

**UNIVERSIDAD NACIONAL  
“SANTIAGO ANTÚNEZ DE MAYOLO”  
FACULTAD DE CIENCIAS DEL AMBIENTE  
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AMBIENTAL**



**“EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE  
DEGRADACIÓN DE RESIDUOS AGRÍCOLAS  
UTILIZANDO BACTERIAS CELULOLÍTICAS Y  
XILANOLÍTICAS, COMO ALTERNATIVA DE  
TECNOLOGÍA LIMPIA, ANCASH-PERU-2015”**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:  
INGENIERA AMBIENTAL**

**AUTORA:**

**Bach. JASMINE BARINIA LEA LÁZARO PALOMINO**

**ASESORA:**

**M.Sc. CARMEN DEL ROSARIO TAMARIZ ANGELES**

**Huaraz, Ancash, Perú**

**Enero, 2018**



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
“SANTIAGO ANTÚNEZ DE MAYOLO”  
FACULTAD DE CIENCIAS DEL AMBIENTE  
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AMBIENTAL**



**“EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE  
DEGRADACIÓN DE RESIDUOS AGRÍCOLAS  
UTILIZANDO BACTERIAS CELULOLÍTICAS Y  
XILANOLÍTICAS, COMO ALTERNATIVA DE  
TECNOLOGÍA LIMPIA, ANCASH-PERU-2015”**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:  
INGENIERA AMBIENTAL**

**AUTORA:**

**Bach. JASMINE BARINIA LEA LÁZARO PALOMINO**

**ASESORA:**

**M.Sc. CARMEN DEL ROSARIO TAMARIZ ANGELES**

**Huaraz, Ancash, Perú**

**Enero, 2018**





## ACTA DE SUSTENTACIÓN Y DEFENSA DE TESIS

Los Miembros del Jurado en pleno que suscriben, reunidos en la fecha, en el Auditorium de la FCAM-UNASAM, de conformidad a la normatividad vigente conducen el Acto Académico de Sustentación y Defensa de la Tesis **EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE DEGRADACIÓN DE RESIDUOS AGRÍCOLAS UTILIZANDO BACTERIAS CELULOLÍTICAS Y XILANOLÍTICAS, COMO ALTERNATIVA DE TECNOLOGÍA LIMPIA, ANCASH-PERÚ, 2015**, que presenta la Bachiller **JASMINE BARINIA LEA LÁZARO PALOMINO** para optar el **Título Profesional de Ingeniero Ambiental**.

En seguida, después de haber atendido la exposición oral y escuchada las respuestas a las preguntas y observaciones formuladas, lo declaramos:

### APROBADO

con el calificativo de: DISIEBETE (17)

En consecuencia, la Bachiller **JASMINE BARINIA LEA LÁZARO PALOMINO** queda expedito para que el Consejo de Facultad de la Facultad de Ciencias del Ambiente de la Universidad Nacional "Santiago Antúnez de Mayolo" apruebe el otorgamiento de su **Título Profesional de Ingeniero Ambiental** de conformidad al Art. 113 numeral 113.9 del Reglamento General de la UNASAM (Resolución de Consejo Universitario N° 399-2015-UNASAM), el Art. 48° del Reglamento General de Grados y Títulos de la UNASAM (Resolución de Consejo Universitario - Rector N° 554-2017-UNASAM) y el Art. 160° del Reglamento de Gestión de la Programación, Ejecución y Control de las Actividades Académicas (Resolución de Consejo Universitario - Rector N° 432-2016-UNASAM).

Huaraz, 11 de Enero de 2018

Dr. PRUDENCIO CELSO HIDALGO CAMARENA  
Presidente  
Jurado de Sustentación

Ing. ARNULFO SERNA ROMÁN  
Secretario  
Jurado de Sustentación

Ing. CIRO WALTER FERNÁNDEZ ROSALES  
Vocal  
Jurado de Sustentación

MSc. CARMEN DEL ROSARIO TAMARIZ ANGELES  
Asesor de Tesis

## **DEDICATORIA**

A mi padre que desde el cielo me bendice día a día y que siempre deseó verme ser una gran profesional y quien inculcó en mi la perseverancia y voluntad para cumplir mis metas.

A mi madre y hermanas que son mi motivación para seguir adelante.

Barinia Lázaro Palomino

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi asesora la Dra. Carmen del Rosario Tamariz Angeles que gracias a sus conocimientos y amor por la investigación que transmite a cada uno de sus estudiantes y tesis, además de su paciencia y dedicación se pudo lograr este trabajo de investigación.

Al Dr. Percy Olivera Gonzales por su gran apoyo en la operación de equipos de laboratorio, por sus sugerencias y consejos que me ayudaron mucho en la realización de este trabajo.

A mi alma mater UNASAM y mi muy gloriosa Facultad de Ciencias del Ambiente donde gracias a las enseñanzas de mis docentes pude querer y apreciar a mi carrera profesional.

Al Laboratorio de Biología de la Facultad de Ciencias – UNASAM donde desarrolle mi trabajo experimental y al personal del laboratorio que colaboro conmigo en todo momento.

Al Instituto de Investigación de la UNASAM que mediante su III Concurso de Proyectos de Investigación 2015, financio mediante recursos ordinarios parte de este trabajo.

A mi familia por ser mi soporte y ayuda en todo ámbito de mi vida.

A Loyer por ser la persona que me animo a realizar mi tesis en un tema innovador y que siempre me impulsa a ser mejor.

A mis amigos y compañeros tesis del laboratorio que siempre han estado conmigo apoyándome de una u otra forma para alcanzar esta meta.

## RESUMEN

Frente al calentamiento global y efecto invernadero, es necesario el desarrollo de procesos para generar de energía usando tecnologías limpias y renovables. Por lo tanto, se evaluó la capacidad de degradación de residuos agrícolas de bacterias celulolíticas y xilanolíticas termotolerantes del Callejón de Huaylas, como potencial de tecnología limpia. Se usaron las bacterias: *Bacillus subtilis* DCH4 y *Conhella laeviribosi* EHB4; y como sustratos: tallos de trigo, tallos de quinua, bagacillo de caña de azúcar, xilano de birchwood y carboximetil celulosa. Primero, se evaluó la capacidad de degradación los residuos durante el cultivo usando como fuente nitrogenada peptona o nitrato de amonio. En segundo lugar, se evaluó la actividad endoglucanasa y xilanasa de los extractos enzimáticos de las bacterias cultivadas con residuos agrícolas, y se seleccionaron los de mayor actividad enzimática. En tercer lugar, se evaluó la sacarificación de los residuos agrícolas, CMC y xilano usando los extractos seleccionados. La cuantificación de los azúcares reductores y actividad enzimática se realizó mediante el método de DNS. Se encontró que ambas bacterias degradan los residuos agrícolas y la mejor fuente nitrogenada fue peptona. En la segunda evaluación, extractos enzimáticos de *B. subtilis* DCH4 cultivado por 16 horas usando bagacillo y quinua (B16H-BS y Q16H-BS); y *C. laeviribosi* EHB4 cultivado por 72 horas con bagacillo (B72H-CL) fueron seleccionados por presentar las mayores actividades endoglucanasa y xilanasa. En la tercera evaluación se obtuvo el mayor porcentaje de sacarificación usando el extracto B72H-CL y tallo de trigo. Finalmente, estos resultados demuestran *Bacillus subtilis* DCH4 and *Conhella laeviribosi* EHB4 tienen capacidad de degradar los residuos agrícolas tanto en cultivo o cuando se usan sólo sus enzimas; así mismo, los residuos agrícolas evaluados pueden ser utilizados como fuente carbonada para obtener de azúcares fermentables o para la producción de enzimas xilanolíticas y celulolíticas, ambos bioprocesos son potencialmente útiles para las tecnologías limpias tal como la producción de bioetanol de segunda generación.

**Palabras clave:** Xilanolíticas, celulolíticas, xilanasas, endoglucanasas, sustratos agrícolas.



## ABSTRACT

Faced to global warming and greenhouse effect, it is necessary to develop processes to produce energy using clean and renewable technologies. Therefore, it was evaluated the degradation capacity of agricultural residues by cellulolytic and xylanolytic thermotolerant bacteria of the Callejón de Huaylas as a potential of clean technology. Bacteria strains used were: *Bacillus subtilis* DCH4 and *Conhella laeviribosi* EHB4; and carbon substrates were: wheat stems, quinoa stems, sugar cane bagasse, xylan of birchwood and carboxymethyl cellulose. First, degradation capacity of the residues during the cultivation using peptone or ammonium nitrate as the nitrogen source was evaluated. Secondly, it was evaluated the endoglucanase and xylanase activity of the enzymatic extracts of the bacteria strains cultivated with agricultural residues, and those with the highest enzymatic activity were selected. Third, saccharification of agricultural residues, CMC, and xylan using selected extracts were evaluated. The quantification of reducing sugars and enzymatic activity was carried out with DNS method. It was found that both bacteria tested degrade agricultural residues, and the best nitrogenous source was peptone. In the second evaluation, enzymatic extracts of *B. subtilis* DCH4 cultured for 16 hours using bagacillo and quinoa (B16H-BS and Q16H-BS); and *C. laeviribosi* EHB4 cultured with bagacillo for 72 hours (B72H-CL) were selected because they had the highest endoglucanase and xylanase activities. In the third evaluation, higher saccharification percentage was obtained using B72H-CL extract and wheat stem. Finally, these results show that *Bacillus subtilis* DCH4 and *Conhella laeviribosi* EHB4 have the capacity to degrade agricultural residues either in culture or when only their enzymes are used; likewise, the agricultural residues evaluated can be used as a carbon source for obtaining fermentable sugars or for production of xylanolytic and cellulolytic enzymes, both bioprocesses are potentially useful for clean technologies such as production of second generation bioethanol.

**Keywords:** Xylanolytic, cellulolytic, xylanase, endoglucanase, agricultural waste.

# ÍNDICE

<b>CONTENIDO</b>	<b>Pág.</b>
ACTA DE SUSTENTACIÓN.....	i
DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
RESUMEN.....	iv
ABSTRACT.....	v
ÍNDICE.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABLAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
<b>CAPITULO I</b>	
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Planteamiento del problema.....	2
1.2 Formulación del problema.....	3
1.3 Hipótesis.....	3
1.4 Objetivos.....	3
1.4.1 Objetivo General.....	3
1.4.2 Objetivos Específicos.....	3
<b>CAPITULO II</b>	
<b>MARCO REFERENCIAL.....</b>	<b>5</b>
2.1 Antecedentes.....	5
2.2 Marco teórico.....	7
2.2.1 Biomasa.....	7
2.2.2 Biomasa lignocelulósica.....	7
2.2.3 Composición de la biomasa lignocelulósica.....	10
2.2.4 Organismos degradadores de celulosa y hemicelulosa.....	12
2.2.5 Celulasas.....	12
2.2.6 Xilanasas.....	13
2.2.7 Aplicaciones de las enzimas lignocelulolíticas a nivel industrial.....	14
2.2.8 Degradación de lignocelulosa.....	15
2.2.9 Sacarificación (Hidrolisis enzimática).....	17
2.2.10 Bioprocesos.....	17

2.2.11 Tecnologías limpias .....	18
2.3 Definición de términos .....	19

### **CAPITULO III**

<b>METODOLOGÍA .....</b>	<b>21</b>
3.1 Recolección y preparación de la materia prima .....	21
3.1.1 Recolección.....	21
3.1.2 Pre tratamiento de los residuos agrícolas.....	21
3.1.3 Molido y tamizado .....	21
3.2 Elección de bacterias .....	22
3.2.1 Microorganismos productores de endoglucanasas y xilanasas .....	22
3.3 Primera etapa: Evaluación de degradación durante el cultivo usando residuos agrícolas .....	23
3.3.1 Preparación de inóculo bacteriano .....	23
3.3.2 Preparación del medio de cultivo.....	23
3.3.3 Cultivo .....	23
3.3.4 Preparación del extracto.....	23
3.3.5 Cuantificación de azúcares reductores en el extracto.....	24
3.4 Segunda etapa: Evaluación de actividad enzimática de los extractos de cultivos en diferentes tiempos usando los residuos agrícolas.....	24
3.4.1 Actividad enzimática.....	24
3.5 Tercera etapa: Sacarificación de los extractos enzimáticos seleccionados .....	25
3.5.1 Purificación parcial del extracto enzimático .....	25
3.5.2 Sacarificación o hidrólisis de residuos agrícolas.....	25
3.6 Análisis estadístico.....	26

### **CAPITULO IV**

<b>RESULTADOS Y DISCUSIONES.....</b>	<b>27</b>
4.1 Resultados .....	27
A. Evaluación de degradación durante el cultivo usando residuos agrícolas y controles positivos .....	27
B. Evaluación de actividad enzimática endoglucanasa y xilanasasa usando los residuos agrícolas y a diferentes tiempos de cultivo.....	35
b.1 Actividad enzimática endoglucanasa y xilanasasa de <i>B. subtilis</i> DCH4 de extractos de cultivos usando residuos agrícolas.....	35
b.2 Actividad enzimática endoglucanasa y xilanasasa de <i>C. laeviribosi</i> EHB4 de extractos de cultivos usando residuos agrícolas.....	39

C. Sacarificación de residuos agrícolas usando los extractos enzimáticos seleccionados .....	43
c.1 Sacarificación usando extractos enzimáticos crudos de <i>B. subtilis</i> DCH4 .....	44
c.2 Sacarificación usando extractos enzimáticos crudos de <i>C. laeviribosi</i> EHB4 .....	44
D. Comparación entre los mejores resultados de porcentajes de sacarificación usando los extractos crudos B16H-BS, Q16H-BS Y B72H-CL..	49
4.2 Discusión de resultados .....	50
<b>CAPITULO V</b>	
<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....</b>	<b>56</b>
5.1 Conclusiones.....	56
5.2 Recomendaciones.....	57
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>58</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>65</b>
ANEXO 1: CURVA ESTÁNDAR DE AZÚCARES REDUCTORES .....	66
ANEXO 2: PROTOCOLO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA MINIATURIZADO .....	67
ANEXO 3: CÁLCULOS PARA LA CONVERSIÓN A UNIDADES ENZIMÁTICAS.....	68
ANEXO 4: ANÁLISIS ESTADÍSTICOS PARA LA PRIMERA EVALUACIÓN DE DEGRADACIÓN .....	70
ANEXO 5: ANÁLISIS ESTADÍSTICOS PARA LA SEGUNDA EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA .....	81
ANEXO 6: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LA LIBERACIÓN DE AZUCARES USANDO EXTRACTOS ENZIMÁTICOS CRUDOS .....	88
ANEXO 7: ANÁLISIS ANOVA Y DUNCAN PARA LA COMPARACIÓN DE MEJORES RESULTADOS DE PORCENTAJES DE SACARIFICACIÓN ..	95
ANEXO 8 : PANEL FOTOGRÁFICO .....	100

