, B. *et al.* (2014) 'Amylase production by *Preussia minima*, a fungus of endophytic origin: Optimization of fermentation conditions and analysis of fungal secretome by LC-MS', *BMC microbiology*, 14(1), pp. 55–67.

Zaide, G. *et al.* (2001) 'Biochemical characterization and identification of catalytic residues in alpha-glucuronidase from *Bacillus stearothermophilus* T-6.', *European journal of biochemistry*, 268(10), pp. 3006–3016.

Zhang, H. and Sang, Q. (2015) 'Production and extraction optimization of xylanase and b-mannanase by *Penicillium chrysogenum* QML-2 and primary application in saccharification of corn cob', *Biochemical Engineering Journal*, 97, pp. 101–110.

## 12.1. Composición de medios de cultivo

Todos los medios de cultivo se esterilizaron por autoclave durante 15 minutos a 121 °C.

### TSB

Tryptic Soy Broth (Difco™)	30 g
Xilano de haya (Sigma Aldrich) / Carboximetilcelulosa (comercial)	5 g (para aislamiento y cribado cuantitativo) 10 g (para estudios de producción enzimática)
Agua destilada	c.s.p. 1 litro

### TSA

Tryptic Soy Agar (Merck)	40 g
Agua destilada	c.s.p. 1 litro

### PDB

Potato Dextrose Broth (Difco™)	24 g
Xilano de haya (Sigma Aldrich) / Carboximetilcelulosa (comercial)	5 g (para aislamiento y cribado cuantitativo) 10 g (para estudios de producción enzimática)
Agua destilada	c.s.p. 1 litro

### PDA

Potato Dextrose Agar (OXOID)	39 g
Agua destilada	c.s.p. 1 litro

### YNB + Polímero comercial

Yeast Nitrogen Base (Difco™)	6.7 g
Xilano de haya (Sigma Aldrich) / Carboximetilcelulosa (comercial)	5 g (para aislamiento y cribado cuantitativo) 10 g (para estudios de producción enzimática)
Agua destilada	c.s.p. 1 litro

### YNB + Polímero comercial AGAR

Yeast Nitrogen Base (Difco™)	6.7 g
Xilano de haya (Sigma Aldrich) / Carboximetilcelulosa (comercial)	5 g (para aislamiento y cribado cuantitativo) 10 g (para estudios de producción enzimática)
Agar (Difco™)	15 g
Agua destilada	c.s.p. 1 litro

### M9 + Polímero comercial

#### Solución A

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	64 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	15 g
NaCl	2.5 g
NH <sub>4</sub> Cl	5.0 g
Agua	c.s.p. 1 litro

Sales para mezclar con Solución A luego de esterilizada

MgSO <sub>4</sub> 1M	1 ml
CaCl <sub>2</sub> 1M	100 µl
Tiamina 1 %	500 µl

### M9 + Polímero comercial AGAR

#### Solución A

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	64 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	15 g
NaCl	2.5 g
NH <sub>4</sub> Cl	5.0 g
Agua destilada	c.s.p. 0.5 litro

Agar (Difco™)	15 g
Agua destilada	c.s.p. 0.5 litro

Luego de esterilizar ambas soluciones y que se enfríen a 50 °C, se mezclan en condiciones asépticas.

Sales para mezclar con Solución A (esterilizadas por filtro esterilizante 0.22 mm)

MgSO <sub>4</sub> 1M	1 ml
CaCl <sub>2</sub> 1M	100 µl
Tiamina 1 %	500 µl

### CZAPEK-DOX

NaNO <sub>3</sub>	7.65 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.04 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1.52 g
KCl	1.52 g
Xilano de haya (Sigma Aldrich) / Carboximetilcelulosa (comercial) / material vegetal	10 g (para estudios de producción enzimática)
Agua destilada	c.s.p. 1 litro

### CZAPEK-DOX modificado

NaNO <sub>3</sub>	7.65 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.04 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1.52 g
KCl	1.52 g
Bactopeptona (Difco™)	5 g
Extracto de levadura (Difco™)	1 g
Xilano de haya (Sigma Aldrich) / Carboximetilcelulosa (comercial) / material vegetal	10 g (para estudios de producción enzimática)
Agua destilada	c.s.p. 1 litro

### YPX

Extracto de levadura (Difco™)	10 g
Bactopeptona (Difco™)	20 g
Xilosa (Sigma-Aldrich)	30 g
Agua destilada	c.s.p. 1 litro

## 12.2. Soluciones y buffers

---

### Solución de Rojo Congo 0.1 %

Rojo Congo (Sigma Aldrich) pureza 35 %	2.9 g
Agua destilada	1 litro

### Solución reveladora de Rojo Congo

#### Solución de NaCl 1M

NaCl	58.3 g
Agua destilada	1 litro



### Buffer citrato 0.05 M pH 4.8

Solución Stock 1M

Ácido cítrico monohidrato	210 g
Agua destilada	750 ml
NaOH hasta pH 4.3	50 a 60 g
Agua destilada	c.s.p. llevar a 1 litro

Diluir hasta 1 litro, medir pH. Si fuera necesario se agrega más NaOH hasta llegar a pH 4.5. Para obtener la solución de molaridad 0.05M diluir con agua destilada y medir pH, debería tener un valor de 4.8 sino ajustar.

### Solución de Ácido di-nitro-salicílico (DNS)

Mezclar:

Agua Destilada	1416 ml
Ácido dinitrosalicílico (Sigma Aldrich)	10.6 g
NaOH (Fluka)	19.8 g

Disolver lo anterior y agregar:

Tartrato de sodio potasio	306 g
Fenol	7.6 ml
Metabisulfito de sodio	8.3 ml

### Buffers para actividad óptima

Se realizaron según procedimiento de "Guide to Protein Purification - Methods in Enzymology" (Deutscher, 1990).

## 12.3. Curvas de calibración

A partir de estándares comerciales de los diferentes productos se preparan soluciones de concentración conocidas. Se correlacionan las concentraciones en mg/ml o g/l de las diferentes soluciones y la absorbancia o el área obtenida en los diferentes cromatogramas en HPLC en las condiciones de ensayo utilizadas.

### 12.3.1. Curvas de calibración con el método DNS

Las curvas utilizadas se realizaron en iguales condiciones en las que se midió actividad.

En un tubo de ensayo se agregaron:

- 0.5 ml solución de glucosa o xilosa de concentraciones conocidas
- 1.0 ml buffer citrato 0.05 M, pH 4.8

Se agregaron 3.0 ml de solución de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (descrito en el anexo 12.2), se hirvieron en baño a 100 °C durante 5 minutos, luego se enfriaron con un baño de agua - hielo. Se toma 1 ml de solución (previa homogenización) y se agregan 4 ml de agua destilada y se mide la absorbancia a 540 nm.