## LISTA DE FIGURAS

CONTENIDO	Pág.
Figura 1: Generación de biomasa. ....	8
Figura 2: Componentes estructurales de la biomasa lignocelulósica. ....	10
Figura 3: Representación esquemática de hidrólisis de la celulosa amorfa y cristalina en el sistema de celulasas complejo (A) y no complejo (B). ....	13
Figura 4: Estructura del xilano y el sitio de ataque de las enzimas xilanolíticas. ....	14
Figura 5: Métodos de producción de biocombustibles. ....	18
Figura A: Análisis comparativo del nivel de degradación por liberación de azúcares reductores de los residuos agrícolas con respecto a xilano, usando <i>B. subtilis</i> DCH4 y el medio MSP. ....	30
Figura B: Análisis comparativo del nivel de degradación por liberación de azúcares reductores de los residuos agrícolas con respecto a CMC, usando <i>B. subtilis</i> DCH4 y el medio MSP. ....	31
Figura C: Análisis comparativo del nivel de degradación por liberación de azúcares reductores de los residuos agrícolas con respecto a xilano, usando <i>C. laeviribosi</i> EHB4 y el medio MSP. ....	33
Figura D: Análisis comparativo del nivel de degradación por liberación de azúcares reductores de los residuos agrícolas con respecto a CMC, usando <i>C. laeviribosi</i> EHB4 y el medio MSP. ....	34
Figura 6: Actividad enzimática xilanasa del cultivo de <i>B. subtilis</i> DCH4 en MSP, usando los sustratos de Bagacillo, Trigo y Quinoa, evaluados a tiempos de 24, 48 y 72 horas. ....	36
Figura 7: Actividad enzimática endoglucanasa del cultivo de <i>B. subtilis</i> DCH4 en MSP, usando los sustratos de Bagacillo, Trigo y Quinoa, evaluados a tiempos de 24, 48 y 72 horas. ....	37
Figura 8: Actividad enzimática xilanasa del cultivo de <i>B. subtilis</i> DCH4 en MSP, usando los sustratos de Bagacillo, Trigo y Quinoa, evaluados a tiempos de 16, 20, 24 y 28 horas. ....	38
Figura 9: Actividad enzimática endoglucanasa del cultivo de <i>B. subtilis</i> DCH4 en MSP, usando los sustratos de Bagacillo, Trigo y Quinoa, evaluados a tiempos de 16, 20, 24 y 28 horas. ....	39

Figura 10: Actividad Xilanasa del cultivo de <i>C. laeviribosi</i> EHB4 en MSP, usando los sustratos de Bagacillo, Trigo y Quinoa, evaluados a tiempos de 24, 48 y 72 horas.....	40
Figura 11: Actividad Endoglucanasa del cultivo de <i>C. laeviribosi</i> EHB4 en MSP, usando los sustratos de Bagacillo, Trigo y Quinoa, evaluados a tiempos de 24, 48 y 72 horas. ....	41
Figura 12: Actividad Xilanasa del cultivo de <i>C. laeviribosi</i> EHB4 en MSP, usando los sustratos de Bagacillo, Trigo y Quinoa, evaluados a tiempos de 16, 20, 24 y 28 horas.....	42
Figura 13: Actividad Endoglucanasa del cultivo de <i>C. laeviribosi</i> EHB4 en MSP, usando los sustratos de Bagacillo, Trigo y Quinoa, evaluados a tiempos de 16, 20, 24 y 28 horas. ....	43
Figura 14: Sacarificación usando el extracto enzimático crudo de <i>B. subtilis</i> incubado a 16 horas usando bagacillo (B16H-BS) sobre los sustratos: (a) bagacillo, (b) trigo, (c) quinua, (d) xilano y (e) CMC.....	46
Figura 15: Sacarificación usando el extracto enzimático crudo de <i>B. subtilis</i> incubado a 16 horas usando Quinoa (Q16H-BS) sobre los sustratos: (a) bagacillo, (b) trigo, (c) quinua, (d) xilano y (e) CMC.....	47
Figura 16: Sacarificación usando el extracto enzimático crudo de <i>C. laeviribosi</i> Incubado a 72 horas usando bagacillo (B72H-CL) sobre los sustratos: (a) bagacillo, (b) trigo, (c) quinua, (d) xilano y (e) CMC.....	48
Figura 17: Comparación entre los porcentajes de degradación de los mejores resultados de sacarificación de los extractos crudos B16H-BS, Q16H-BS y B72H-CL, considerando al xilano como el 100%. ....	49
Figura 18: Curvas estándar de glucosa a la izquierda y de xilosa a la derecha, elaborada con el método de DNS para microplaca. Los valores corresponden al promedio de 8 repeticiones $\pm$ DS. ....	66

## LISTA DE TABLAS

CONTENIDO	Pág.
Tabla 1: Fuentes, categorías y tipos de biomasa lignocelulósica.....	9
Tabla 2: Contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina de residuos agrícolas y desechos. ....	11
Tabla 3: Características de cultivo de <i>B. subtilis</i> DCH4. ....	22
Tabla 4: Características de cultivo de <i>C. laeviribosi</i> EHB4. ....	22
Tabla 5: Degradación de sustratos usando inóculo de <i>B. subtilis</i> DCH4, expresado como liberación de azúcares reductores evaluados a 72, 144 y 216 horas. ..	29
Tabla 6: Degradación de sustratos usando inóculo de <i>C. laeviribosi</i> EHB4, expresado como liberación de azúcares reductores evaluados a 72, 144 y 216 horas. ....	32

## LISTA DE ABREVIATURAS

Xyl	Actividad xilanasa
End	Actividad endoglucanasa
CMC	Carboximetil celulosa
DNS	Ácido 3,5-dinitro salicílico
TSB	Caldo tripticasa de soya
DCH4	Método de extracción directa, aguas termales de Chancos y punto de muestreo N° 4
EHB4	Método de extracción ex situ, aguas termales de Huancahuaz, enriquecimiento con bagacillo y punto de muestreo N° 4.
MSP	Medio Salino con Peptona
MSA	Medio Salino con Nitrato de Amonio

## **CAPITULO I**

### **INTRODUCCIÓN**

La economía actual del mundo es altamente dependiente de diversas fuentes de energía fósiles como el petróleo, carbón y gas natural (Uihlein & Schbek, 2009); es así que el consumo excesivo de combustibles fósiles ha dado lugar a la generación de altos niveles de contaminación durante las últimas décadas (Ballesteros et al., 2006). Por otro lado, con la expansión de población humana y el aumento de la prosperidad industrial global el consumo de energía también ha aumentado gradualmente, afectando las limitadas reservas de combustibles fósiles y en consecuencia la producción anual mundial de petróleo empezaría a disminuir en el futuro cercano (Campbell & Laherrere, 1998). En este escenario, el viento, agua, sol, biomasa y el calor geotérmico pueden ser fuentes renovables para la industria energética, mientras que la producción de combustible y la industria química puede depender de la biomasa como una alternativa fuente en un futuro próximo (Lynd & Wang, 2003).

La biomasa lignocelulósica puede ser una enorme fuente de combustibles de transporte, a la fecha es utilizada comúnmente para generar calor, generalmente a través de la combustión (Demirbas, 2005a), pero podría ser utilizada para producir bioetanol, biobutanol, biohidrógeno y biometano mediante procesos fermentativos, considerándose en ese sentido tecnologías verdes o tecnologías limpias para el planeta (Dhussa, 2004). Estos materiales lignocelulósicos son renovables, de bajo costo y están disponibles en abundancia, incluyen residuos de la cosecha, hierbas, aserrín, virutas de madera, etc.; entre ellos los tallos de arroz, trigo, maíz y bagazo de caña de azúcar son los principales desechos agrícolas en términos de cantidad de biomasa disponible a nivel mundial (Kim & Dale, 2004). Por lo tanto, la producción de bioetanol podría ser la ruta a la utilización eficaz de los residuos agrícolas, motivo por el cual en las dos últimas décadas se vienen realizando amplias investigaciones para la producción de etanol a



partir de lignocelulosa (Cadoche & Lopez, 1989; Duff & Murray, 1996). La biomasa lignocelulósica que está conformado principalmente por tres componentes: hemicelulosa, lignina y celulosa (Demirbas, 2005b), pueden ser degradadas por celulasas y hemicelulasas que son producidas principalmente por algunas bacterias y hongos, dejando evidencia de sus aplicaciones biotecnológicas en la conversión de la lignocelulosa a productos de valor industrial (Balan et al., 2008). Es así que por ejemplo Quiroz-Castañeda et al. (2009) reportaron la caracterización de la actividad celulolítica de hongos provenientes en tallos de trigo, cuyas enzimas son capaces de tolerar condiciones elevadas de temperatura y funcionan en un amplio rango de pH; lo que los hace candidatos potenciales para ser utilizados en procesos industriales que requieren la hidrólisis de la celulosa (Chandrakant & Bisaria, 1998a).

Del mismo modo, existen numerosos estudios sobre la capacidad celulolítica de varias especies de bacterias del género *Bacillus* y otras bacilares, muchas de ellas provienen de fuentes termales, por ejemplo las cepas de *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* y *Conhella laeviribosi* que fueron aisladas de fuentes termales del Callejón de Huaylas (Ancash, Perú) y presentaron actividad celulolítica y xilanolítica promisorias para el uso de material lignocelulósico y otras aplicaciones industriales (Tamariz, 2014a).

El presente trabajo de investigación se evaluó la capacidad de degradación de residuos agrícolas (tallos de quinua, paja de trigo y bagacillo de caña de azúcar) haciendo uso de las bacterias *B. subtilis* DCH4 y *C. laeviribosi* EHB4, las cuales inducen la producción de enzimas celulasas y xilanasas que a su vez al ser expuestas sobre los residuos agrícolas liberan azúcares reductores que pueden ser utilizados en la elaboración de biocombustibles.

## **1.1 Planteamiento del problema**

En la actualidad se viene buscando alternativas para la generación de energía utilizando recursos renovables, siendo uno de estos la biomasa vegetal o material lignocelulósico el cual mediante su degradación se pueden obtener azúcares simples los cuales pueden ser empleados en la producción de biocombustibles de segunda generación. Para ello es necesario el empleo de métodos biológicos que utilizan microorganismos como productores de enzimas las cuales participan en la degradación de la biomasa vegetal, siendo esta considerada una alternativa de tecnología limpia.

## **1.2 Formulación del problema**

Frente a todo lo expuesto anteriormente se formuló la siguiente interrogante:

¿Es posible utilizar bacterias celulolíticas y xilanolíticas, para degradar residuos agrícolas, como alternativa de tecnología limpia?

## **1.3 Hipótesis**

Las bacterias celulolíticas y xilanolíticas evaluadas degradan residuos agrícolas mediante celulasas y xilanasas, constituyendo este proceso como una alternativa de tecnología limpia.

## **1.4 Objetivos**

### **1.4.1 Objetivo General**

Evaluar la capacidad de degradación de residuos agrícolas utilizando bacterias celulolíticas y xilanolíticas, como alternativa de tecnología limpia.

### **1.4.2 Objetivos Específicos**

- Seleccionar dos bacterias del cepario del laboratorio de Biología de la UNASAM, con capacidad celulolíticas y xilanolíticas provenientes de fuentes termales del Callejón de Huaylas.
- Cultivar mediante fermentación en sumergido cada una de las bacterias seleccionadas utilizando tres residuos agrícolas de la región (bagacillo, quinua y trigo), CMC, xilano; y dos fuentes nitrogenadas, para cuantificar la liberación de azúcares reductores en los tratamientos evaluados.
- Cuantificar la producción de endoglucanasas y xilanasas de las bacterias seleccionadas en los extractos enzimáticos de los cultivos utilizando tres residuos agrícolas y la mejor fuente nitrogenada, para seleccionar el extracto con mayor actividad celulolítica y xilanolítica por cada bacteria.
- Evaluar la capacidad de degradación de los extractos enzimáticos libre de microorganismos de los cultivos seleccionados sobre los residuos agrícolas mediante la cuantificación de azúcares reductores liberados por la acción hidrolítica.

- Determinar y discutir la capacidad de las bacterias utilizadas como degradadoras de residuos agrícolas y las posibilidades de aplicación en tecnologías limpias.

## **CAPITULO II**

### **MARCO REFERENCIAL**

#### **2.1 Antecedentes**

En el mundo, los residuos vegetales son el recurso renovable más grande que existe y se considera que más del 85% de los residuos considerados agrícolas y un gran porcentaje de residuos agroindustriales son de este tipo (Sztern & Pravia, 1999). Estos residuos están compuestos en su mayor parte por celulosa, hemicelulosa y lignina (Paul & Clark, 1996). Los compuestos lignocelulolíticos se estiman en varios miles de millones de toneladas anuales (Okeke & Obi, 1994) y los microorganismos cumplen un papel fundamental en su descomposición y transformación (Saber, 2001).

El material lignocelulósico es atractivo por su bajo costo y alta disponibilidad en diversos climas y localidades, sin embargo, el principal impedimento para su utilización es la falta de una tecnología de bajo costo para degradar la fracción recalcitrante de la biomasa. Aunque existen métodos físicoquímicos que permiten utilizar la biomasa en la producción de biocombustibles, una alternativa prometedora son los métodos biológicos que utilizan organismos celulolíticos para obtener azúcares fermentables (Lynd et al., 2002a).

La agencia internacional de energía (IEA, por sus siglas en inglés) sugiere que a partir de la biomasa o residuos lignocelulósicos se puede obtener cerca de un tercio de la energía necesaria en África, Asia y Latinoamérica (Somerville, 2007). El Perú cuenta con 16 Mt anuales de residuos derivados de las actividades agrícolas, agroindustriales y madereras; donde la provincia de Chiclayo (Lambayeque) presenta la mayor cantidad de estos residuos (1,3 Mt anuales) representados principalmente por residuos de arroz y caña de azúcar; así mismo

las provincias de Ascope (La Libertad) y Santa (Ancash) se encuentran en una situación similar y producen más de 1 Mt por año de estos residuos (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación [FAO], 2010). Sin embargo, estos productos, junto con otros residuos lignocelulósicos son sub-utilizados o en muchos casos son dejados en los botaderos y/o basurales. En nuestra región, existen diversas fuentes de residuos agrícolas sub-utilizadas y en muchos casos incluso son fuente de contaminación porque son incinerados generando emisiones de CO<sub>2</sub>.

Las investigaciones realizadas a nivel mundial han determinado que el uso de microorganismos es muy eficiente para la producción enzimática siendo cultivadas en determinadas condiciones y usando diversos sustratos; un ejemplo claro es el trabajo realizado por Safaa et al. (2013), donde se investigó los factores que afectan a la coproducción de las enzimas celulasa y xilanasas termoestables por *Bacillus* sp. 276NS termotolerante. Se destacan las variables, donde se encontró que el extracto de levadura era el factor más significativo que afectaba a la producción de celulasa, mientras que el xilano, el CMC y el YE fueron los factores más significativos que afectaron la producción de xilanasas. La producción de las dos enzimas no fue concomitante, pero la producción de enzimas celulasa y su sacarificación de CMC desempeñan un papel importante e indirecto en la producción de enzima xilanasas.

Los microorganismos (hongos y bacterias) han demostrado su eficiencia en la producción de celulasa y xilanasas sobre sustratos sintéticos como el xilano y CMC, compuestos que son costosos, en ese escenario diversas investigaciones realizadas optaron por el uso de sustratos naturales como la biomasa lignocelulósica, como en el trabajo realizado por Suesca (2012) donde las celulasa y xilanasas fueron producidas por una cepa nativa de *Trichoderma asperellum* utilizando tallo de clavel molido como sustrato (fuente de carbono), demostrándose que la utilización de tallo de clavel molido como fuente de carbono fue suficiente para lograr unos niveles aceptables de producción de enzimas, permitiendo superar las actividades obtenidas cuando se utilizó celulosa microcristalina como fuente de carbono.

La producción enzimática que obtiene en los diversos procesos tienen como finalidad la degradación de material lignocelulósico mediante la liberación de azúcares reductores que posteriormente se usarán en la elaboración de biocombustibles de segunda generación como se observa en el trabajo de Trivedi

et al. (2015), donde la celulasa obtenida fue producida del hongo marino *Cladosporium sphaerospermum* a través de la fermentación del estado sólido (SSF), evaluaron su potencial en sacarificación de la biomasa de la alga marina usando la alga marina verde común *Ulva fasciata*, mediante la hidrólisis bajo condiciones optimizadas se liberó azúcares reductores posteriormente en una etapa de fermentación dieron una producción del etanol con eficacia de 93.81% de conversión.