#### Últimas curvas

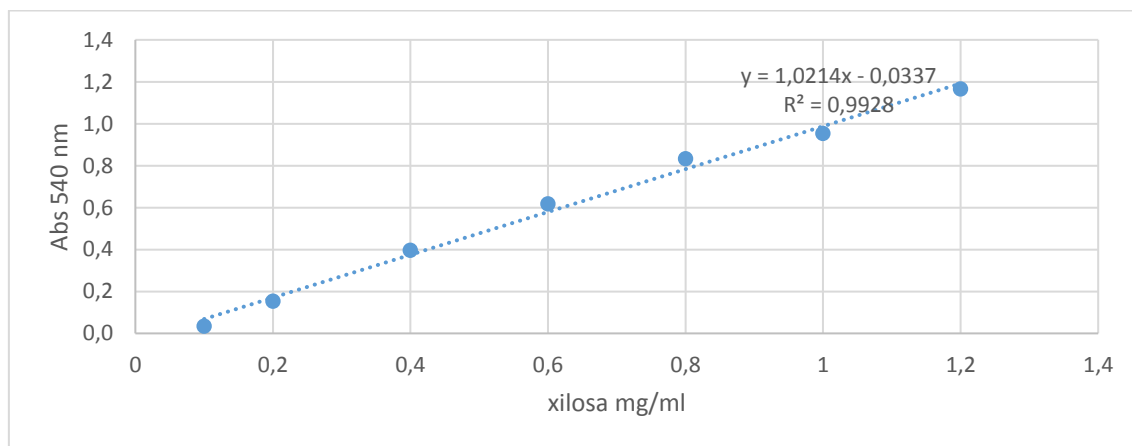


Figura 75- Curva de calibración de xilosa

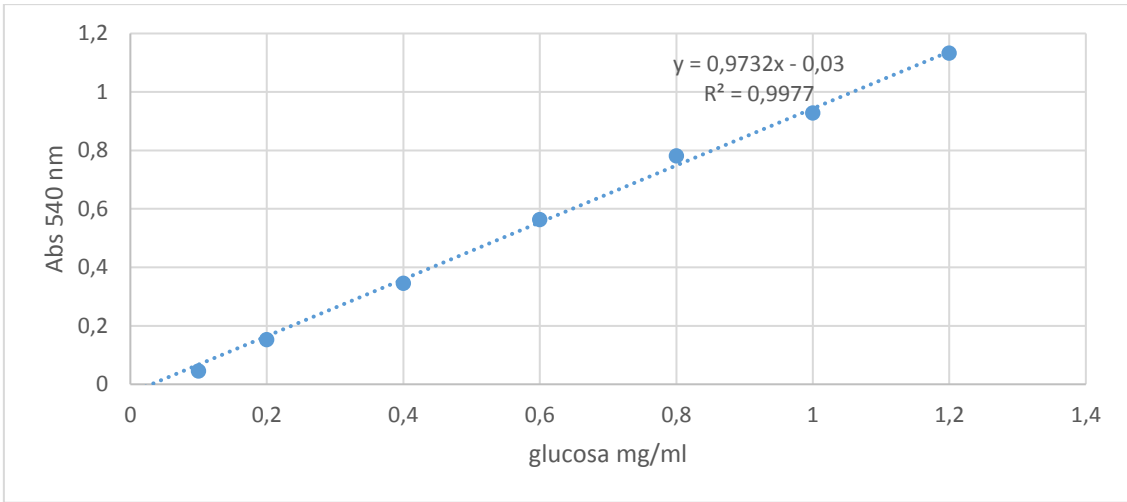


Figura 76- Curva de calibración de glucosa

### 12.3.2. Curvas de calibración por HPLC: columna Supelcogel™ C610H

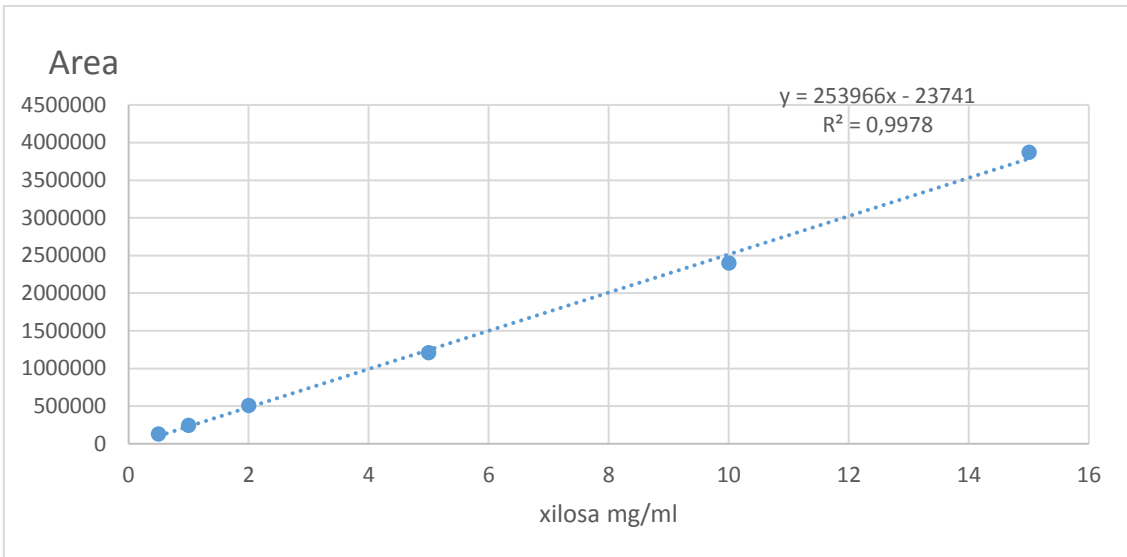


Figura 77- Curva de calibración de xilosa columna Supelcogel™ C610H

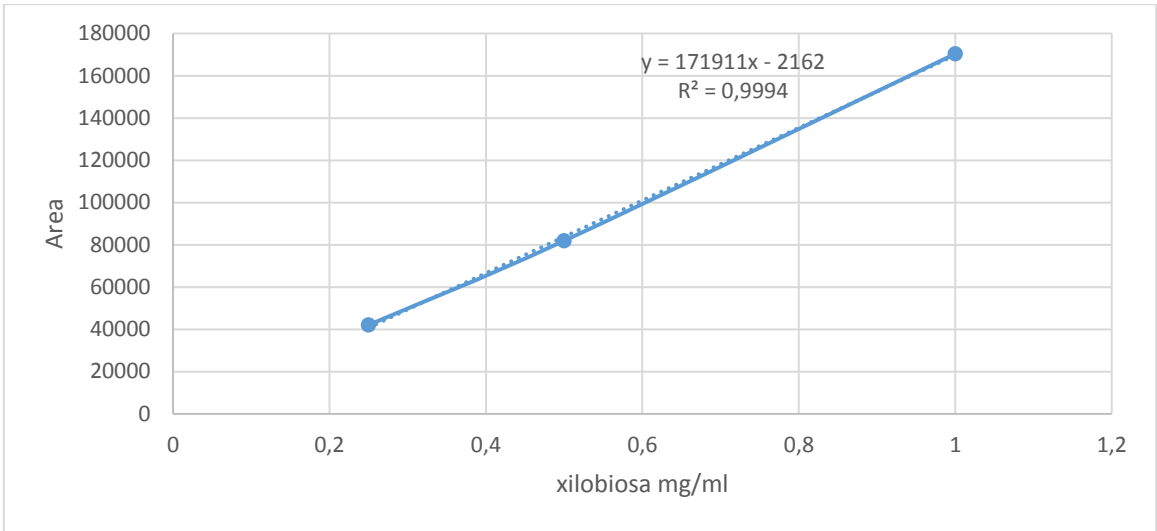


Figura 78- Curva de calibración de xilobiosa columna SupelcogelTM C610H

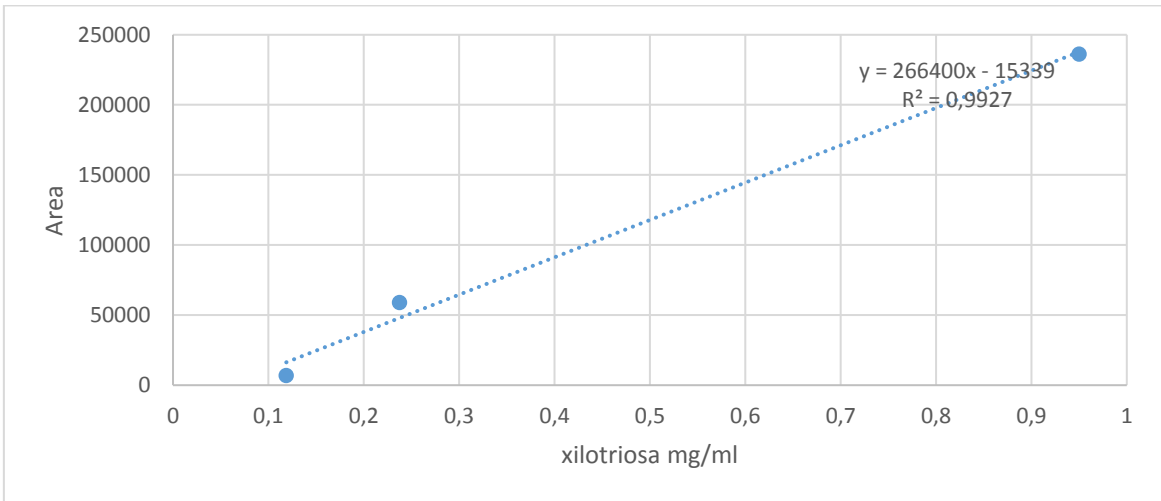


Figura 79- Curva de calibración de xilotriosa columna SupelcogelTM C610H

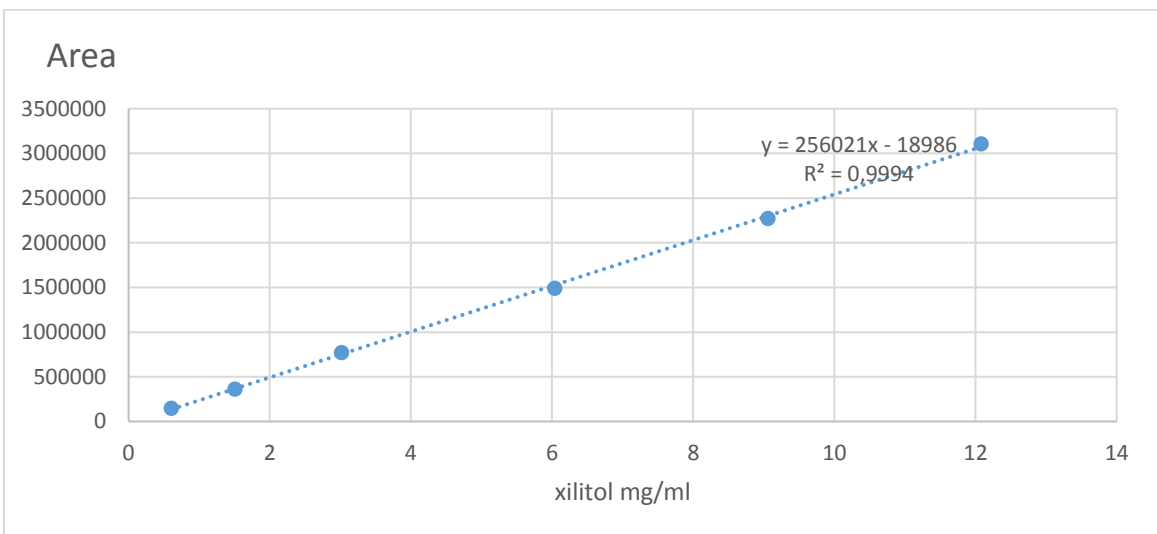


Figura 80- Curva de calibración de xilitol columna SupelcogelTM C610H

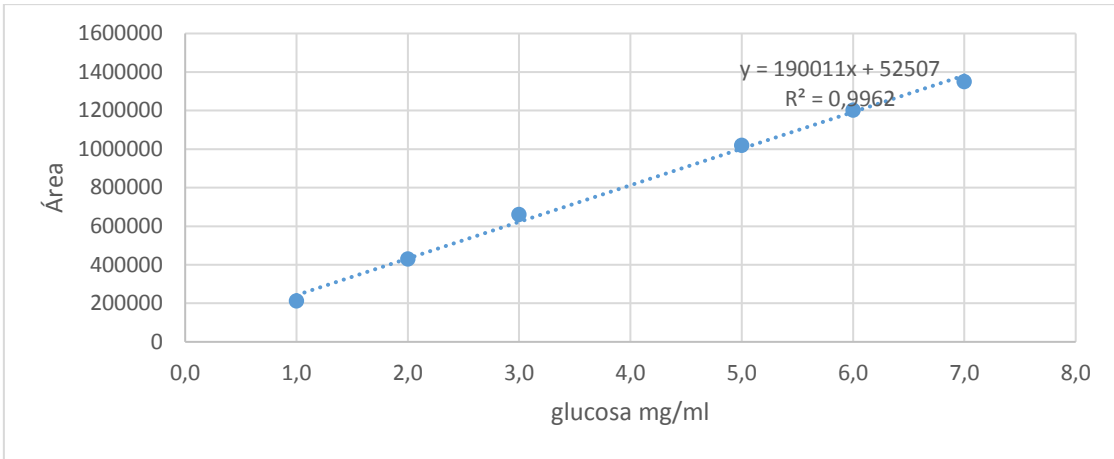


Figura 81- Curva de calibración de glucosa columna Supelcogel™ C610H

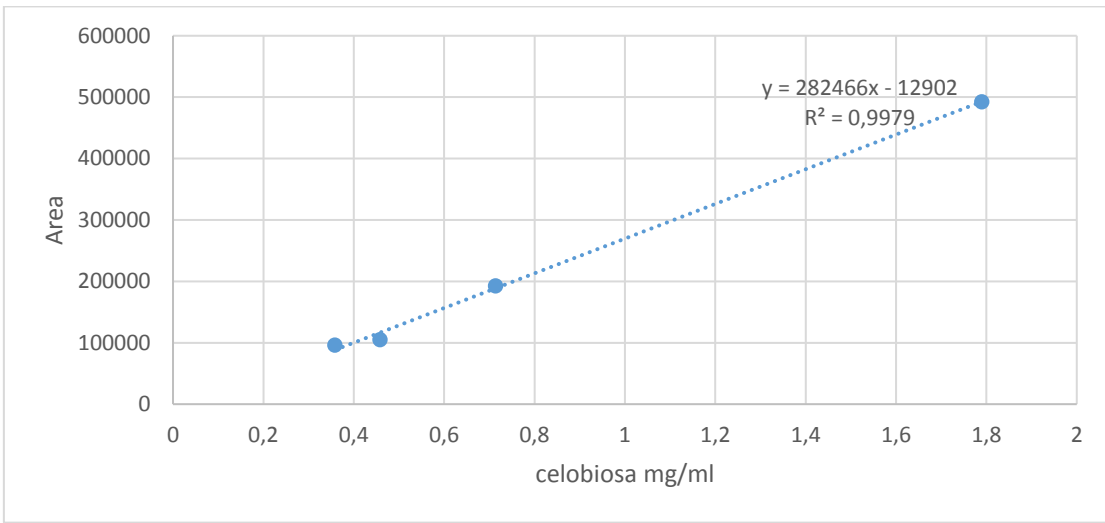


Figura 82- Curva de calibración de celobiosa columna Supelcogel™ C610H

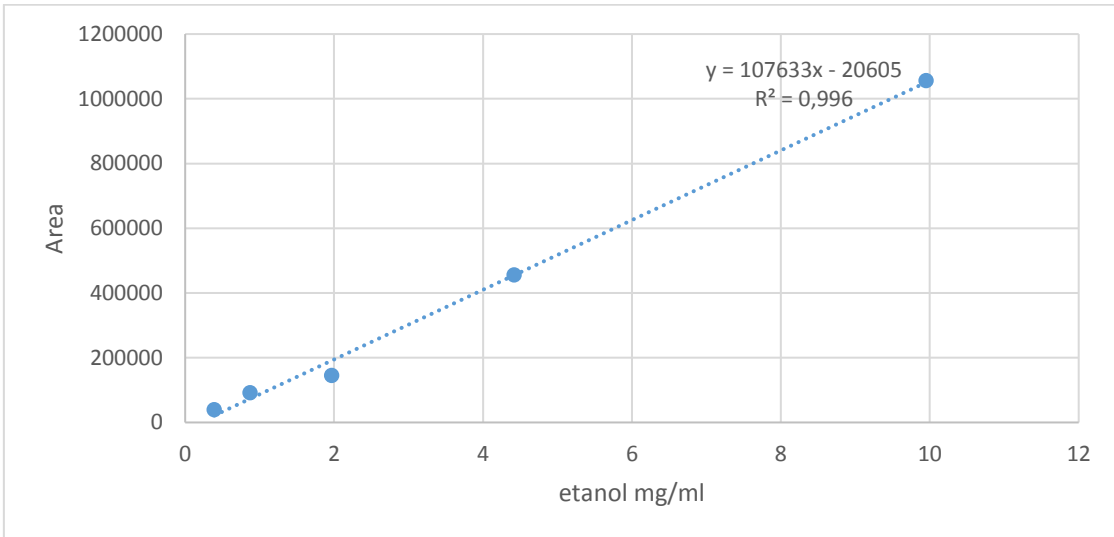


Figura 83- Curva de calibración de etanol columna Supelcogel™ C610H

### 12.3.3. Curvas de calibración por HPLC: columna Supelcogel™ Pb

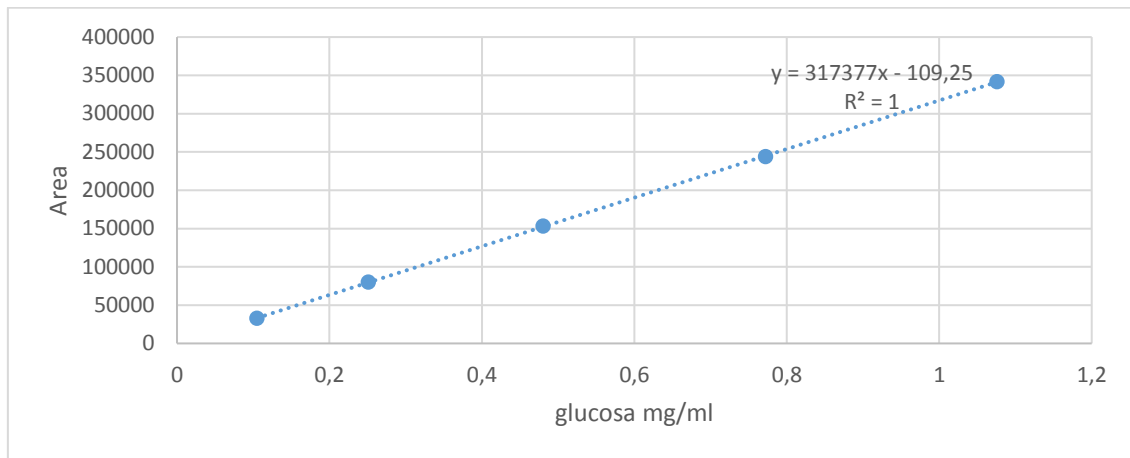


Figura 84- Curva de calibración de glucosa columna Supelcogel™ Pb

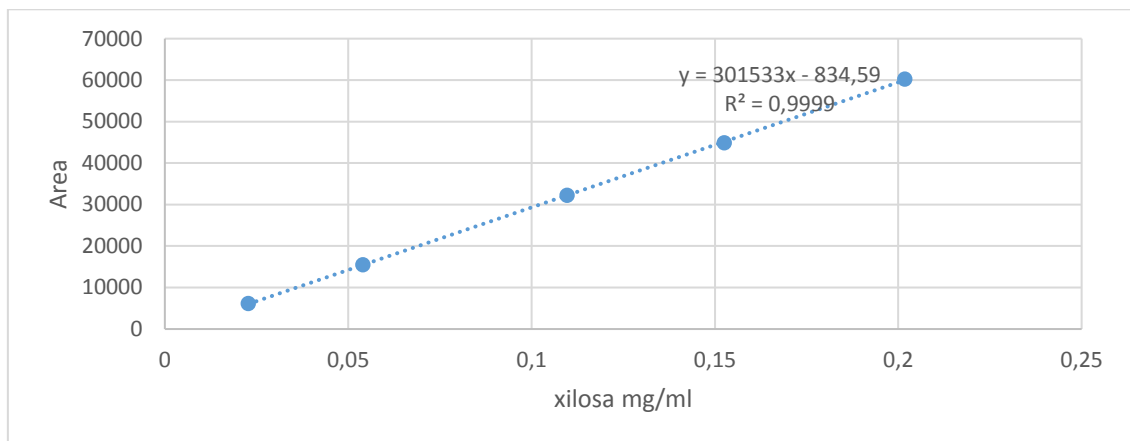


Figura 85- Curva de calibración de xilosa columna Supelcogel™ Pb

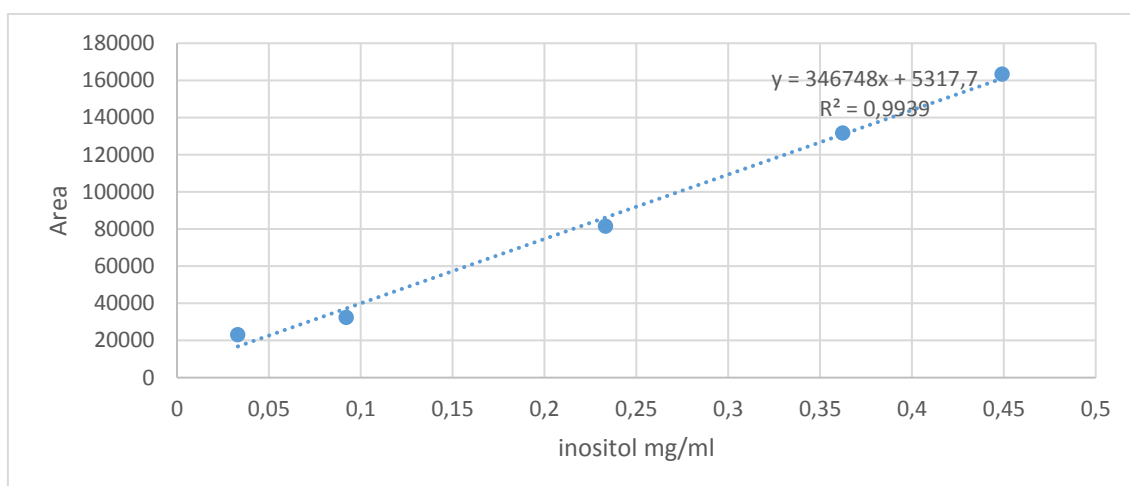