En el Perú, se han estudiado la producción de celulasas utilizando bagacillo de caña de azúcar usando hongos mediante fermentación en sustrato sólido (Gutiérrez & Tengerdy, 1997). Sin embargo, no se han encontrado trabajos de degradación de residuos agrícolas usando bacterias nativas.

Por otro lado, las fuentes termales de Chancos, Olleros y Huancarhuaz han sido exploradas en cuanto a la microflora habiéndose encontrado y aislado varias cepas de bacterias nativas con capacidad de hidrolizar la carboximetil celulosa (CMC) y xilano (Tamariz, 2014b). Sin embargo, no se han evaluado las capacidades de degradación de sustrato lignocelulósicos naturales para establecer la utilidad de las cepas sugeridas con mayor potencial y su posible uso en aplicaciones de tecnologías limpias.

## **2.2 Marco teórico**

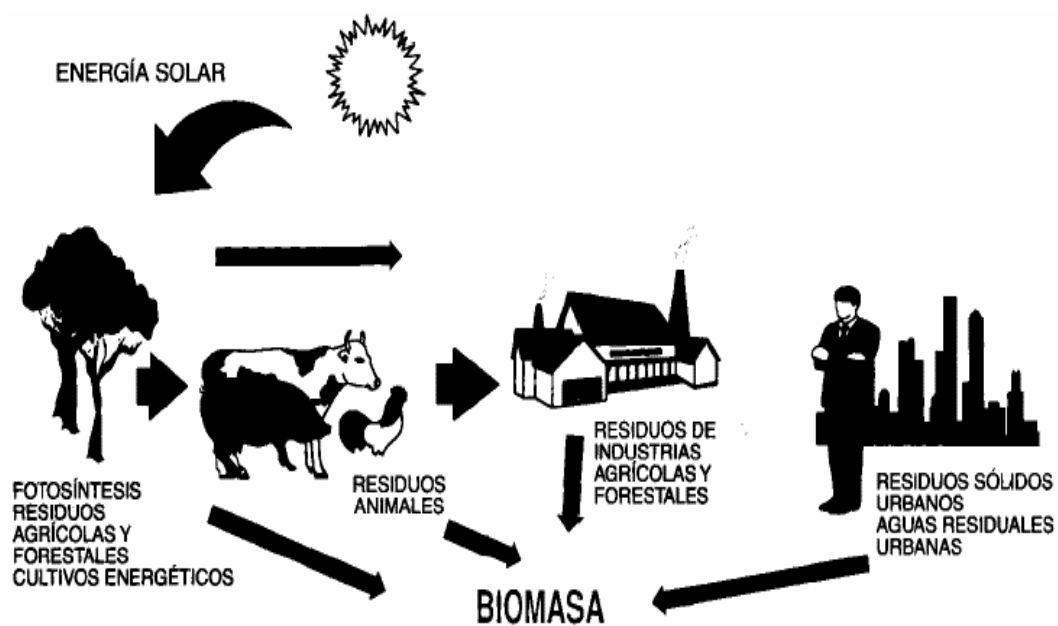
### **2.2.1 Biomasa**

Es conjunto de materia orgánica renovable de origen vegetal, animal o procedente de la transformación natural o artificial de la misma. Esta se puede clasificar, atendiendo a su origen, en: Biomasa Vegetal, Animal y Residual. La Vegetal incluye a toda la biomasa de procedencia vegetal. Incluye la biomasa lignocelulósica y a los productos de la agricultura conteniendo azúcares, almidones y proteínas, como granos, frutos y otros (Abril & Navarro, 2012a).

### **2.2.2 Biomasa lignocelulósica**

La biomasa de origen lignocelulósico, es el material orgánico más abundante en la tierra. Sus fuentes son los bosques, cultivos agrícolas, residuos de cosechas y otros residuos industriales como residuos de la industria de la madera y los

tableros, residuos de la industria del papel y el papel reciclado (ver Tabla 1) (Abril & Navarro, 2012b).



**Figura 1:** Generación de biomasa.

**Nota:** El proceso fotosintético hace crecer la biomasa vegetal, siendo este el alimento necesario para los animales. De este modo se desarrolla la biomasa animal, que durante su metabolismo y al final de su ciclo de vida produce también residuos aprovechables energéticamente.

**Fuente:** Abril & Navarro (2012)

**Tabla 1:** Fuentes, categorías y tipos de biomasa lignocelulósica.

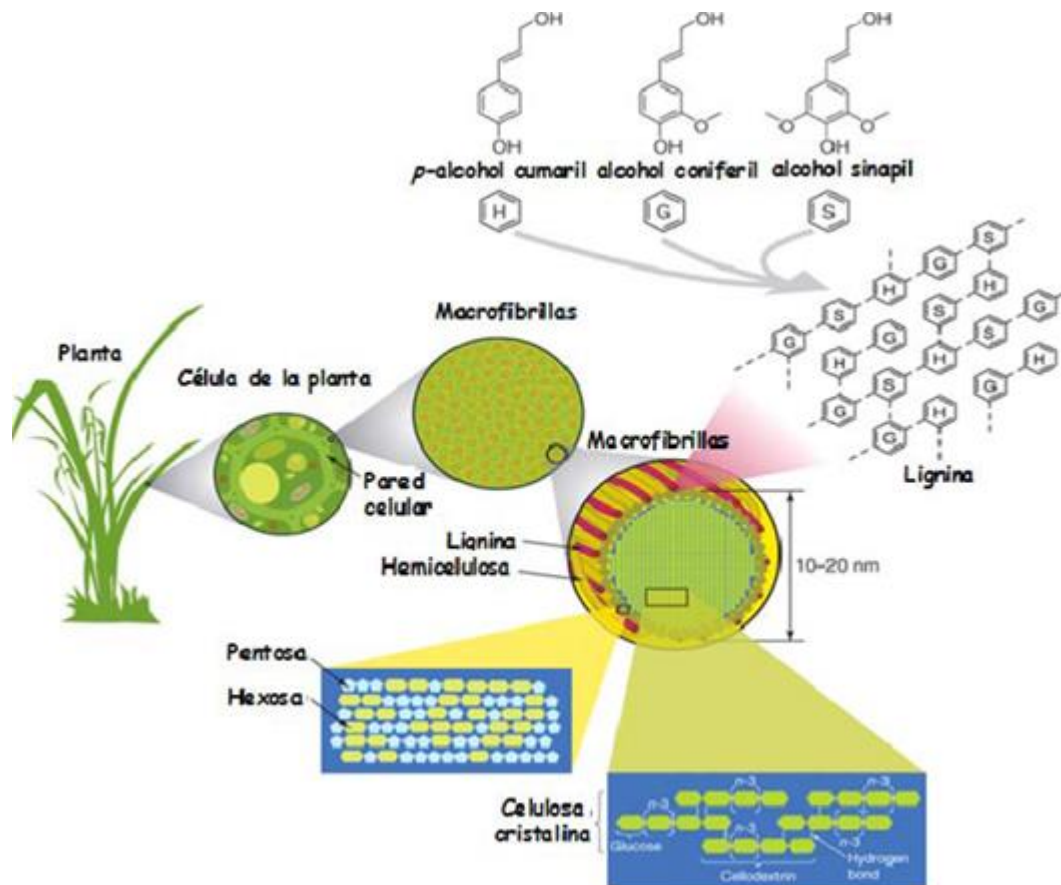
<b>A. Industrias forestales</b>	<b>Residuos forestales</b>	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Tocones</li> <li>○ Copas</li> <li>○ Ramas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Follaje</li> <li>○ Cortezas</li> </ul>
	<b>Desechos industriales</b>	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Aserrín</li> <li>○ Bordes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Recorterías</li> <li>○ Defectos</li> </ul>
<b>B. Industria Celulosa, Papel y Tableros</b>	<b>Pulpas</b>	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Pulpas Químicas</li> <li>○ Pulpas Mecánicas, quimimecánicas y semiquímicas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Pulpa para disolver y absorbente</li> </ul>
	<b>Tableros</b>	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Tableros de fibra</li> <li>○ Tableros de partículas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Tableros prensados</li> <li>○ Tableros MDF</li> </ul>
	<b>Cartones y moldeados</b>	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Cajas corrugadas</li> <li>○ Cartulinas</li> <li>○ Cartones multicapa</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Cartones y cartulinas estucadas</li> <li>○ Moldeados de celulosa</li> </ul>
	<b>Papeles de imprenta y escribir</b>	
	<b>Papeles y cartones industriales</b>	
	<b>Licores residuales del pulpeo y fabricación de papel</b>	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Licores negros y efluentes de blanqueo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Fibras de rechazo</li> <li>○ Residuales de papel.</li> </ul>
<b>C. Sector Urbano</b>	<b>Desechos sólidos locales</b>	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Cajas, envases de Madera, pallet</li> <li>○ Cartones, cajas de cartón y otros envases de papel y cartón</li> <li>○ Papeles, libros y otros impresos</li> <li>○ Papel de desechos de oficinas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Papeles desechables</li> <li>○ Muebles de madera</li> <li>○ Envases de alimentos</li> <li>○ Desechos de instrumentos de madera</li> </ul>
	<b>Escombros</b>	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Construcciones de Madera</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Árboles</li> </ul>
<b>D. Derivados de las producciones agrícolas y de alimentos</b>	<b>Cultivos no maderables y Fibras naturales</b>	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Algodón</li> <li>○ Bambú</li> <li>○ Henequén</li> <li>○ Kenaf</li> <li>○ Lino</li> <li>○ Crotonaria</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Abacá</li> <li>○ Esparto</li> <li>○ Cáhano</li> <li>○ Miscantus</li> <li>○ Caña energética</li> </ul>
	<b>Residuos agrícolas de cosechas</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Paja y bagazo de caña de azúcar</li> <li>○ Pulpa de café</li> <li>○ Residuos de producciones de frutales</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Pajas de cosechas de cereales.</li> <li>○ Residuos de producción de vinos, aceites y otros productos.</li> </ul>	

Fuente: Abril & Navarro (2012)



### 2.2.3 Composición de la biomasa lignocelulósica

La lignocelulosa (Figura 2) conformada principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina, es la principal y más abundante componente de la biomasa producida por la fotosíntesis, anualmente se forman 200,000 millones de toneladas en el mundo (Ragauskas et al., 2006). La pared celular de las plantas está formada por lignocelulosa, la composición y porcentajes de los polímeros varían entre las especies de plantas, incluso entre la edad y la etapa de crecimiento (Jeffries, 1994), por lo tanto, también en los residuos lignocelulósicos existe una variación en el contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina como se muestra en la Tabla 2.



**Figura 2:** Componentes estructurales de la biomasa lignocelulósica.

**Nota:** Estructura de la lignocelulosa. La celulosa, la hemicelulosa y la lignina forman estructuras llamadas microfibrillas, organizadas en macrofibras que regulan la estabilidad de la pared celular de las plantas.

**Fuente:** Rubin (2008)

La lignina es un heteropolímero amorfo, tridimensional y ramificado formado por alcoholes aromáticos que da soporte estructural, rigidez, impermeabilidad y protección a los polisacáridos estructurales (celulosa y hemicelulosa), es altamente resistente a la degradación química y biológica (Aro et al., 2005).

La celulosa es un polímero de D-glucosa unida por enlaces glucosídicos  $\beta$ -1,4 que se estructuran en largas cadenas lineales (microfibrillas) unidas por puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals intramoleculares, formando una estructura cristalina resistente a la hidrólisis y regiones amorfas susceptibles a la degradación enzimática (Ovando & Waliszewski, 2005; Béguin & Aubert, 1994).

La hemicelulosa es un heteropolímero comúnmente ramificado compuesto por dos a cuatro residuos de azúcares, ya sean hexosas (D-manosa, D-glucosa y D-galactosa), pentosas (D-xilosa y D-arabinosa) o sus ácidos urónicos; dependiendo de su composición se le asigna su nombre como puede ser xilano, manano, galactano o arabinano (Bastawde, 1992).

**Tabla 2:** Contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina de residuos agrícolas y desechos.

Material lignocelulósico	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)
Madera dura	40-55	24-40	18-25
Madera suave	45-50	25-35	25-35
Cáscara de nuez	25-30	25-30	30-40
Olote de maíz	45	35	15
Desechos de pastos	25-40	35-40	18-30
Papel	85-99	0	0-15
Paja de trigo	30	50	15
Hojas	15-20	80-85	0
Algodón	80-95	0	0
Papel periódico	40-55	25-40	18-30
Desecho de papel de pulpeos químicos	60-70	10-20	5-10
Desechos sólidos de aguas residuales	8-15	ND <sup>b</sup>	24-29
Desechos animales (cerdos)	6	28	ND <sup>b</sup>
Desechos sólidos de ganado	1.6-4.7	1.4-3.3	2.7-5.7
Hierba Bermuda	25	35.7	64
Pastos de crecimiento rápido	45	31.4	12

Fuente: Sung & Cheng (2002)

## **2.2.4 Organismos degradadores de celulosa y hemicelulosa**

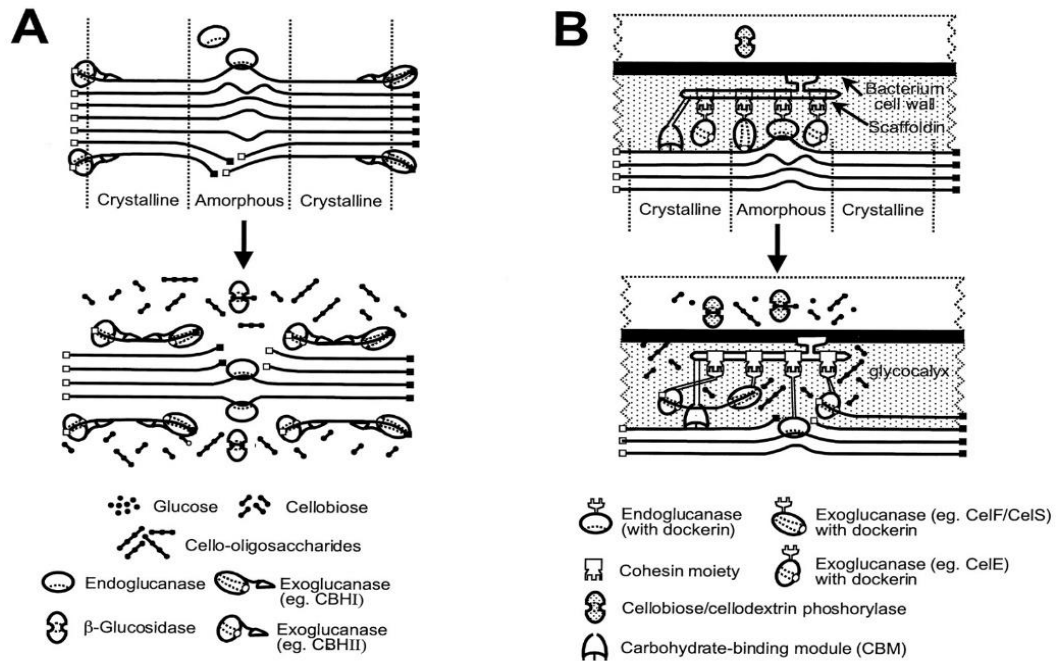
La degradación de la lignocelulosa por los seres vivos está mediada por dos tipos de sistemas enzimáticos extracelulares: hidrolasas que degradan celulosa (celulasas) y hemicelulosa (hemicelulasas); y enzimas que despolimerizan la lignina por reacciones de oxidación (peroxidasas y lacasas) (Pérez et al., 2002).

Los hongos basidiomicetos y las bacterias aerobias degradan el material celulósico a través de la producción de celulasas extracelulares (Lynd et al., 2002b). Entre este grupo se encuentran las bacterias del género *Cellulomonas* (Elberson et al., 2000) y *Streptomyces* (Alani et al., 2008), así como los hongos basidiomicetos responsables de la pudrición de la madera, que son los organismos más estudiados en esta área porque producen celulasas y actualmente dominan las aplicaciones industriales (Baldrian & Valaskova, 2008).

## **2.2.5 Celulasas**

El término celulasas involucra un complejo de por lo menos, tres actividades enzimáticas diferentes, las que a su vez existen en una multiplicidad de formas para llevar a cabo la hidrólisis total de la celulosa (Eveleigh & Montenecourt, 1979).

Las celulasas hidrolizan los enlaces 1,4-d-glucano en celulosa y producen como productos primarios glucosa, celobiosa y celuligosacáridos (Tanaka et al., 2009). Este es el complejo de enzimas múltiples más extensamente estudiado que comprende endo-glucanasas (EG), celobiohidrolasas (CBH) y glucosidasas (BGL). Las endo-glucanasas producen mellas en el polímero de celulosa exponiendo los extremos reductores y no reductores, las celobiohidrolasas actúan sobre estos extremos reductores y no reductores para liberar cello-oligosacáridos y unidades de celobiosa, y las glucosidasas escinden la celobiosa para liberar glucosa, completando la hidrólisis como se muestra en la Figura 3 (Shrestha et al., 2009).

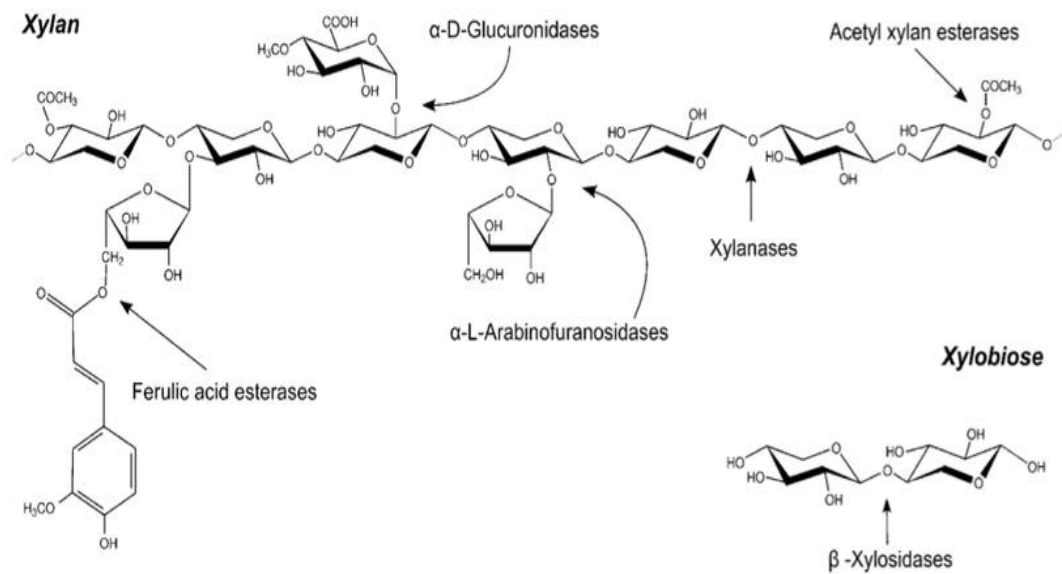


**Figura 3:** Representación esquemática de hidrólisis de la celulosa amorfa y cristalina en el sistema de celulasas complejo (A) y no complejo (B).

Fuente: Cuervo et al. (2009)

### 2.2.6 Xilanasas

El xilano es un heteropolisacárido y su degradación total produce xilosa y/o arabinosa, este proceso es llevado a cabo por un grupo de enzimas que participan sinérgicamente; entre las más conocidas las endo-β-D-xilanasas (E.C. 3.2.1.8), que rompen al azar los enlaces glicosídicos de la cadena principal de la molécula; la arabinofuranosidasa (E.C. 3.2.1.55) hidroliza las cadenas laterales de arabinosa; las acetil xilan esterasas (E.C. 3.1.1.72) liberan grupos acetatos; la glucoronidasa (E.C. 3.2.1.139) remueve las cadenas laterales de ácido glucorónico a partir de unidades de xilosa. Las β-xilosidasas (E.C. 3.2.1.37) son enzimas activas sobre oligosacáridos cortos, llevando a cabo la hidrólisis de los enlaces β-1,4-aril-xilopiranosido produciendo xilosa (Wong & Saddler, 1993).



**Figura 4:** Estructura del xilano y el sitio de ataque de las enzimas xilanolíticas.

**Nota:** El esqueleto de las cadenas de xilano está compuesto por residuos de xilopiranosos ligados mediante enlaces  $\beta$ -1-4. Este esqueleto puede estar sustituido de formas muy variadas por cadenas laterales con residuos de arabinosa, ac. glucurónico, acetilo, ac. ferúlico y ac. p-cumárico. La hidrólisis del esqueleto de xilano es llevada a cabo por xilanasas que cortan la parte interna del xilano, y  $\beta$ -xilosidasas que liberan residuos de xilosa, mientras que la remoción de las cadenas laterales es realizada por las enzimas que se esquematizan.

**Fuente:** Pastor et al., (2007)

### 2.2.7 Aplicaciones de las enzimas lignocelulolíticas a nivel industrial

Las enzimas lignocelulolíticas tienen numerosas aplicaciones industriales en la elaboración de cerveza y el vino, productos químicos, alimentos, combustible, alimentación animal, pulpa y papel, textiles y lavandería, y la agricultura (Howard et al., 2004). La celulasa es un complejo sistema enzimático que desempeña un papel importante en el medio ambiente en la degradación de la celulosa con la posterior conversión en productos útiles; también se puede utilizar como parte de la industria textil para la "bio-limpieza" de telas y la apariencia lavada con piedras de mezclilla, así como también en los limpiadores domésticos para mejorar la suavidad y el brillo de la tela y tratamientos de coloración, en tratamiento de efluentes e industrias farmacéuticas. La xilanasas, al igual que la celulasa, desempeña un papel fundamental en la degradación de la biomasa vegetal; por lo tanto, su producción ha atraído la atención de muchos investigadores. Tiene varias aplicaciones, incorporando biodegradación de lignocelulosas en alimentos, alimentación animal, textiles, biodepuración de papel usado, blanqueo de pulpa

kraft y biopulido en la industria de la celulosa y el papel (Subramaniyan & Prema, 2002). La xilanasa es muy importante para las industrias de la pulpa y el papel porque la hidrólisis de xilano estimula la eliminación de la lignina de la pulpa y, en consecuencia, disminuye la utilización de cloro como agente blanqueador (Techapun et al., 2002).

### 2.2.8 Degradación de lignocelulosa

Existen varias metodologías para realizar la transformación de la lignocelulosa entre ellas tenemos:

- **Pretrataniento**

La finalidad del pre tratamiento es remover la lignina y la hemicelulosa, reducir la cristalinidad de la celulosa e incrementar la porosidad del material, mejorando la liberación de azúcares y evitando la degradación o pérdida de carbohidratos, así como la formación de compuestos inhibitorios para la posterior fermentación; existen diversos procesos para el pre tratamiento de materiales lignocelulósicos (Sun & Cheng, 2002).

- **Métodos físicos**

**Fragmentación mecánica y pirolisis:** El material lignocelulósico es fragmentado, triturado y molido (hasta 0.2–2 mm) para aumentar el área de contacto, facilitando el acceso de las celulasas a las fibras de celulosa y aumentando su conversión (Millet et al., 1976). En la pirolisis la lignocelulosa se descompone en diferentes productos gaseosos y carbón residual cuando es tratada con temperaturas altas de hasta 300°C (Kilzer & Broido, 1965). Aunque es un método eficiente para tratar el material lignocelulósico tiene un costo elevado en comparación con otros métodos.

- **Métodos fisicoquímicos**

**Explosión por vapor:** Es uno de los pretratamientos más efectivos para las maderas duras y desechos agrícolas, pero menos eficiente para maderas suaves; la biomasa es tratada con vapor saturado a una temperatura de 160–260°C (0.69–4.83 MPa) durante cierto tiempo causando reacciones de autohidrólisis, donde la hemicelulosa y lignina son convertidos en oligómeros solubles (Clark & Mackie, 1987).

**Explosión de fibra de amoníaco (AFEX):** Este pretratamiento mejora significativamente la tasa de sacarificación de diversos sustratos lignocelulósicos los cuales son tratados con amoniaco a alta temperatura y presión (Mes-Hartree et al., 1988; Vlasenko et al., 1997; Reshamwala et al., 1995). Es eficiente para sustratos con poca lignina, logrando hasta el 90% de hidrólisis de la celulosa y hemicelulosa y no se producen inhibidores ni se requiere que el material lignocelulósico sea triturado (Holtzapple et al., 1991).

- **Métodos químicos**

**Ozonólisis:** El ozono degrada la lignina y la hemicelulosa de sustratos como la paja de trigo y de algodón, el bagazo de caña y el aserrín de pino y álamo (Ben-Ghedalia & Miron, 1981).

**Hidrólisis ácida:** El pretratamiento con ácidos mejora la hidrólisis de la celulosa, pero su costo es alto en comparación con otros pretratamientos y requiere una neutralización del pH para evitar la inhibición de la fermentación (Eggeman & Elander, 2005).

**Hidrólisis alcalina:** Es la adición de bases diluidas a la biomasa y su eficiencia depende del contenido de lignina de los materiales. El hidróxido de sodio diluido produce un hinchamiento, permitiendo un incremento en el área de superficie interna reduciendo el grado de polimerización y cristalinidad de la celulosa, causando la separación de las uniones estructurales entre la lignina y los carbohidratos (Fan et al., 1987).

**Deslignificación oxidativa:** El pretratamiento con peróxido de hidrógeno (agente oxidante) aumenta la susceptibilidad a hidrólisis enzimática al eliminar cerca del 50% de la lignina y la mayoría de la hemicelulosa, las cuales son solubilizadas liberando la glucosa durante la sacarificación (Azzam, 1989).

**Proceso organosolvente:** Se utilizan solventes orgánicos como metanol, etanol y acetona, así como también ácidos inorgánicos como catalizadores (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ó HCL) que rompen los enlaces de la lignina y la celulosa. La remoción de solventes del sistema es necesaria, ya que inhiben el crecimiento de los organismos, la hidrólisis enzimática y la fermentación (Zhao et al., 2009).

- **Métodos biológicos**

Las principales ventajas son el alto rendimiento del producto, las condiciones moderadas de la reacción, la poca generación de compuestos tóxicos y una mínima demanda de energía (Kirk & Jeffries, 1996).

Una alternativa atractiva a la bioconversión es la sacarificación y fermentación simultánea (SSF), en donde las enzimas hidrolíticas y los microorganismos fermentativos están en un mismo reactor. El proceso de SSF tiene las siguientes ventajas: (1) aumentar la tasa de hidrólisis por conversión de los azúcares que inhiben la actividad de las celulasas; (2) disminuir los requerimientos de enzimas; (3) elevar el rendimiento del producto; (4) remover inmediatamente la glucosa al producir el etanol; (5) duración corta del proceso y (6) utilización de un único reactor (Chandrakant & Bisaria, 1998b).

### **2.2.9 Sacarificación (Hidrolisis enzimática)**

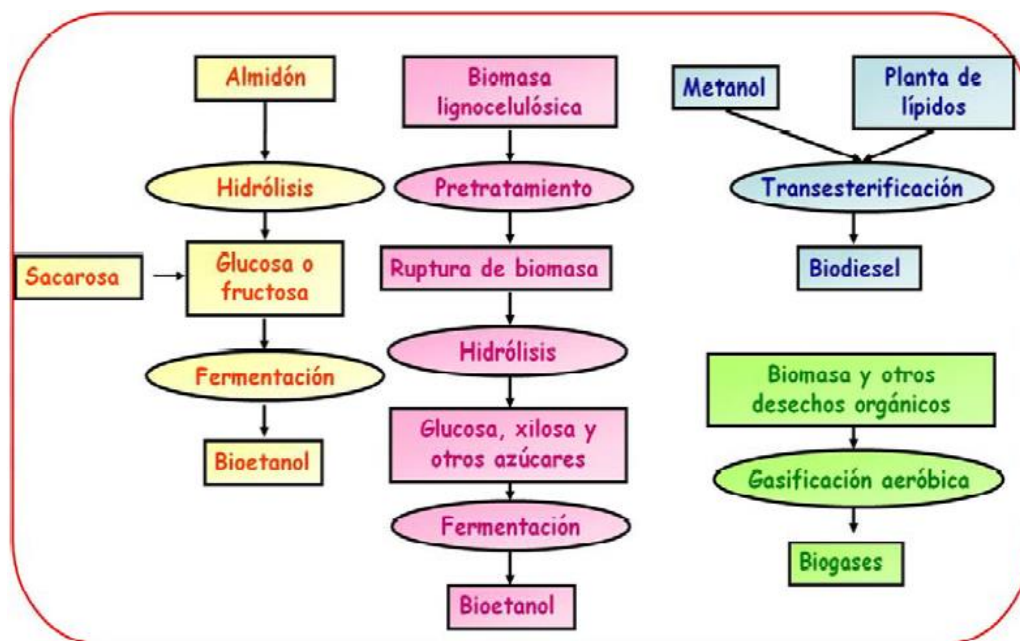
En esta etapa se produce la liberación de azúcares simples que provienen del material lignocelulósico degradado por enzimas específicas para este propósito. Las enzimas involucradas en este proceso son principalmente las endoglucanasas, exoglucanasas y  $\beta$ -glucosidasas, que trabajan sinérgicamente en la liberación de glucosa. Las endoglucanasas atacan sitios internos de las regiones de baja cristalinidad de la fibra de celulosa para transformarla en cadenas de extremos libres. Las exoglucanasas atacan los extremos libres, removiendo unidades de moléculas de celobiosa, las cuales son transformadas en glucosa por la acción de las  $\beta$ -glucosidasas (Talebnia et al, 2010).

### **2.2.10 Bioprocesos**

Hoy en día el etanol, el biodiesel y el biogás constituyen los tres mayores productos bioenergéticos. La Figura 5 muestra los diferentes sistemas de producción. El etanol puede ser producido a partir de almidón (maíz) y azúcar (caña de azúcar), son hidrolizados en monosacáridos y posteriormente fermentados en etanol. Otro proceso para la obtención de etanol es la utilización de la biomasa lignocelulósica, hay un pretratamiento de la biomasa, hidrólisis para la producción de monosacáridos y fermentación. Por otro lado, en la producción de biodiesel interviene la transesterificación de ácidos grasos. Finalmente, la biomasa puede utilizarse para producir metanol, monóxido de



carbono, hidrógeno y otros gases a través de procesos de gasificación. El etanol y el biodiesel pueden ser usados como combustibles para transporte; además, el etanol es importante materia prima en la industria química (Castro et al, 2009).



**Figura 5:** Métodos de producción de biocombustibles.

Fuente: Yuan et al. (2008)

### 2.2.11 Tecnologías limpias

La tecnología limpia (Cleantech) se define comúnmente como una gama diversa de productos, servicios y procesos que aprovechan materiales renovables y fuentes de energía, reducen drásticamente el uso de recursos naturales y reducen o eliminan emisiones y desechos (the Weitz Center for Development Studies, 2014).

La tecnología limpia comprende una amplia gama de actividades ambientales, sociales y económicas que comprenden principalmente:

**Reciclado.** Reutilización de recursos de manera eficiente reduciendo los costos de producción y contaminación.

**Energía renovable.** Introducir nuevas formas de producción de energía eólica, energía solar, biomasa, energía hidroeléctrica y biocombustibles.

**Tecnología de la información.** El uso de sistemas informatizados y procesamiento de información para reducir el uso y la tensión que se imponen a los sistemas naturales, tales como sistemas de riego computarizados, etc.

**Transporte ecológico.** Transporte con bajo impacto en el medio ambiente, como transporte no motorizado, vehículos verdes, compartición de vehículos y sistemas de transporte urbano que ahorran combustible, ahorran espacio y promueven estilos de vida saludables.