Figura 86- Curva de calibración de inositol columna Supelcogel™ Pb

### 12.3.4. Curva de pesos moleculares de proteínas por Gel filtración - columna Superdex™ 75 10/300 GL

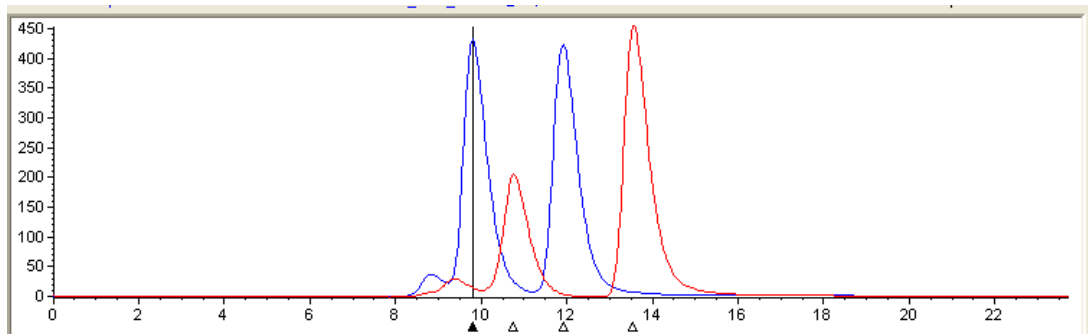


Figura 87- Cromatograma

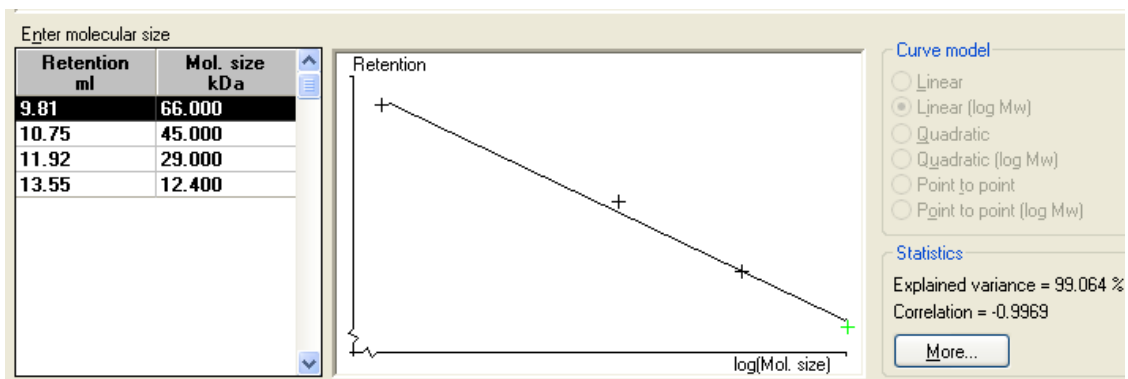


Figura 88- Curva de calibración

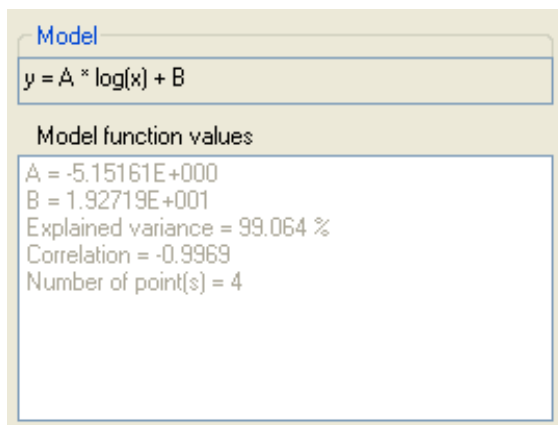


Figura 89- Modelo matemático

## 12.4. Preparación de material lignocelulósico y análisis de composición química

---

### 12.4.1. Preparación de corteza libre de extractivos

Se llevó a cabo siguiendo los procedimientos ligeramente modificados de “Preparation of Samples for Compositional Analysis” (NREL/TP-510-42620) (Hames *et al.*, 2008) y “Determination of Extractives in Biomass” (NREL/TP-510-42619) (Sluiter *et al.*, 2008).

Una vez obtenido el material vegetal se secó durante 12 horas en una estufa a  $45 \pm 3^\circ\text{C}$  y se guardó en un contenedor hermético a temperatura ambiente. Se molió la muestra con un molino de palas modelo SK 100 (Retsch®) el tamaño de partícula obtenido está comprendido entre 150 y 600  $\mu\text{m}$ . Al realizar los análisis de composición química se realizó siempre la medida de humedad para corregir los resultados.

#### Corteza libre de extractivos

Se armó un cartucho para Soxhlet con papel de filtro y 10 gramos de material vegetal molido. Se reflujoó con 300 ml de acetona comercial durante 6 horas en un aparato de Soxhlet. Una vez finalizado el tiempo, se apagó la manta eléctrica y se dejó enfriar. Se removió el cartucho, y se lavó con agua destilada.