**Química verde.** Diseño de productos y procesos que minimizan el uso y generación de sustancias peligrosas. La química verde busca reducir y prevenir la contaminación en su origen.

**Tecnologías de eficiencia energética.** Reducción del consumo de energía, p. Iluminación, luces fluorescentes compactas o iluminación LED.

**Tecnologías del agua.** Desalación del agua, purificación del agua, tratamiento de aguas residuales, etc.

**Edificios verdes.** Arquitectura, diseño, construcción y mantenimiento de edificios que tienen una pequeña huella medioambiental.

## 2.3 Definición de términos

- a) **Enzima:** Las enzimas son biomoléculas especializadas en la catálisis de las reacciones químicas que tienen lugar en la célula. Son muy eficaces como catalizadores ya que son capaces de aumentar la velocidad de las reacciones químicas mucho más que cualquier catalizador artificial conocido, y además son altamente específicos ya que cada uno de ellos induce la transformación de un sólo tipo de sustancia y no de otras que se puedan encontrar en el medio de reacción (Kraut, 1998).
- b) **Actividad enzimática:** Se define la unidad de actividad enzimática (U) como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1  $\mu\text{mol}$  de sustrato en un minuto. La actividad específica es el número de unidades de enzima por miligramo de proteína (U/mg prot) o por mililitro de disolución (U/ml) (Sutcliffe & Scrutton, 2000).

- c) Hidrólisis enzimática:** Se entiende por hidrólisis enzimática la hidrólisis que se produce mediante un grupo de enzimas llamadas hidrolasas. Estas enzimas ejercen un efecto catalítico hidrolizante, es decir, producen la ruptura de enlaces por agua según:  $H-OH + R-R' \rightarrow R-H + R'-OH$ . Se nombran mediante el nombre del sustrato seguido de la palabra hidrolasa, y cuando la enzima es específica para separar un grupo en particular, éste puede utilizarse como prefijo. En algunos casos este grupo puede ser transferido por la enzima a otras moléculas y se considera la hidrólisis misma como una transferencia del grupo al agua. A veces suele utilizarse el nombre común de la enzima, por lo que muchas veces el sufijo -asa, nos indicará generalmente que se trata de una hidrolasa. Por ahora no ha sido posible encontrar una nomenclatura sistemática para todas las péptido-hidrolasas, por lo que hoy en día, para las nuevas enzimas, su nombre se forma según: fuente de péptido seguido de hidrolasa, si es necesario, de una letra para distinguirla de otra enzima (Ai-Zuhair, 2008).
- d) Sacarificación enzimática:** La sacarificación es el proceso de romper un carbohidrato complejo (como almidón) en azúcares simples o fermentables, por lo general son: sacarosa, glucosa, maltosa y lebulosa. Se puede realizar por medios químicos y enzimáticos, o acción microbiana (Lynd et al., 2002).
- e) Biocombustibles de segunda generación:** También llamado biocombustibles celulósicos, es producido de materias primas como residuos agroindustriales y gramíneas forrajeras (plantas herbáceas) de alta producción de biomasa. Su producción es significativamente más compleja, en comparación con los de 1ra generación (Martín et al., 2002).

## **CAPITULO III**

### **METODOLOGÍA**

#### **3.1 Recolección y preparación de la materia prima**

##### **3.1.1 Recolección**

Se seleccionó algunos de los residuos agrícolas que se siembran en la región Ancash considerándose: paja de trigo, tallos de quinua y bagacillo de caña de azúcar. También se usaron dos sustratos comerciales: Carboximetil celulosa (CMC) y Xilano de birchwood, como controles positivos para los procesos de liberación de azúcares (sacarificación).

##### **3.1.2 Pre tratamiento de los residuos agrícolas**

Se aplicó el método químico, mediante la hidrólisis termo-alcalina. Se lavaron los residuos agrícolas para separar los restos de tierra u otros elementos y se dejaron secar por 24 horas al ambiente. Luego los residuos se pusieron por una hora con una solución de 24 g/L de hidróxido de sodio (NaOH), este procedimiento se realiza con la finalidad de romper los enlaces de lignina; se autoclavó a 120°C, 1 atm. por 20 minutos para terminar la reacción del pretratamiento. Los residuos fueron enjuagados con agua corriente para eliminar el hidróxido de sodio hasta obtener pH de 7. Finalmente, se puso a secar a temperatura ambiental.

##### **3.1.3 Molido y tamizado**

Los residuos agrícolas pre-tratados y secos, fueron molidos en un triturador doméstico, y luego se tamizaron para obtener partículas de aproximadamente 2 mm de tamaño.

## 3.2 Elección de bacterias

### 3.2.1 Microorganismos productores de endoglucanasas y xilanasas

Se escogieron las cepas *Bacillus subtilis* DCH4 y *Cohnella laeviribosi* EHB4 provenientes de la investigación previa realizada por Tamariz (2014), estas cepas se aislaron de fuentes termales del Callejón de Huaylas, y mostraron las mejores actividades enzimáticas celulolíticas y xilanolíticas sobre carboximetil celulosa y xilano de birchwood. Las condiciones para el cultivo, producción de enzimas y actividad enzimática se muestran en las tablas 3 y 4.

**Tabla 3:** Características de cultivo de *B. subtilis* DCH4.

Nombre	<i>Bacillus subtilis</i>	
Código de extracción	D: Aislamiento por método directo	
	CH: Aguas termales de Chancos	
	4: punto de muestreo N°4	
Preparación del inóculo	Temperatura óptima	45°C
	Tiempo óptimo	8 horas
Actividad enzimática	Temperatura óptima	50°C
	pH óptimo endoglucanasa	5
	pH óptimo xilanasas	6

Fuente: Tamariz, 2014

**Tabla 4:** Características de cultivo de *C. laeviribosi* EHB4.

Nombre	<i>Cohnella laeviribosi</i>	
Código de extracción	E: Aislamiento por método de enriquecimiento ex situ	
	H: Aguas termales de Huancahuaz	
	B: Sustrato de enriquecimiento bagacillo de caña de azúcar	
	4: punto de muestreo N°4	
Preparación del inóculo	Temperatura óptima	50°C
	Tiempo óptimo	20 horas
Actividad enzimática	Temperatura óptima	60°C
	pH óptimo endoglucanasa	6
	pH óptimo xilanasas	7

Fuente: Tamariz, 2014.

### **3.3 Primera etapa: Evaluación de degradación durante el cultivo usando residuos agrícolas**

#### **3.3.1 Preparación de inóculo bacteriano**

El inóculo se preparó sembrando una asada de la cepa en 100 ml de caldo tripticasa de soya (TSB), la incubación se realizó con agitación de 180 rpm a las temperaturas y tiempos de crecimiento ya estipulados en las tablas N° 2 y 3 para cada bacteria. Se prepararon inóculos de densidad óptica de 0.008 - 0.1 y se inocularon 2,5 ml en los medios del paso C. (Tamariz, 2014).

#### **3.3.2 Preparación del medio de cultivo**

Para la fermentación en sumergido se utilizó medio salino conteniendo: 0.5% Glicerol, 0.5% NaCl, 0.01% MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0.06% CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0.01% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.001% FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O, 0.5% de peptona o nitrato de amonio y 2% residuo agrícola o 1% sustrato sintético. El pH fue ajustado a 7 y se esterilizó a 120°C, 1 Atm. por 45 minutos.

Se determinó dos tipos de medio de cultivo según la fuente nitrogenada, MSP (medio salino con peptona) y con MSA (medio salino con nitrato de amonio), cada medio fue distribuido de la siguiente manera: 50 ml por frasco, tres repeticiones por cada sustrato utilizado.

#### **3.3.3 Cultivo**

Se cultivó a las condiciones y temperaturas descritas en las tablas N° 2 y 3 para cada bacteria, el cultivo se realizó a 180 rpm de agitación rotacional. La evaluación se hizo a 72, 144, 216 horas. Los extractos obtenidos pasaron por las siguientes fases para cuantificar su actividad enzimática y determinar si hay o no degradación de sustratos mediante la liberación de azúcares reductores.

#### **3.3.4 Preparación del extracto**

Se filtró el extracto sobre papel filtro Whatman N° 1, para retirar el material grueso del cultivo y luego se filtró con filtro milliporo de 2 µm para esterilizar el extracto, con la finalidad de separar completamente la bacteria del extracto.

### **3.3.5 Cuantificación de azúcares reductores en el extracto**

Se realizó mediante el método del DNS diseñado para microplacas descrito por Tamariz (2014), con algunas modificaciones. Se mezcló 60µl del extracto con 120 µl del reactivo de DNS en una microplacas de PCR, se cerraron herméticamente y se incubaron 91,5°C por 8 minutos. Luego la microplaca fue colocada dentro de una fuente con agua helada para detener la reacción, una vez enfriada se extrajo 36 µl de la mezcla para ponerla en una microplaca de microtitulación transparente y fondo plano que contenía 160 µl de agua destilada por pozo, se mezcló bien y se midió la absorbancia a 540nm en un espectrofotómetro para microplaca.

Para las curvas estándares se usaron glucosa anhidra para la actividad endoglucanasa; y xilosa anhidra para la actividad xilanasa. Todas las muestras y los estándares fueron preparados por triplicado y las absorbancias fueron medidas dos veces.

Las absorbancias obtenidas fueron procesadas mediante la fórmula de la curva estándar de azúcares reductores µg/ml (microgramos de azúcares reductores liberados por mililitro) la cual se puede observar en el anexo 01.

### **3.4 Segunda etapa: Evaluación de actividad enzimática de los extractos de cultivos en diferentes tiempos usando los residuos agrícolas**

En esta etapa se realizó la evaluación de actividad enzimática a diferentes tiempos (16, 20, 24, 28, 48 y 72 horas) de incubación, se usaron como sustratos solo los residuos agrícolas y el MSP, basándonos en los resultados de degradación obtenidos en el ítem C. Para la esterilización del extracto se realizó lo descrito en el ítem c.4 y se prosiguió con lo siguiente:

#### **3.4.1 Actividad enzimática**

para la evaluación de la actividad enzimática de cada muestra se realizó la hidrólisis del CMC (para endoglucanasa) o xilano de birchwood (para xilanasa). Para ello se usó el extracto enzimático estéril; los componentes fueron los siguientes: Buffer fosfato 50mm pH 6 (Se utilizó para el blanco de muestra para ambas bacterias), CMC 1% y Xilano de birchwood 1% los pH se encuentran en la tabla N° 2 y 3. La hidrólisis de cada muestra se realizó en una microplaca de PCR,

con tres repeticiones para cada una, fue puesta en baño María por 2 h a temperaturas descritas en la tabla N° 2 y 3.

La cuantificación se realizó mediante la metodología de DNS descrita en el ítem c.5, la actividad se obtuvo mediante las fórmulas de actividad enzimáticas determinado por Tamariz (2014) que se pueden observar en el anexo 03, se expresan como U.I/L.

### **3.5 Tercera etapa: Sacarificación de los extractos enzimáticos seleccionados**

Para esta etapa se seleccionados los extractos con mayor actividad enzimática obtenidas en la segunda evaluación, estos fueron utilizados en la sacarificación (liberación de azúcares reductores). Los extractos seleccionados pasaron por los siguientes procesos:

#### **3.5.1 Purificación parcial del extracto enzimático**

Para ello se utilizó filtros de concentración por centrifugación Amicon Ultra-15 (de acuerdo a su protocolo del fabricante). Este procedimiento permitió la obtención de las enzimas parcialmente puras separándolas de los azúcares reductores disueltos en el extracto enzimático crudo. Finalizada la concentración de cada extracto se realizó la cuantificación de actividades enzimáticas endoglucanasas y xilanasas descrito en el ítem d.1 respectivamente, para después hacer la dilución de las enzimas en función a la actividad endoglucanasa (120 U.I/L).

#### **3.5.2 Sacarificación o hidrólisis de residuos agrícolas**

Como sustratos se usaron trigo, bagacillo, quinua, xilano y CMC, estos dos últimos como controles positivos.

Se prepararon frascos conteniendo 1.4 g de cada sustrato a los cuales se le añadió 35 ml de las enzimas concentradas diluidas en buffer fosfato 50mM pH 6 (esto se realizó para las 5 muestras de sustrato), las muestras se incubaron a baño María con agitación, se tomó una muestra en los periodos de 12, 24, 36, 48, 60 y 72 horas para ambas bacterias y a temperatura descritas en las tablas N° 2 y 3 para cada cepa bacteriana.



La cuantificación de azúcares reductores liberados se realizó mediante el método de DNS que está descrito en el ítem c.5.

Los resultados obtenidos en la lectura realizada con el método de DNS fueron procesados empleando la fórmula de la curva de glucosa (ver en el Anexo 01), seguidamente se realizó la conversión de unidades para expresar los azúcares reductores por peso de residuo mediante la siguiente fórmula:

$$\left( \frac{(AR(ug/ml) * E(ml))}{(S(g) * 0.001)} \right) = \text{Azúcares reductores liberados (mg/g)}$$

*Donde:*

AR= Azúcares Reductores, E= Extracto enzimático y S= Sustrato

### **3.6 Análisis estadístico**

Los datos de actividad enzimática y sacarificación fueron analizados con el software SPSS (versión 20.1). Se aplicó el análisis de varianza (ANOVA) por el modelo general lineal. Para encontrar diferencias significativas de las actividades enzimáticas entre las cepas y para la liberación de azúcares, se usó la prueba de Duncan's, análisis se realizaron con el nivel de significancia de 0,01.

## CAPITULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIONES

#### 4.1 Resultados

##### **A. Evaluación de degradación durante el cultivo usando residuos agrícolas y controles positivos**

Las tablas 5 y 6 muestra la cantidad de azúcares reductores liberados en los cultivos de medio salino con peptona (MSP) y medio salino con nitrato de amonio (MSA), cada medio con inóculo de *B. subtilis* DCH4 y *C. laeviribosi* EHB4. En ambas tablas se puede observar que las bacterias cultivadas tienen la capacidad de degradar los residuos lignocelulósicos utilizándolos como fuente carbonada y la evidencia de la degradación es la presencia de azúcares reductores liberados cuantificada mediante la metodología del DNS.

También según el análisis estadístico ANOVA y Duncan realizado (Ver anexo 04), en las tablas se puede observar que los niveles de degradación (liberación de azúcares reductores) fueron mayores en el medio que contiene nitrógeno orgánico (MSP) y que en ambos medios entre los sustratos de control positivo (xilano y CMC) se liberaron mayor cantidad de azúcares reductores; mientras que entre los residuos agrícolas el bagacillo tuvo los mejores resultados.

Las figuras A y B, muestran un análisis comparativo en porcentajes del nivel de degradación de los residuos agrícolas usando como microorganismo degradador a la bacteria *B. subtilis* DCH4 y el MSP, con respecto al xilano y CMC respectivamente; siendo estos controles positivos considerados como un 100% de degradación. Según el análisis estadístico Duncan aplicado a un nivel de confianza de 1% ( $p < 0,01$ ) el residuo agrícola que presentó mayor degradación en comparación con el xilano

(100%) fue el bagacillo a 72 horas de cultivo (44%), seguido de la quinua a 216 horas de cultivo (43%) y del bagacillo a 144 horas de cultivo (41%). En el caso del análisis Duncan aplicado a un nivel de confianza de 1% ( $p < 0,01$ ) para la comparación de degradación de los residuos agrícolas con respecto al CMC (100%), el mejor resultado de degradación la obtuvo la quinua a 216 horas de cultivo (68%), seguido del bagacillo a 144 horas de cultivo (63%) y del bagacillo a 216 horas de cultivo (61%).

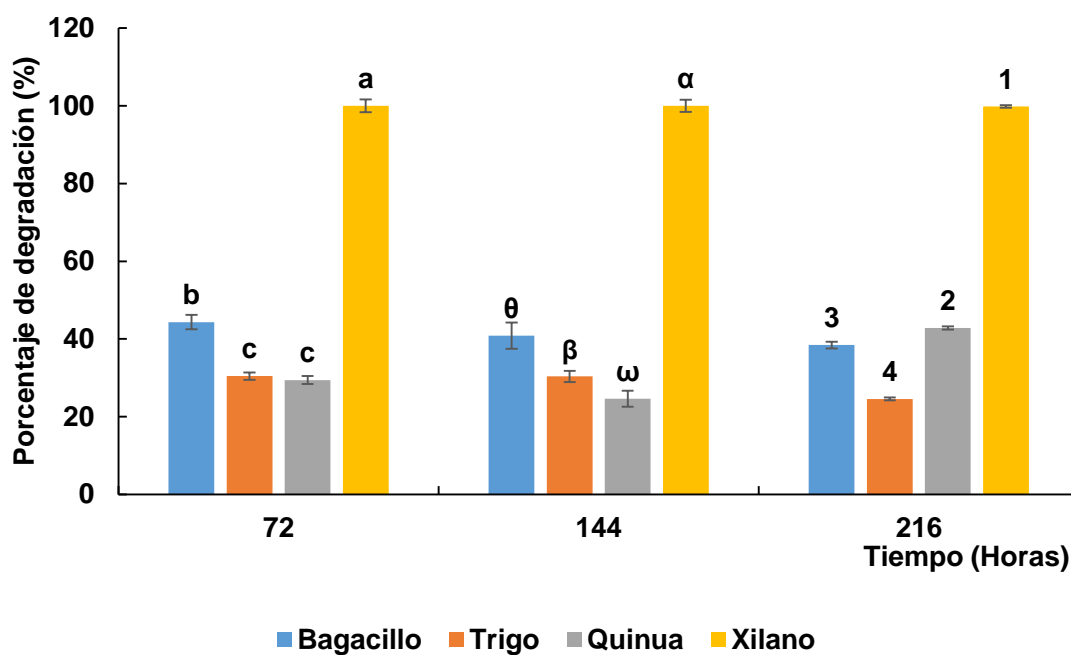
En las figuras C y D se muestran los porcentajes de degradación de los residuos agrícolas usando como microorganismo degradador a la bacteria *C. laeviribosi* EHB4 en MSP, con respecto al xilano y CMC respectivamente, donde también se consideran a los controles positivos como el 100% de degradación. Se aplicó análisis Duncan a un nivel de confianza de 1% ( $p < 0,01$ ), los mejores resultados de degradación de los residuos agrícolas con respecto al xilano (100%) fueron el bagacillo a 72 horas de cultivo (30%), bagacillo a 144 horas de cultivo (24%) y bagacillo a 216 horas de cultivo (22%). El mismo análisis fue aplicado a los porcentajes de degradación de los residuos agrícolas con respecto al CMC (100%), siendo los mejores resultados en bagacillo a 72 horas de cultivo (44%), seguido de bagacillo a 144 horas de cultivo (33%) y también trigo y quinua a 72 horas de cultivo (ambas 22%).

Por los resultados obtenidos se determinó que el mejor medio de cultivo es el MSP (medio salino con peptona) y que la evaluación de degradación y producción enzimática debe ser dar en tiempos igual y menores a 72 horas.

**Tabla 5:** Degradación de sustratos usando inóculo de *B. subtilis* DCH4, expresado como liberación de azúcares reductores evaluados a 72, 144 y 216 horas.

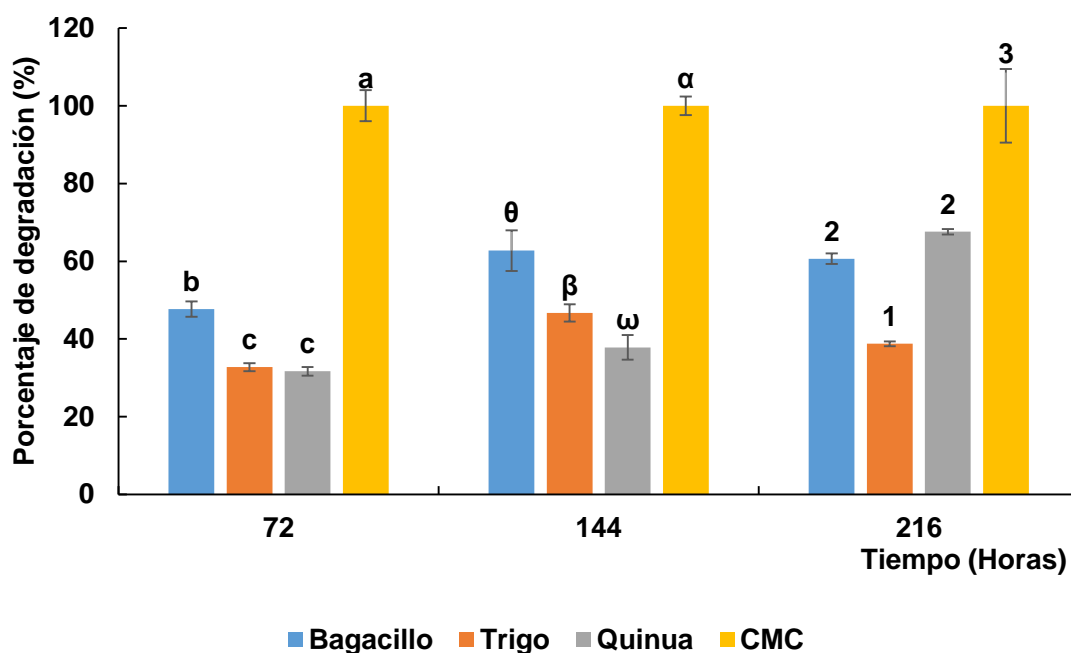
Sustratos	Azúcares reductores liberados en el cultivo (ug/ml)					
	MSP			MSA		
	72	144	216	72	144	216
<b>Bagacillo</b>	1958.67 ± 80.98 <sup>d</sup>	1042.08 ± 86.80 <sup>h</sup>	546.13 ± 12.18 <sup>k</sup>	112.49 ± 58.24 <sup>EF</sup>	78.57 ± 30.12 <sup>FE</sup>	58.99 ± 5.64 <sup>FE</sup>
<b>Trigo</b>	1345.00 ± 42.32 <sup>gf</sup>	775.35 ± 36.76 <sup>j</sup>	349.06 ± 5.23 <sup>l</sup>	124.31 ± 32.78 <sup>E</sup>	101.46 ± 38.46 <sup>FE</sup>	79.16 ± 26.44 <sup>FE</sup>
<b>Quinoa</b>	1300.75 ± 45.40 <sup>g</sup>	628.72 ± 52.31 <sup>k</sup>	608.78 ± 6.24 <sup>k</sup>	100.96 ± 42.10 <sup>FE</sup>	75.37 ± 51.82 <sup>FE</sup>	54.81 ± 17.95 <sup>F</sup>
<b>Xilano</b>	4416.91 ± 74.06 <sup>a</sup>	2550.97 ± 40.46 <sup>c</sup>	1418.48 ± 5.10 <sup>f</sup>	980.31 ± 53.76 <sup>A</sup>	642.35 ± 29.11 <sup>B</sup>	278.41 ± 33.63 <sup>D</sup>
<b>CMC</b>	4105.58 ± 164.14 <sup>b</sup>	1660.98 ± 39.87 <sup>e</sup>	900.51 ± 85.07 <sup>i</sup>	583.53 ± 28.98 <sup>C</sup>	263.01 ± 23.42 <sup>D</sup>	87.65 ± 52.03 <sup>FE</sup>

**Nota:** Los valores son las medias de seis replicas ± SD. Las letras indican los grupos en las columnas según el análisis Duncan (p<0,01). Los extractos MSP y MSA fueron analizados estadísticamente por separado.



**Figura A:** Análisis comparativo del nivel de degradación por liberación de azúcares reductores de los residuos agrícolas con respecto a xilano, usando *B. subtilis* DCH4 y el medio MSP.

**Nota:** Los porcentajes se calcularon considerando como el 100% a los azúcares liberados por xilano en cada repetición. La degradación de los sustratos de residuos agrícolas es menor en comparación al xilano, la mayor degradación fue la del bagacillo a 72 horas (44%). Los valores son las medias de seis replicas  $\pm$  SD. Las letras indican los grupos en las columnas según el análisis Duncan ( $p < 0,01$ ).



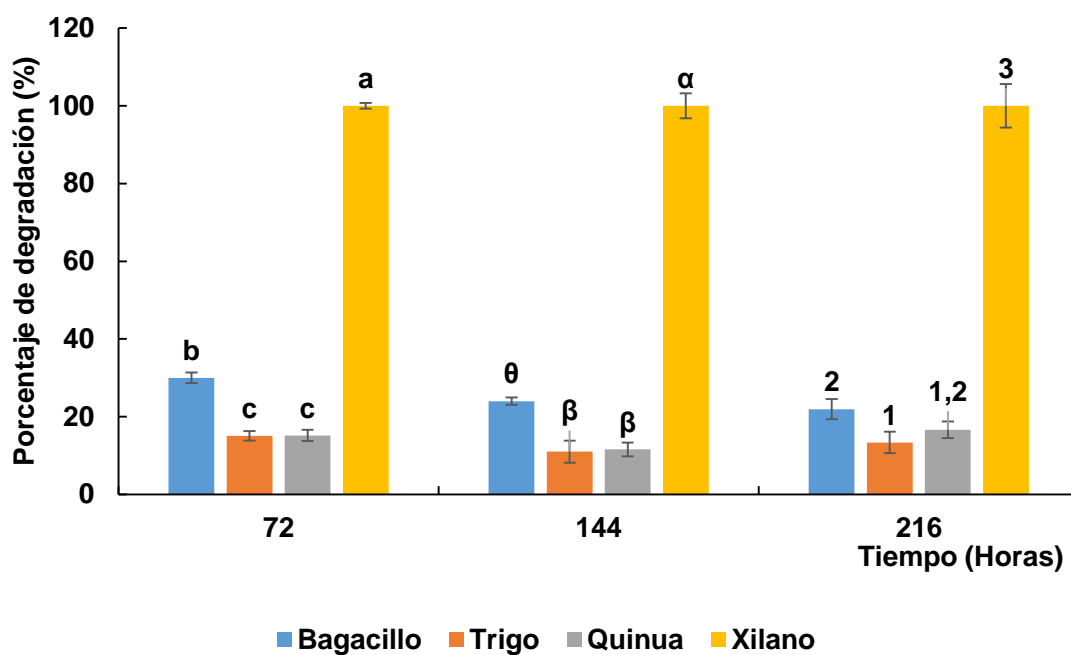
**Figura B:** Análisis comparativo del nivel de degradación por liberación de azúcares reductores de los residuos agrícolas con respecto a CMC, usando *B. subtilis* DCH4 y el medio MSP.

**Nota:** Los porcentajes se calcularon considerando como el 100% a los azúcares liberados por CMC en cada repetición. La degradación de los sustratos de residuos agrícolas es menor en comparación al CMC, la mayor degradación fue la de la quinua a 216 horas (68%). Los valores son las medias de seis replicas  $\pm$  SD. Las letras indican los grupos en las columnas según el análisis Duncan ( $p < 0,01$ ).

**Tabla 6:** Degradación de sustratos usando inóculo de *C. laeviribosi* EHB4, expresado como liberación de azúcares reductores evaluados a 72, 144 y 216 horas.

Sustratos	Azúcares reductores liberados en el cultivo (ug/ml)					
	MSP			MSA		
	72	144	216	72	144	216
<b>Bagacillo</b>	690.25 ± 31.56 <sup>g</sup>	423.33 ± 16.95 <sup>h</sup>	215.36 ± 25.32 <sup>j</sup>	468.06 ± 36.25 <sup>D</sup>	197.30 ± 23.36 <sup>G</sup>	87.49 ± 31.53 <sup>I</sup>
<b>Trigo</b>	347.46 ± 28.18 <sup>i</sup>	194.38 ± 49.84 <sup>j</sup>	131.26 ± 27.16 <sup>k</sup>	223.68 ± 20.34 <sup>GF</sup>	121.98 ± 39.21 <sup>IH</sup>	76.68 ± 13.25 <sup>I</sup>
<b>Quinua</b>	349.53 ± 33.31 <sup>i</sup>	204.73 ± 31.53 <sup>j</sup>	163.33 ± 21.36 <sup>kj</sup>	243.56 ± 25.66 <sup>F</sup>	136.60 ± 22.69 <sup>H</sup>	83.12 ± 24.27 <sup>I</sup>
<b>Xilano</b>	2299.07 ± 16.41 <sup>a</sup>	1764.08 ± 56.26 <sup>b</sup>	981.25 ± 54.83 <sup>e</sup>	1097.91 ± 27.73 <sup>A</sup>	746.78 ± 43.15 <sup>C</sup>	138.89 ± 27.59 <sup>H</sup>
<b>CMC</b>	1584.21 ± 19.56 <sup>c</sup>	1291.35 ± 64.36 <sup>d</sup>	880.68 ± 25.50 <sup>f</sup>	983.74 ± 22.38 <sup>B</sup>	337.67 ± 25.89 <sup>E</sup>	96.70 ± 28.73 <sup>IH</sup>

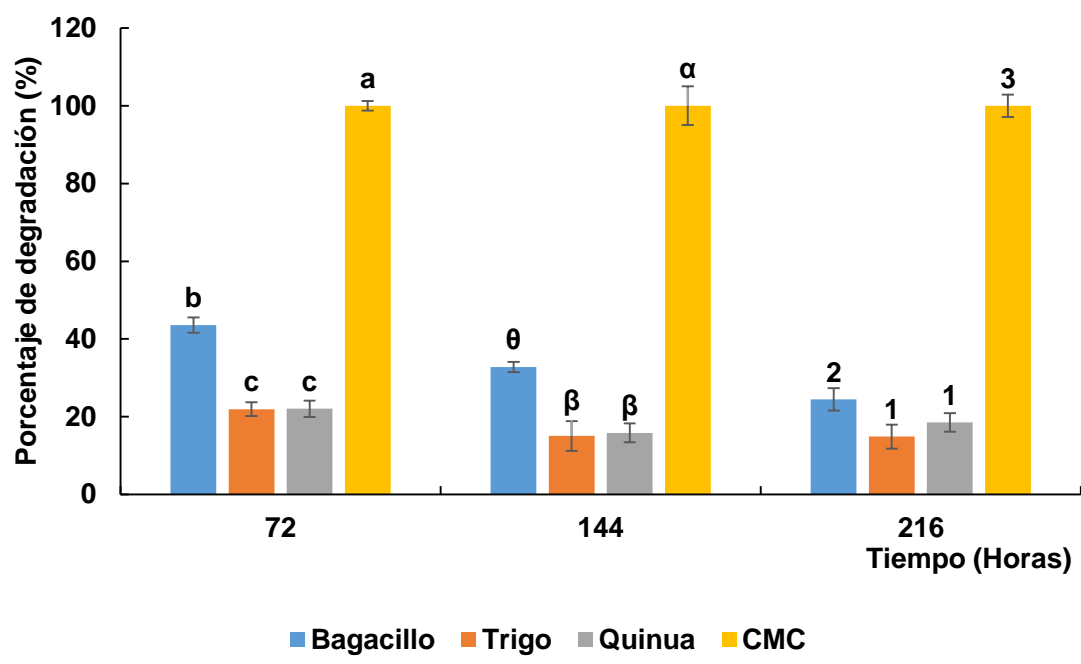
**Nota:** Los valores son las medias de seis replicas ± SD. Las letras indican los grupos en las columnas según el análisis Duncan ( $p < 0,01$ ). Los extractos MSP y MSA fueron analizados estadísticamente por separado.