El material anterior se hirvió con agua destilada durante 1 hora. Se filtró, se lavó y se secó a temperatura ambiente. La corteza libre de extractivos se guardó en un contenedor hermético hasta su uso.

### 12.4.2. Análisis de la composición química del material lignocelulósico

Se realizó siguiendo el procedimiento “Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass” (NREL/TP-510-42618) (Sluiter *et al.*, 2012) con pequeñas modificaciones. Todas las muestras se analizaron por duplicado.

#### 12.4.2.1. Procedimiento de hidrólisis

Se pesaron  $300,0 \pm 10,0$  mg de la muestra en un tubo previamente tarado. Se añadieron  $3,00 \pm 0,01$  mL (o  $4,92 \pm 0,01$  g) de ácido sulfúrico al 72% a cada tubo de presión. Se agitó con una varilla de vidrio para mezclar, durante un minuto, o hasta que la muestra se mezcló a fondo. Se colocó el tubo tapado con papel de aluminio, en un baño de agua (LAB-LINE, Modelo 18102A-1CEQ, Thermo Scientific) ajustado a  $30 \pm 3^\circ\text{C}$  y se incubó la muestra durante  $60 \pm 5$  minutos. Utilizando la varilla de agitación se agitó la muestra cada



5 a 10 minutos sin retirar la muestra del baño. La agitación es esencial para asegurar un contacto entre ácido y el material para obtener una hidrólisis uniforme.