**Figura C:** Análisis comparativo del nivel de degradación por liberación de azúcares reductores de los residuos agrícolas con respecto a xilano, usando *C. laeviribosi* EHB4 y el medio MSP.

**Nota:** Los porcentajes se calcularon considerando como el 100% a los azúcares liberados por xilano en cada repetición. La degradación de los sustratos de residuos agrícolas es menor en comparación al xilano, la mayor degradación fue la del bagacillo a 72 horas (30%). Los valores son las medias de seis replicas  $\pm$  SD. Las letras indican los grupos en las columnas según el análisis Duncan ( $p < 0,01$ ).





**Figura D:** Análisis comparativo del nivel de degradación por liberación de azúcares reductores de los residuos agrícolas con respecto a CMC, usando *C. laeviribosi* EHB4 y el medio MSP.

**Nota:** Los porcentajes se calcularon considerando como el 100% a los azúcares liberados por CMC en cada repetición. La degradación de los sustratos de residuos agrícolas es menor en comparación al CMC, la mayor degradación fue la del bagacillo a 72 horas (44%). Los valores son las medias de seis replicas ± SD. Las letras indican los grupos en las columnas según el análisis Duncan ( $p < 0,01$ ).

## **B. Evaluación de actividad enzimática endoglucanasa y xilanasas usando los residuos agrícolas y a diferentes tiempos de cultivo**

Basándonos en los resultados de la primera etapa (Tablas 5 y 6) se determinó que el mejor medio de cultivo es el medio salino con peptona (MSP) y que la evaluación de actividad enzimática directamente relacionada con la producción de enzimas hidrolíticas (endoglucanasas y xilanasas) se debería realizar a tiempos menores o iguales a 72 horas.

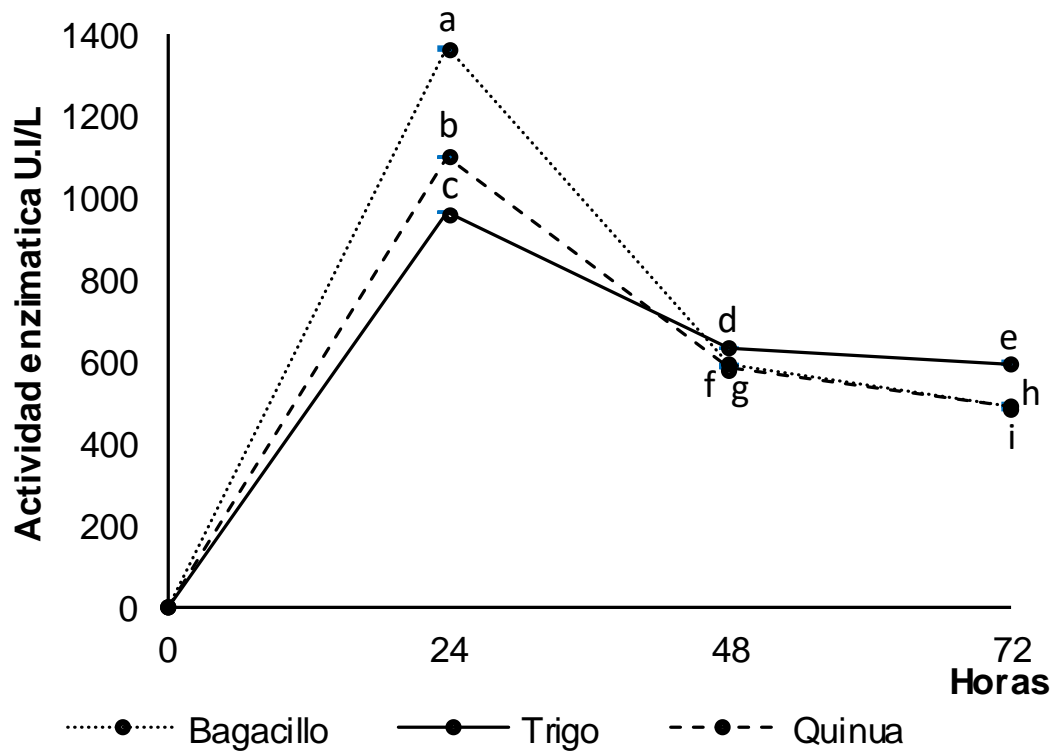
### **b.1 Actividad enzimática endoglucanasa y xilanasas de *B. subtilis* DCH4 de extractos de cultivos usando residuos agrícolas**

En el caso de *B. subtilis* DCH4, las Figuras 6 y 7 muestran los resultados de las actividades enzimáticas xilanasas y endoglucanasas que se evaluaron a tiempos de 24, 48 y 72 horas de cultivo y en las Figuras 8 y 9 se muestra los resultados de la evaluación a tiempos de 16, 20, 24 y 28 horas de cultivo, también de actividades enzimáticas xilanasas y endoglucanasas respectivamente.

El análisis estadístico del ANOVA muestra diferencias estadísticamente significativas a un nivel de confianza de 1% ( $p=0,01$ ) de los resultados obtenidos por cada grupo de muestra (Ver anexo 05).

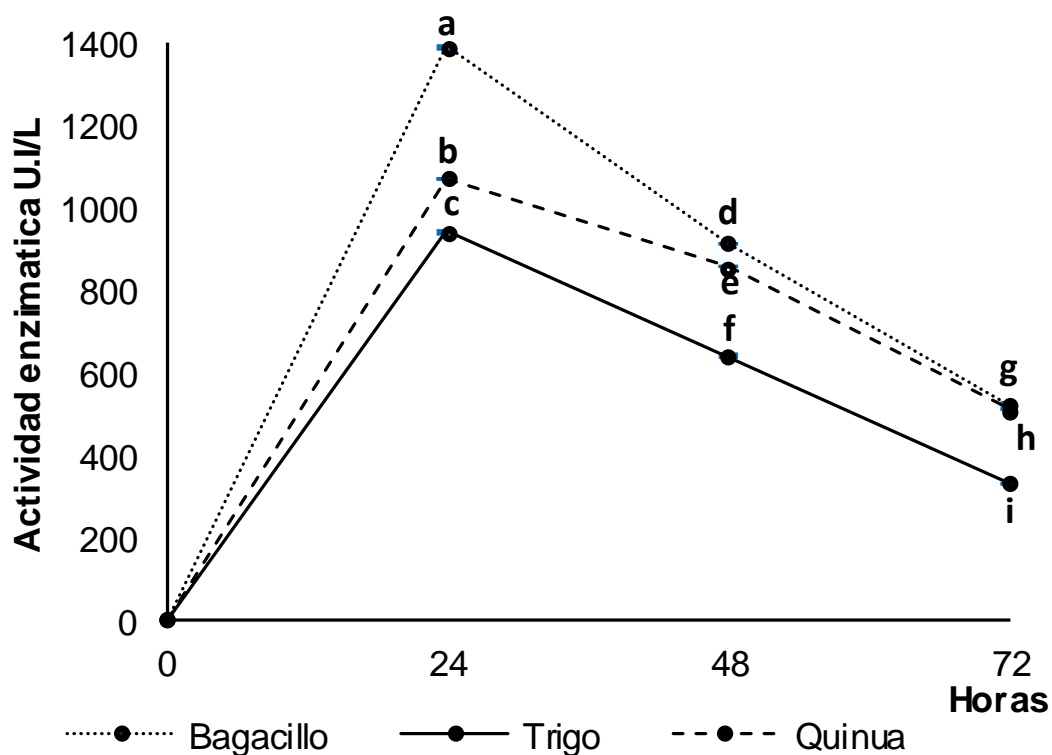
La Figura 6 muestra, según el análisis Duncan aplicado a un nivel de confianza de 1% ( $p=0,01$ ), que la mayor actividad enzimática xilanasas se logró cuando se usó bagacillo como sustrato carbonado, obteniéndose hasta 1367.6 U.I/L a 24 horas de cultivo, seguida de la quinua con 1102.27 U.I/L a 24 horas de cultivo y Trigo con 966.16 U.I/L a 24 horas de cultivo.

Del mismo modo en la Figura 7, según el análisis Duncan aplicado a un nivel de confianza de 1% ( $p=0,01$ ), la mayor actividad enzimática endoglucanasa fue usando el sustrato de bagacillo a 24 horas de cultivo obteniéndose un valor de 1392.67 U.I/L, seguido de la quinua con 1073.67 U.I/L a 24 horas de cultivo y del trigo con 942.67 U.I/L a 24 horas de cultivo.



**Figura 6:** Actividad enzimática xilanasa del cultivo de *B. subtilis* DCH4 en MSP, usando los sustratos de Bagacillo, Trigo y Quinoa, evaluados a tiempos de 24, 48 y 72 horas.

**Nota:** Según los valores registrados en la figura el mejor resultado de actividad enzimática xilanasa fue 1367.6 U./L, usando el sustrato de bagacillo con a 24 horas de cultivo. Los valores de actividad enzimática son las medias de seis replicas  $\pm$  SD. Las letras indican los grupos según el análisis Duncan ( $p < 0,01$ ).



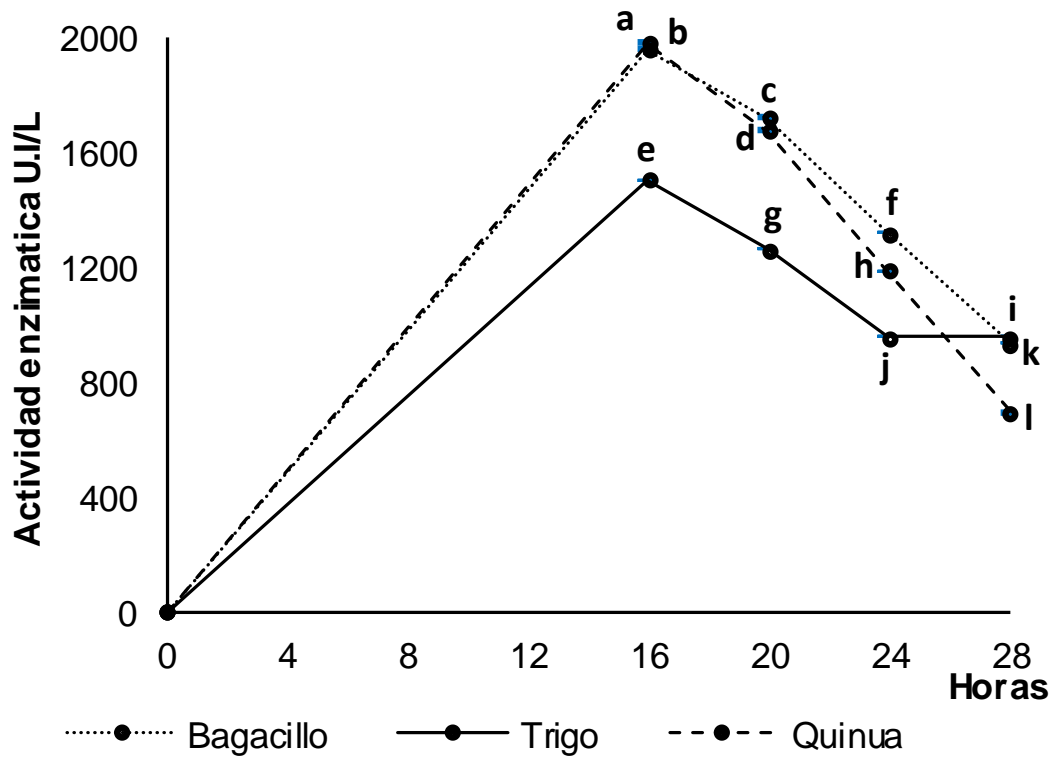
**Figura 7:** Actividad enzimática endoglucanasa del cultivo de *B. subtilis* DCH4 en MSP, usando los sustratos de Bagacillo, Trigo y Quinoa, evaluados a tiempos de 24, 48 y 72 horas.

**Nota:** Según los valores registrados en la figura el mejor resultado de actividad enzimática endoglucanasa fue 1392.67 U./L, usando el sustrato de bagacillo con a 24 horas de cultivo. Los valores de actividad enzimática son las medias de seis replicas  $\pm$  SD. Las letras indican los grupos según el análisis Duncan ( $p < 0,01$ ).

Para lograr una mejor aproximación al tiempo de mayor producción, de acuerdo a los resultados anteriores, se hizo un segundo cultivo evaluando tiempos de 16, 20, 24 y 28 horas (Fig. 8 y 9).

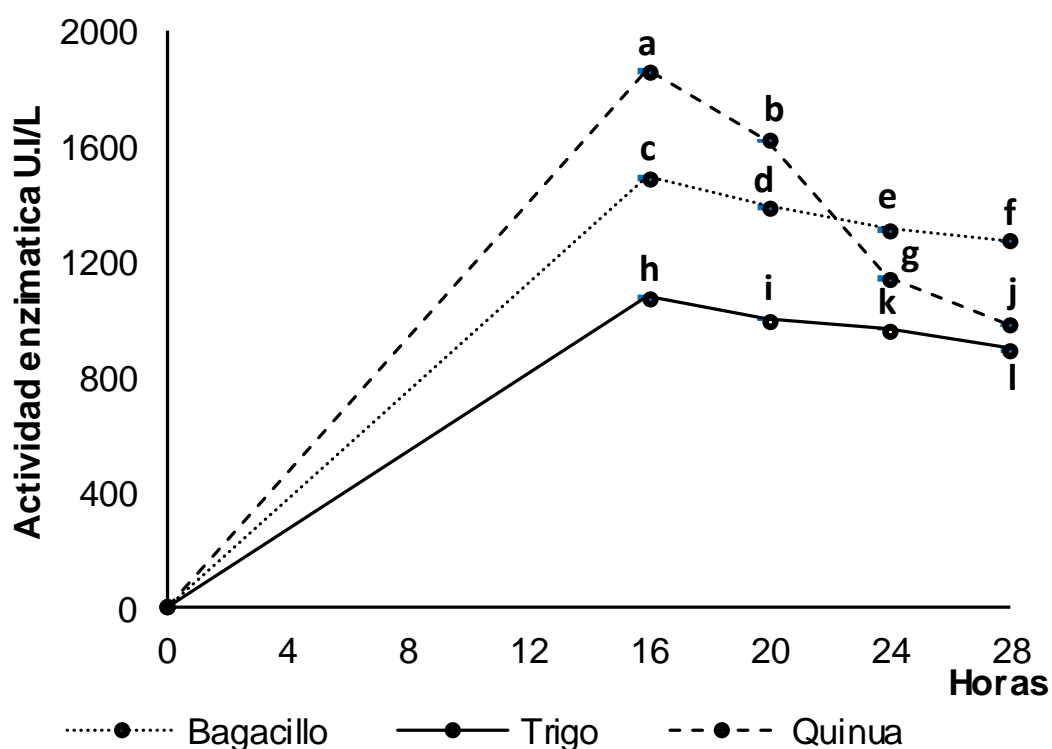
En la Figura 8, según el análisis Duncan aplicado a un nivel de confianza de 1% ( $p=0,01$ ), la mayor actividad enzimática xilanasa se obtuvo usando el sustrato de quinua con 1986.43 U./L y bagacillo con 1963.82 U./L ambas a 16 horas de cultivo, seguida por el bagacillo con 1726.15 U./L a 20 horas de cultivo.

Igualmente en la Figura 9 se realizó el análisis Duncan aplicado a un nivel de confianza de 1% ( $p=0,01$ ), mostrando que la mayor actividad enzimática endoglucanasa se obtuvo usando como sustrato a la quinua con 1865.67 U./L a 16 horas de cultivo, seguida por la quinua con 1623.69 U./L a 20 horas de cultivo y el bagacillo con 1492.79 U./L a 16 horas de cultivo.