Una vez completados los 60 minutos, se retiraron los tubos del baño de agua. Se diluyó el ácido a una concentración del 4% añadiendo  $84.00 \pm 0.04$  ml de agua destilada, pasando el contenido del tubo a un Schott de 250 ml previamente pesado. Se tapó, se mezcló la muestra para eliminar la separación de fases. Se colocaron los tubos en el autoclave. Se autoclavaron las muestras selladas durante una hora a  $121^\circ\text{C}$ . Después de completar el ciclo de autoclave, se dejaron que los hidrolizados se enfriaran lentamente a temperatura ambiente antes de retirar las tapas. En este momento se agregó un volumen conocido de estándar interno (Inositol (Sigma-Aldrich) 20 g/l). Se volvió a pesar los Schott con el volumen de hidrolizado más el estándar agregado.

#### 12.4.2.2. Análisis de lignina soluble e insoluble en ácido:

Se filtró a vacío la solución de hidrólisis a través de un filtro de vidrio previamente pesado (Schott). El filtrado se recogió y se transfirió una alícuota de 4 ml a un matraz aforado que se completó con agua destilada para medir la lignina soluble a 205 nm habiendo realizado un blanco con agua.

Otra alícuota del hidrolizado se utilizó para determinar los carbohidratos, previa neutralización con  $\text{CaCO}_3$  (Sigma-Aldrich).

Los sólidos que quedan en el crisol filtrante (lignina insoluble) se enjuagaron con un mínimo de 50 ml de agua destilada. Se secó el crisol durante 24 horas hasta que se alcanzó un peso constante a  $105^\circ\text{C}$ . Al retirar las muestras del horno, se dejaron enfriar en un desecador. Se registró el peso del Crisol.

#### 12.4.2.3. Análisis de carbohidratos estructurales.

Se neutralizaron 10 ml del hidrolizado con carbonato de calcio hasta pH 5-6. Se dejó decantar, se tomó 1 ml del neutralizado, se centrifugó y se diluyó al 25%. Se prepararon estándares de glucosa, xilosa e inositol (Sigma Aldrich) (también se diluyeron al 25%).

Se analizaron las muestras en un HPLC Shimadzu LC – 20AT utilizando las siguientes condiciones:

Columna: Supelcogel™-Pb (Sigma-Aldrich) junto con su pre-columna Supelguard™ C610H (Sigma Aldrich).

Volumen de inyección: 20  $\mu\text{L}$

Fase móvil: Agua de grado HPLC, 0.45  $\mu\text{m}$  filtrada y desgasificada

Velocidad de flujo: 0,5 ml / minuto

Temperatura de la columna: 85 ° C

Detector: índice de refracción (Shimadzu RID – 10AT)

Tiempo de corrida: 30 minutos

#### 12.4.2.4. Cálculo de humedad, glucanos, xilanos y lignina soluble e insoluble

Humedad:

$$\% H = \left( \frac{(m \text{ (muestra húmeda)} - m \text{ (muestra seca)})}{m \text{ muestra húmeda}} \right) \times 100$$

Las masas utilizadas para la hidrólisis se corrigen luego por el %H al hacer los cálculos.

Lignina insoluble (%LI):

$$\% LI = \left( \frac{(m \text{ (filtro + lignina insoluble)} - m \text{ (filtro)})}{m \text{ material sin humedad}} \right) \times 100$$

Lignina soluble (%LS):

$$\% LS = \left( \frac{(Abs \text{ 205 nm corr.} \times (\text{Volumen del hidrolizado}) \times (Fdil))}{\epsilon \times m \text{ material sin humedad} \times \text{camino óptico}} \right) \times 100$$

- Abs 205 nm corr. = Absorbancia corregida a 205 nm.
- Volumen del hidrolizado (L) =  $\frac{m \text{ hidrolizado}}{1000}$
- Fdil = factor de dilución al medir al UV =  $\frac{100}{4}$
- $\epsilon$  = Absortividad a 205 nm = 110 L / g cm
- camino óptico = 1 cm

Carbohidratos (expresados como % glucanos y xilanos)

$$\% \text{ carbohidrato} = ((m \text{ inositol} / \text{concentración inositol}) \times \text{concentración de glucosa} \times \text{corrección por azúcar polimérico}) \times (100 / (1000 \times \text{masa sin humedad}))$$

- m inositol = masa en mg de inositol agregada al hidrolizado
- concentración inositol = en mg / ml obtenida de la interpolación del área del cromatograma en la curva de calibración
- concentración glucosa = en mg / ml obtenida de la interpolación del área del cromatograma en la curva de calibración

- corrección por azúcar polimérico = 0.9 para glucanos y 0.88 para xilanos

## 12.5. Hoja del depósito de cepa *Pseudozyma* sp. EBV 97-87

### COLECCIÓN ESPAÑOLA DE CULTIVOS TIPO (CECT)



Parc Científic Universitat de València  
Catedrático Agustín Escardino, 9  
46980 Paterna (Valencia). España  
Tel.: +34 96 354 46 12  
<http://www.cect.org>



### CERTIFICATE OF DEPOSIT

Paterna, July the 20th 2018

*Pseudozyma* sp.  
strain EBV97-87 was deposited in the CECT by

Emiliana Botto

Universidad de la República - Uruguay. Facultad de Química

Uruguay

on 06-06-2018

and was accessioned CECT 13162



This strain has been checked for viability, purity and authenticity in the CECT facilities and it has been preserved using standard methods. It is publically available without restrictions for research and academic purposes.

## 12.6. Medida de proteína - Protocolo de reactivo de Bradford (Sigma-Aldrich)

**SIGMA-ALDRICH®**

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 USA  
Tel: (800) 521-8956 (314) 771-5765 Fax: (800) 325-5052 (314) 771-5757  
email: techservice@sial.com sigma-aldrich.com

### Product Information

#### Bradford Reagent

Catalog Number **B6916**

Storage Temperature 2–8 °C

### TECHNICAL BULLETIN

#### Product Description

The Bradford Reagent can be used to determine the concentration of proteins in solution. The procedure is based on the formation of a complex between the dye, Brilliant Blue G, and proteins in solution. The protein-dye complex causes a shift in the absorption maximum of the dye from 485 to 595 nm. The amount of absorption is proportional to the protein present.<sup>1</sup> The Bradford Reagent requires no dilution and is suitable for micro, multiwell plate, and standard assays. The linear concentration range is 0.1–1.4 mg/ml of protein, using BSA (bovine serum albumin) as the standard protein.

The Bradford Reagent is compatible with reducing agents. Reducing agents are often used to stabilize proteins in solution. Other protein assay procedures (Lowry and BCA) are not compatible with reducing agents. The Bradford Reagent should be used in place of these protein assays if reducing agents are present. However, the Bradford Reagent is only compatible with low concentrations of detergents (see compatibility chart). If the protein sample to be assayed has detergent(s) present in the buffer, it is suggested to use the BCA protein determination procedure.

#### Reagent

The product consists of Brilliant Blue G in phosphoric acid and methanol. The 500 ml package is sufficient to perform at least 160 standard 3.1 ml assays.

#### Reagents and Equipment Required Depending on Assay Format Used

- Spectrophotometer capable of measuring absorbance in the 595 nm region.
- 96 well plates, Catalog Number CLS9017
- 96 well plate sealing film, Catalog Number Z369867
- Test tubes, 13 × 100 mm, Catalog Number CLS980013
- 3 ml Disposable Plastic Cuvettes, Catalog Number C5291
- 1 ml Disposable Plastic Cuvettes, Catalog Number C5416

- Protein Standard (BSA) Solution, (2 mg/ml), Catalog Number P0834
- Protein Standard (BSA) Solution, (1 mg/ml), Catalog Number P0914, if lower concentrations of protein are to be measured.

#### Precautions and Disclaimer

This product is for R&D use only, not for drug, household, or other uses. Please consult the Material Safety Data Sheet for information regarding hazards and safe handling practices.

#### Storage/Stability

The product is stored at 2–8 °C. It is stable at 2–8 °C in an unopened container for at least 1 year.

#### Procedure

The standard 3.1 ml Bradford assay consists of mixing 1 part of the protein sample with 30 parts of the Bradford Reagent. The sample may be a blank, a protein standard, or an unknown sample. The blank consists of buffer with no protein. The protein standard consists of a known concentration of protein, and the unknown sample is the solution to be assayed.

Bradford assays are routinely performed at room temperature. Color development begins immediately. The absorbance at 595 nm is recorded and the protein concentration is determined by comparison to a standard curve.

There are three protocols and it is suggested a new user try the standard 3.1 ml assay protocol first. The micro assay is for samples with low protein concentrations. The 96 well plate assay is for those who wish to perform the Bradford assay in plate format.

**A. Standard 3.1 ml Assay Protocol**

*(0.1 ml of a 0.1–1.4 mg/ml protein sample is used)*

This assay is performed in test tubes. The assay uses 0.1 ml of the protein sample and 3 ml of the Bradford Reagent per tube. It is possible to do an assay directly in a cuvette by adding just 1.5 ml of Bradford Reagent to 0.05 ml of sample.

**Note:** It is necessary to create a standard curve during each assay, regardless of the format used.

1. Gently mix the Bradford Reagent in the bottle and bring to room temperature.
2. Prepare protein standards of appropriate concentrations in the same buffer as the unknown samples. The standards should be created by serially diluting either the 2 mg/ml or 1 mg/ml BSA protein standard (Table 1). Deionized water may be substituted for the buffer, but any interference due to buffer components will not be compensated for in the protein standards. The protein standards can range from 0.1–1.4 mg/ml. Create a standard assay table similar to Table 1.

**Table 1.****Example of Standard Assay Set Up Table**

For protein samples with unknown concentrations, it may be necessary to prepare a dilution scheme to ensure the concentration is within the linear range of 0.1–1.4 mg/ml. Tube 6 represents an unknown sample with a 2-fold dilution. Researchers must determine their own dilution schemes based on their estimation of the concentration of each unknown sample.

Tube No.	Sample (ml)	[BSA] protein standard (mg/ml)	Bradford Reagent (ml)
1	0.1	0	3
2	0.1	0.25	3
3	0.1	0.5	3
4	0.1	1.0	3
5	0.1	1.4	3
6	0.1	(unknown)	3

Use either the 1 mg/ml standard (Catalog Number P0914) or the 2 mg/ml standard (Catalog Number P0834) to create the protein standards. Each tube should contain 0.1 ml of a known standard, blank (buffer only), or unknown sample.

3. After adding 3 ml of Bradford Reagent to each tube, they should be vortexed gently for thorough mixing. The total liquid volume in each tube is 3.1 ml.
4. Let the samples incubate at room temperature for 5–45 minutes.
5. Transfer the samples into cuvettes.
6. Measure the absorbance at 595 nm. The protein-dye complex is stable up to 60 minutes. The absorbance of the samples must be recorded before the 60 minute time limit and within 10 minutes of each other.
7. Determine the protein concentration by comparison of the unknown samples to the standard curve prepared using the protein standards (Table 2 and Graph 1).

**Table 2.****Example of Assay Data Table**

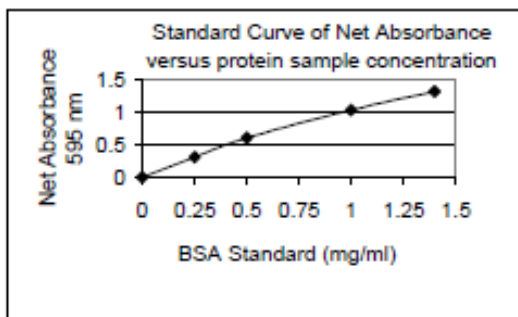
Create a table with the absorbance results obtained from the assay.

**Note:** The data below should not be used as a replacement of a standard curve. The absorbance of the BSA protein standards (Tubes 1–5) in each assay will differ from those presented here.

Tube No.	$A_{595}$	Net $A_{595}$	[Protein] per Assay (mg/ml)	Dilution Factor
1	0.433	0	0	1
2	0.742	0.308	0.25	1
3	1.036	0.602	0.5	1
4	1.463	1.029	1.0	1
5	1.750	1.316	1.4	1
6	1.245	0.811	0.75	2

After obtaining the results, create a standard curve to determine the protein concentration in the unknown sample. Plot the Net Absorbance at 595 nm versus the protein standard concentrations (Tubes 1–5).

**Graph 1.**  
Standard Curve produced from Assay Data



The standard curve indicates the unknown protein sample in test tube 6 (Net  $A_{595} = 0.811$ ) contains 0.75 mg/ml of protein.

The total concentration of protein present in the original unknown protein solution is calculated as follows:

(mg/ml unknown protein sample) times  
(Dilution Factor)  
(0.75 mg/ml)  $\times$  (2) = 1.5 mg/ml of protein

#### B. Micro 2 ml Assay Protocol

(1 ml of a 1–10  $\mu$ g/ml protein sample is used)

The micro assay is used when a large volume (at least 1 ml) of a dilute sample is available for testing. The linear concentration range of this assay is lower than the standard or multiwell plate assays, (1–10  $\mu$ g of total protein in 1 ml).

1. Gently mix the Bradford Reagent in the bottle and bring to room temperature.
2. Prepare protein standards in buffer ranging from 1–10  $\mu$ g/ml using a BSA standard or an equivalent protein standard.
3. Add 1 ml of each protein standard to separate tubes. To the tube used as the blank, add 1 ml of buffer.
4. Prepare the unknown sample(s) with an approximate concentration between 1–10  $\mu$ g/ml. Add 1 ml of each sample to separate tubes.
5. To each tube, add 1 ml of the Bradford Reagent and mix.
6. Let the samples incubate at room temperature for 5–45 minutes.
7. Transfer samples into cuvettes.

8. Measure the absorbance at 595 nm. The protein-dye complex is stable up to 60 minutes. The absorbance of the samples must be recorded before the 60 minute time limit and within 10 minutes of each other.
9. Plot the net absorbance vs. the protein concentration of each standard.
10. Determine the protein concentration of the unknown sample(s) by comparing the Net  $A_{595}$  values against the standard curve.

#### C. 96 Well Plate Assay Protocol

(5  $\mu$ l of a 0.1–1.4 mg/ml protein sample is used)

This assay is performed in a 96 well plate. With this assay it is possible to quickly assay multiple protein samples, while using a small sample volume (5  $\mu$ l). It is also possible to automate your protein determination with this multiwell plate assay.

1. Gently mix the Bradford Reagent in the bottle and bring to room temperature.
2. Prepare protein standards in buffer ranging from 0.1–1.4 mg/ml using a BSA standard or an equivalent protein standard.
3. Add 5  $\mu$ l of the protein standards to separate wells in the 96 well plate. To the blank wells, add 5  $\mu$ l of buffer.
4. Prepare the unknown sample(s) with an approximate concentration between 0.1–1.4 mg/ml.
5. To each well being used, add 250  $\mu$ l of the Bradford Reagent and mix on a shaker for ~30 seconds.
6. Let the samples incubate at room temperature for 5–45 minutes. Then measure the absorbance at 595 nm. The protein-dye complex is stable up to 60 minutes. The absorbance of the samples must be recorded before the 60 minute time limit and within 10 minutes of each other.
7. Plot the net absorbance vs. the protein concentration of each standard.
8. Determine the protein concentration of the unknown sample(s) by comparing the Net  $A_{595}$  values against the standard curve.

**Compatibility Chart**

The concentration listed below is the maximum amount of material, which can be present in the protein sample without causing interference in the standard or 96 well plate assay protocols. Since a larger volume of protein sample is used in the micro assay, the micro assay is compatible with amounts lower than those listed below.

Incompatible Substances	Amount Compatible
<b>Buffer Systems</b>	
ACES, pH 7.8	100 mM
N-Acetylglucosamine in PBS, pH 7.2	100 mM
Bicine, pH 8.4	100 mM
Bis-Tris, pH 6.5	100 mM
Calcium chloride in TBS, pH 7.2	10 mM
CellLytic B™ Reagent	undiluted no interference
CHES, pH 9.0	100 mM
Cobalt chloride in TBS, pH 7.2	10 mM
EPPS, pH 8.0	100 mM
Ferric chloride in TBS, pH 7.2	10 mM
Glycine	100 mM
HEPES, pH 7.5	100 mM
Imidazole, pH 7.0	200 mM
MES (0.1 M), NaCl (0.9%), pH 4.7	undiluted
MES, pH 6.1	100 mM
MOPS, pH 7.2	100 mM
Nickel chloride in TBS, pH 7.2	10 mM
PBS; Phosphate (0.1 M), NaCl (0.15 M), pH 7.2	undiluted
PIPES, pH 6.8	100 mM
Sodium acetate, pH 4.8	180 mM
Sodium bicarbonate	0.1 M
Sodium citrate, pH 4.8 or pH 6.4	200 mM
Sodium Citrate (0.6 M), MOPS (0.1 M), pH 7.5	undiluted
Sodium phosphate	0.1 M
TBS; Tris (25 mM), NaCl (0.15 M), pH 7.8	undiluted
Tricine, pH 8.0	100 mM
Triethanolamine, pH 7.8	100 mM
Tris	2.0 M
Tris (25 mM), Glycine (192 mM), pH 8.0	undiluted
Tris (25 mM), Glycine (192 mM), SDS (0.1%), pH 8.3	1:2 dilution
Zinc chloride in TBS, pH 7.2	10 mM

Incompatible Substances (Continued)	Amount Compatible
<b>Buffer Additives</b>	
Ammonium sulfate	1.0 M
Aprotinin	10 mg/L
Asparagine	10 mM
Cesium bicarbonate	0.1 M
Glucose	1.0 M
Glycerol	10%
Guanidine-HCl	3.5 M
Hydrochloric Acid	0.1 M
Imidazole, pH 7.0	200 mM
Leupeptin	10 mg/L
Phenol Red	0.5 mg/ml
PMSF	1 mM
Sodium azide	0.5%
Sodium chloride	5.0 M
Sodium Hydroxide	0.1 M
Sodium orthovanadate in PBS, 1 mM	1 mM
Thimerosal	0.01%
Sucrose	10%
TLCK	0.1 mg/L
TPCK	0.1 mg/L
Urea 3.0 M	3.0 M
<b>Detergents</b>	
BRIJ®-35	0.125%
BRIJ-52	0.031%
CHAPS	5%
CHAPSO	5%
Deoxycholic acid	0.050%
Nonidet P-40 (IGEPAL® CA-630)	0.5%
SB3-14	0.125%
<b>Detergents</b>	
Octyl β-glucoside	0.5%
Octyl β-thioglucopyranoside	3%
SDS	0.125%
SPAN™ 20	0.5%
TRITON® X-100	<0.1%
TRITON X-114	0.125%
TRITON X-305	0.5%
TRITON X-405	0.5%
TWEEN® 20	0.062%
TWEEN 60	0.1%
TWEEN 80	0.062%



Incompatible Substances (Continued)	Amount Compatible
<b>Chelating agents</b>	
EDTA 100 mM	100 mM
EGTA 2 mM	2 mM
Sodium citrate, pH 4.8 or pH 6.4	200 mM
<b>Reducing &amp; Thiol Containing Agents</b>	
2-Mercaptoethanol	1.0 M
Ascorbic acid	50 mM
Cysteine	10 mM
Dithioerythritol (DTE)	1 mM
Dithiothreitol (DTT)	5 mM
Potassium thiocyanate	3.0 M
<b>Solvents</b>	
Acetone	10%
Acetonitrile	10%
DMF	10%
DMSO	10%
Ethanol	10%
Methanol	10%

**Notes:** This is not a complete compatibility chart. There are many substances that can affect different proteins in different ways. One may assay the protein of interest in deionized water alone, then in buffer with possible interfering substances. Comparison of the readings will indicate if an interference exists. Refer to the literature for additional information on interfering substances.<sup>1-7</sup>

Reagents that change the pH of the assay or contains high levels of detergents will interfere with the Bradford assay.

#### Troubleshooting guide

The absorbance of the unknown protein sample is too high.

1. Make sure there are no interfering substances present in the buffer. Test this by diluting the standard protein samples in the same buffer as the unknown samples.
2. The concentration of protein in the unknown sample may be too high. Dilute the unknown sample(s), accordingly
3. If the volume of the protein sample is small, try using the micro assay procedure or use the QuantiPro™ BCA assay kit (Catalog Number QPBCA).

The protein sample contains incompatible substance(s).

1. If the concentration of the protein sample is high enough, dilute the sample to reduce the level of the interfering substance.

#### Technical Tips

1. Make sure the glassware being used has been cleaned well.
2. Make sure that the Bradford Reagent is at room temperature when performing the assay. Also make sure that the Bradford Reagent is gently mixed.
3. Consider a different protein assay procedure. If certain incompatible substance(s) cannot be removed from the assay, consider the use of the BCA Assay (Catalog Number BCA1).
4. If levels of your protein are too low, try using the QuantiPro BCA Kit (Catalog Number QPBCA).

**References**

1. Bradford, M.M., *Anal. Biochem.*, **72**, 248 (1976).
2. Compton, S.J. et al., *Anal. Biochem.*, **151**, 369-374 (1985).
3. Friedenauer, D. et al., *Anal. Biochem.*, **178**, 263-268 (1989).
4. Rubein, R.W. et al., *Anal. Biochem.*, **83**, 773-777 (1977).
5. Sedmak, J.J., and Grossberg, S.E., *Anal. Biochem.*, **79**, 544 (1977).
6. Sokuttgerber, A.G. et al., *Anal. Biochem.*, **179**, 198-201 (1989).
7. Tal, M. et al., *J. Biol. Chem.*, **260**, 9976-9980 (1985).

CellLytic and QuantiPro are trademarks of Sigma-Aldrich® Biotechnology LP and Sigma-Aldrich Co. TRITON is a registered trademark of Union Carbide Corporation. BRIJ and TWEEN are registered trademarks of Uniqema Americas LLC. Span is a trademark of Croda International PLC. IGEPAL is a registered trademark of Rhodia Operations.

RC,JDS,MAM 06/11-1

Sigma brand products are sold through Sigma-Aldrich, Inc. Sigma-Aldrich, Inc. warrants that its products conform to the information contained in this and other Sigma-Aldrich publications. Purchaser must determine the suitability of the product(s) for their particular use. Additional terms and conditions may apply. Please see reverse side of the invoice or packing slip.

## 12.7. Conteo de células en cámara de Neubauer

Según el tiempo de crecimiento de la levadura se realizaron diferentes diluciones del medio de cultivo para llegar a un número de células que se pudiera contar fácilmente en el microscopio. Se tomaron 20 µl de la dilución y se mezclaron con 20 µl de una solución de azul de metileno (1 mg/ml). Se incubó durante 5 minutos y se toman 10 µl de la mezcla para colocar en la cámara de Neubauer con un cubreobjetos por arriba. Se coloca la punta de la pipeta en el borde del cubreobjetos, en el extremo de la cámara de Neubauer. Se trata de dejar que el líquido penetre entre la cámara y el cubreobjetos desde el lateral, por capilaridad. Se coloca en el microscopio a un aumento de x40. Se cuentan 5 cuadros de la cámara (pintada de celeste en el centro de la cámara en la Figura 90).

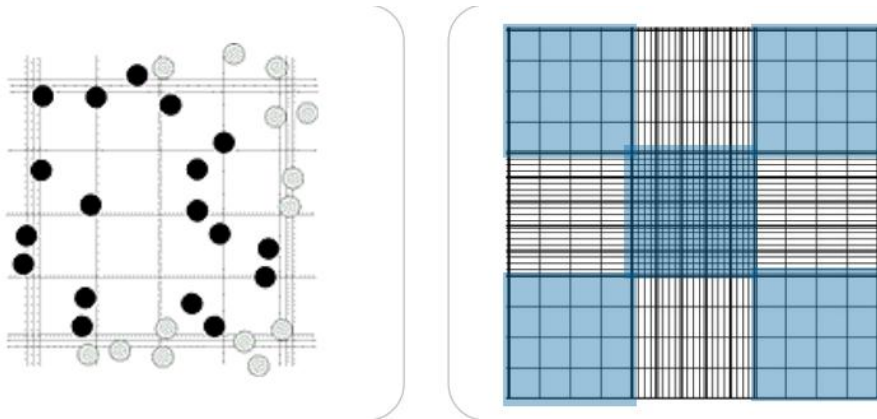


Figura 90- Izq. conteo de un cuadro grande de cámara de Neubauer. Der. Representación de la cámara.

Se realiza un promedio del número de células en cada cuadrado y para calcular la concentración en n° células / ml se sigue la siguiente ecuación.

$$\frac{n^{\circ}cel}{ml} = Promedio * 25 * 10000 * FD$$

25 = número de cuadrados en la cámara

10000 = Factor para pasar del volumen de la cámara a 1 ml

FD = Factor de dilución realizado para contar

## 12.8. Cromatogramas

### 12.8.1. Hidrólisis de corteza deslignificada

Ensayo inicial con enzimas de *Bacillus* sp. EBV 12-22

**SHIMADZU**  
**LabSolutions** Analysis Report

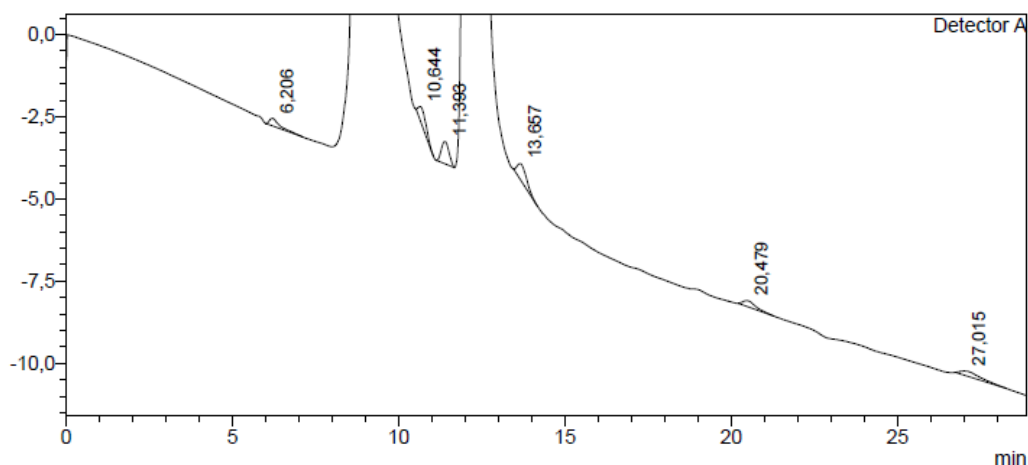
#### <Sample Information>

Sample Name : EBV.279-3F  
Sample ID :  
Data Filename : EBV.279-3F.lcd  
Method Filename : Etanol.lcm  
Batch Filename :  
Vial # : 1-1  
Injection Volume : 20 uL  
Date Acquired : 09/10/2017 10:24:15  
Date Processed : 13/10/2017 14:49:49  
HIDROLISIS CORTEZA DESLIGNIFICADA  
CON ENZIMAS DE 1222-1  
T=72 HORAS

Sample Type : Unknown  
Acquired by : LBB  
Processed by : LBB

#### <Chromatogram>

mV



Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	6,206	4858	231	11,007			
2	10,644	7686	403	17,414			
3	11,393	10788	678	24,440		M	xilobiosa
4	13,657	9700	480	21,975			xilosa
5	20,479	4806	178	10,888			
6	27,015	6301	130	14,275			
Total		44139	2101				

**SHIMADZU**  
**LabSolutions** Analysis Report

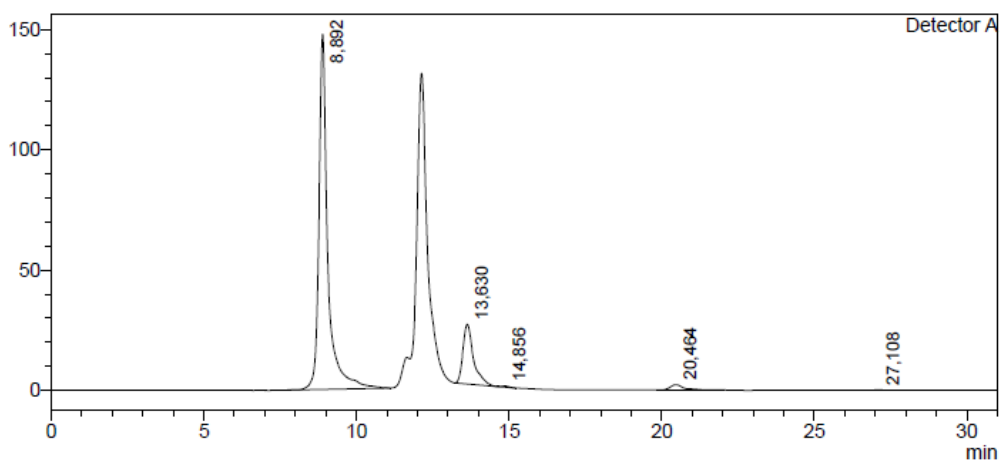
**<Sample Information>**

Sample Name : EBV279-1G  
 Sample ID :  
 Data Filename : EBV279-1G.lcd  
 Method Filename : Etanol.lcm  
 Batch Filename :  
 Vial # : 1-1  
 Injection Volume : 20 uL  
 Date Acquired : 06/10/2017 15:06:17  
 Date Processed : 06/10/2017 16:59:51  
 HIDROLISIS CORTEZA DESLIGNIFICADA  
 CON EZNIMAS DE 9787-1  
 T=72 HORAS

Sample Type : Unknown  
 Acquired by : LBB  
 Processed by : LBB

**<Chromatogram>**

mV



Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	8,892	2975966	147723	0,000			
2	13,630	598451	24850	0,000			xilosa
3	14,856	7328	450	0,000			
4	20,464	71364	2259	0,000			acético
5	27,108	1370	56	0,000			
Total		3654478	175339				

## 12.8.2. Fermentación con *W. anomalus*

Tiempo cero de fermentación del hidrolizado enzimático concentrado

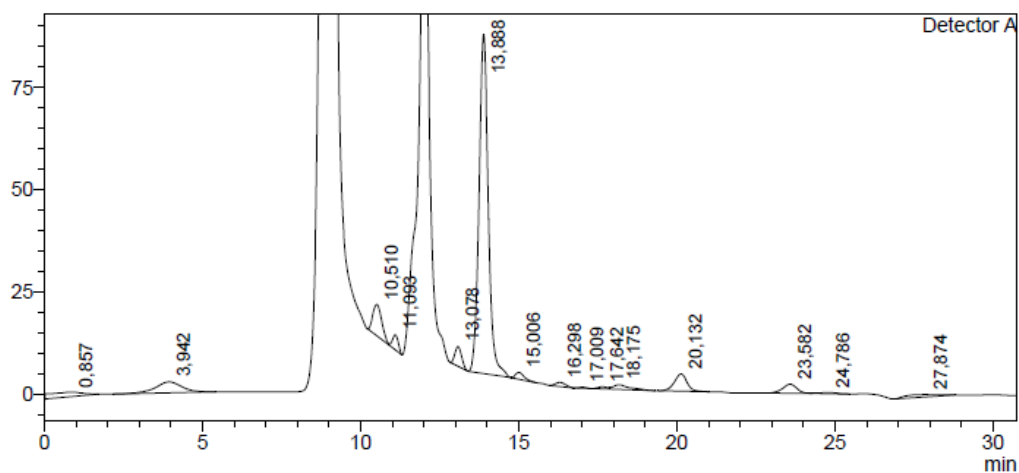
### SHIMADZU LabSolutions Analysis Report

#### <Sample Information>

Sample Name : EBVI-44-GB1-0  
 Sample ID :  
 Data Filename : EBVI-44-GB1-0.lcd  
 Method Filename : Etanol.lcm  
 Batch Filename :  
 Vial # : 1-1 Sample Type : Unknown  
 Injection Volume : 20 uL  
 Date Acquired : 03/08/2018 17:10:51 Acquired by : LBB  
 Date Processed : 03/08/2018 18:32:02 Processed by : LBB  
 FERMENTACION W. ANOM HIDROLIZADO ENZIMATICO CORDEL  
 T=0 HORAS

#### <Chromatogram>

mV



Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	0,857	82743	1077	3,243			
2	3,942	158361	2674	6,207			
3	10,510	150369	7696	5,894			
4	11,093	44819	3640	1,757		V	
5	13,078	72414	4846	2,838			
6	13,888	1694247	83015	66,408			xilosa
7	15,006	31299	1664	1,227			
8	16,298	21714	986	0,851			
9	17,009	3923	259	0,154			
10	17,642	10668	514	0,418			
11	18,175	42022	1152	1,647		V	
12	20,132	115306	4202	4,520			acético
13	23,582	68165	2204	2,672			
14	24,786	9870	288	0,387			
15	27,874	45369	597	1,778			
Total		2551288	114815				

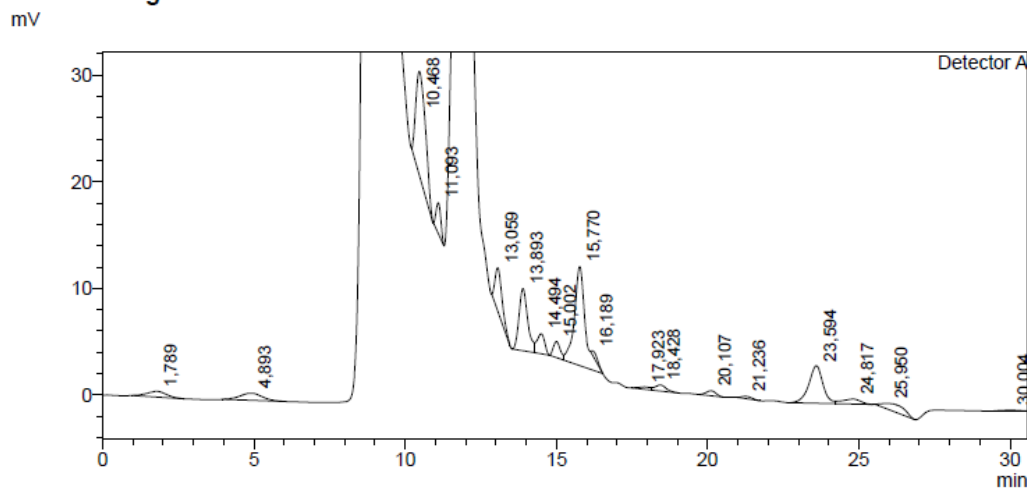
Tiempo final (72 horas) de fermentación del hidrolizado enzimático concentrado

**SHIMADZU LabSolutions Analysis Report**

**<Sample Information>**

Sample Name : EBVI-44-B1-2  
 Sample ID :  
 Data Filename : EBVI-44-B1-2.lcd  
 Method Filename : Etanol.lcm  
 Batch Filename :  
 Vial # : 1-1  
 Injection Volume : 20 uL  
 Date Acquired : 03/08/2018 13:51:48  
 Date Processed : 03/08/2018 17:55:49  
 Sample Type : Unknown  
 Acquired by : LBB  
 Processed by : LBB  
 FERMENTACION W. ANOM HIDROLIZADO ENZIMATICO CORTEZA DESLIGNIFICADA  
 T=72 HORAS

**<Chromatogram>**



Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	1,789	23495	525	2,373			
2	4,893	34261	673	3,460			
3	10,468	216221	9745	21,837			
4	11,093	30806	2872	3,111			
5	13,059	63081	4009	6,371			
6	13,893	116472	5839	11,763			xilosa
7	14,494	32518	1881	3,284		V	
8	15,002	23610	1508	2,384			
9	15,770	235524	9300	23,787		SVM	xilitol
10	16,189	6966	359	0,704		T	
11	17,923	6311	228	0,637			
12	18,428	14311	562	1,445		V	
13	20,107	10680	472	1,079			
14	21,236	4987	207	0,504			
15	23,594	113733	3505	11,487			
16	24,817	19154	451	1,934		V	
17	25,950	34518	549	3,486			
18	30,004	3493	91	0,353			
Total		990139	42778				