**Figura 8:** Actividad enzimática xilanasa del cultivo de *B. subtilis* DCH4 en MSP, usando los sustratos de Bagacillo, Trigo y Quinoa, evaluados a tiempos de 16, 20, 24 y 28 horas.

**Nota:** Según los valores registrados en la figura el mejor resultado de actividad enzimática xilanasa fue 1986.43 U./L usando el sustrato de quinua y 1963.82 U./L usando bagacillo ambas a 16 horas de cultivo. Los valores de actividad enzimática son las medias de seis replicas  $\pm$  SD. Las letras indican los grupos según el análisis Duncan ( $p < 0,01$ ).



**Figura 9:** Actividad enzimática endoglucanasa del cultivo de *B. subtilis* DCH4 en MSP, usando los sustratos de Bagacillo, Trigo y Quinoa, evaluados a tiempos de 16, 20, 24 y 28 horas.

**Nota:** Según los valores registrados en la figura el mejor resultado de actividad enzimática endoglucanasa fue usando el sustrato de quinua a 16 horas de cultivo con 1866.67 U./L. Los valores de actividad enzimática son las medias de seis replicas  $\pm$  SD. Las letras indican los grupos según el análisis Duncan ( $p < 0,01$ ).

## b.2 Actividad enzimática endoglucanasa y xilanasas de *C. laeviribosi* EHB4 de extractos de cultivos usando residuos agrícolas

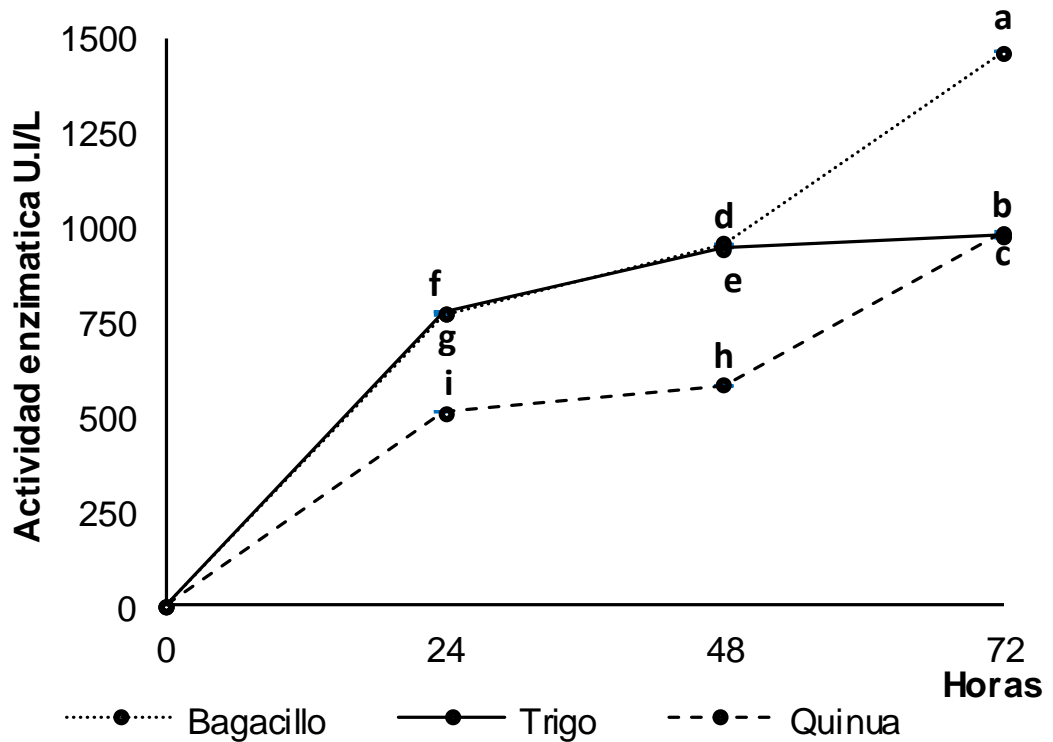
Para *C. laeviribosi* EHB4, las Figuras 10 y 11 muestran los resultados para las actividades xilanasas y endoglucanasas que fueron evaluadas a 24, 48 y 72 horas de cultivo; a su vez las Figuras 12 y 13 nos muestran los resultados de la evaluación a tiempos de 16, 20, 24 y 28 horas de cultivo.

El análisis estadístico del ANOVA muestra diferencias estadísticamente significativas a un nivel de confianza de 1% ( $p = 0,01$ ) de los resultados obtenidos por cada grupo de muestra (Ver anexo 05).

La Figura 10 muestra, según el análisis Duncan aplicado a un nivel de confianza de 1% ( $p = 0,01$ ), que la mayor actividad enzimática xilanasas se dio usando el bagacillo como sustrato carbonado, obteniéndose hasta 1464.56 U./L a 72 horas

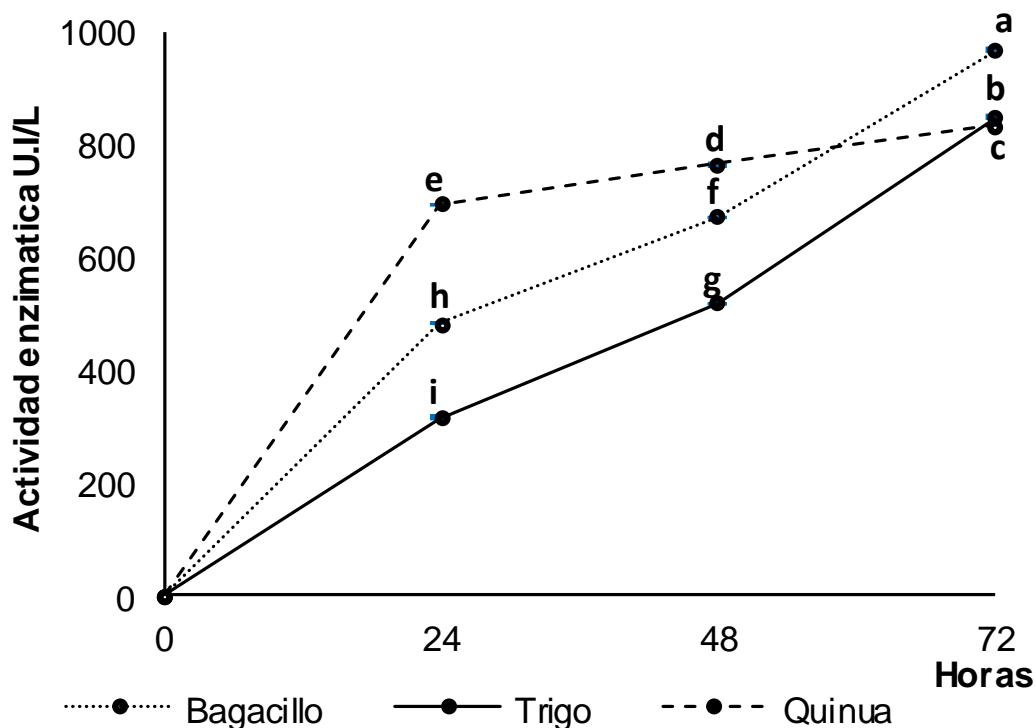
de cultivo, seguida de la quinua con 987.41 U.I/L a 72 horas de cultivo y del Trigo con 978.41 U.I/L a 72 horas de cultivo.

Del mismo modo en la Figura 11, según el análisis Duncan aplicado a un nivel de confianza de 1% ( $p=0,01$ ), la mayor actividad enzimática endoglucanasa fue usando el sustrato de bagacillo a 72 horas de cultivo obteniéndose un valor de 969.32 U.I/L, seguido del trigo con 850.77 U.I/L a 72 horas de cultivo y de la quinua con 835.83 U.I/L a 72 horas de cultivo.



**Figura 10:** Actividad Xilanasas del cultivo de *C. laeviribosi* EHB4 en MSP, usando los sustratos de Bagacillo, Trigo y Quinoa, evaluados a tiempos de 24, 48 y 72 horas.

**Nota:** Según los valores registrados en la figura el mejor resultado de actividad xilanasas fue 1464.56 U.I/L, usando el sustrato de bagacillo con a 72 horas de cultivo. Los valores de actividad enzimática son las medias de seis replicas  $\pm$  SD. Las letras indican los grupos según el análisis Duncan ( $p<0,01$ ).



**Figura 11:** Actividad Endoglucanasa del cultivo de *C. laeviribosi* EHB4 en MSP, usando los sustratos de Bagacillo, Trigo y Quinoa, evaluados a tiempos de 24, 48 y 72 horas.

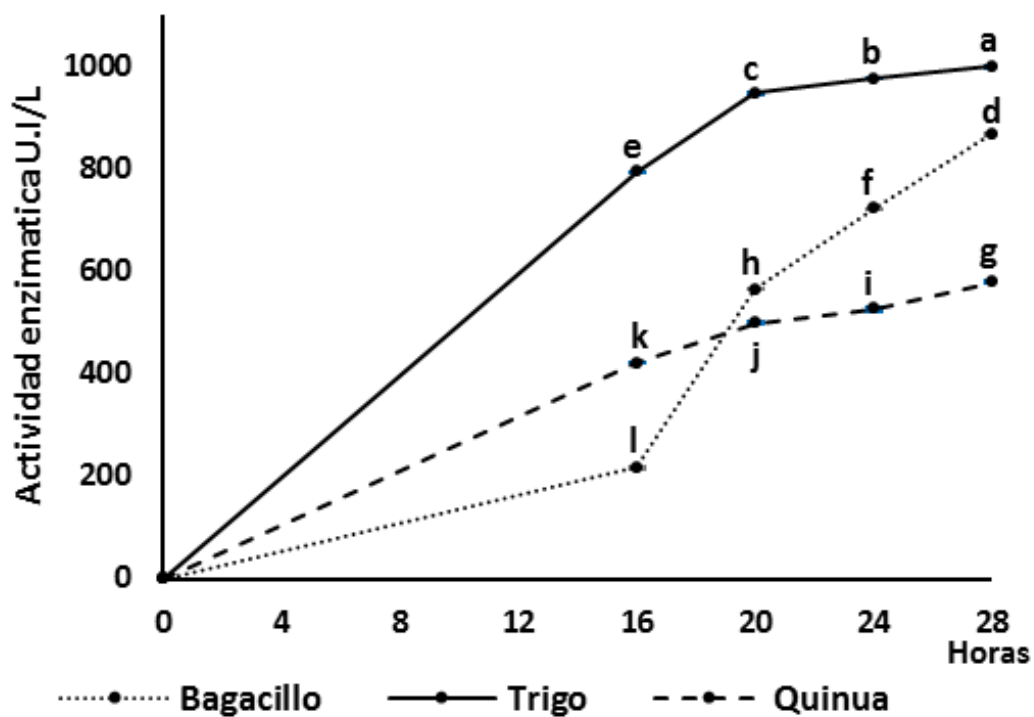
**Nota:** Según los valores registrados en la figura el mejor resultado de actividad endoglucanasa fue 969.32 U.I/L usando el sustrato de bagacillo a 72 horas de cultivo. Los valores de actividad enzimática son las medias de seis replicas  $\pm$  SD. Las letras indican los grupos según el análisis Duncan ( $p < 0,01$ ).

Se realizó un segundo cultivo evaluando a tiempos de 16, 20, 24 y 28 horas para tener una mejor aproximación al tiempo de mayor producción enzimática (Fig. 12 y 13).

En la Figura 12, según el análisis Duncan aplicado a un nivel de confianza de 1% ( $p = 0,01$ ), la mayor actividad enzimática xilanasas se obtuvo a 28 horas de cultivo usando el sustrato de trigo con 1000.10 U.I/L, seguido del trigo con 976.32 U.I/L ambas a 24 horas de cultivo y del trigo con 946.94 U.I/L a 20 horas de cultivo.

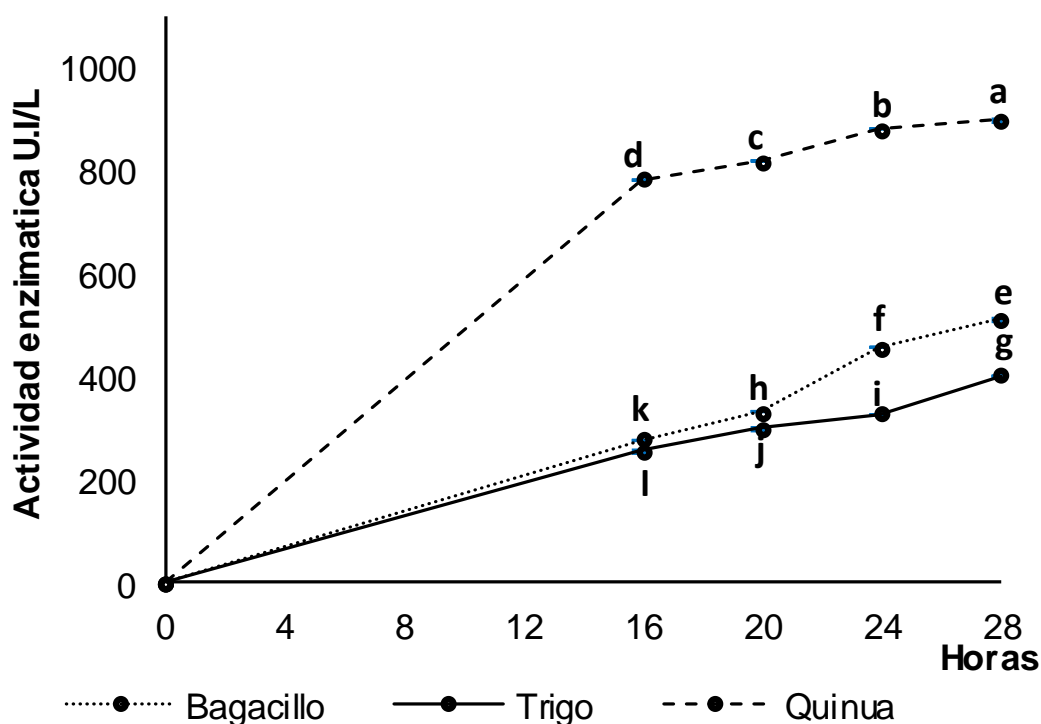
Igualmente en la Figura 13 se realizó el análisis Duncan aplicado a un nivel de confianza de 1% ( $p = 0,01$ ), mostrando que la mayor actividad enzimática endoglucanasa se obtuvo usando como sustrato a la quinua con 901.23 U.I/L a 28 horas de cultivo, seguida por la quinua con 881.62 U.I/L a 24 horas de cultivo y de la quinua con 819.44 U.I/L a 20 horas de cultivo.





**Figura 12:** Actividad Xilanasas del cultivo de *C. laeviribosi* EHB4 en MSP, usando los sustratos de Bagacillo, Trigo y Quinoa, evaluados a tiempos de 16, 20, 24 y 28 horas.

**Nota:** Según los valores registrados en la figura el mejor resultado de actividad xilanasas fue 1000.10 U.I./L usando el sustrato de trigo a 28 horas de cultivo. Los valores de actividad enzimática son las medias de seis replicas  $\pm$  SD. Las letras indican los grupos según el análisis Duncan ( $p < 0,01$ ).



**Figura 13:** Actividad Endoglucanasa del cultivo de *C. laeviribosi* EHB4 en MSP, usando los sustratos de Bagacillo, Trigo y Quinoa, evaluados a tiempos de 16, 20, 24 y 28 horas.

**Nota:** Según los valores registrados en la figura el mejor resultado de actividad endoglucanasa fue 901.23 U./L usando el sustrato de quinua a 28 horas de cultivo. Los valores de actividad enzimática son las medias de seis replicas  $\pm$  SD. Las letras indican los grupos según el análisis Duncan ( $p < 0,01$ ).

### C. Sacarificación de residuos agrícolas usando los extractos enzimáticos seleccionados

Analizando los resultados de actividades enzimáticas endoglucanasas y xilanasas a distintos tiempos de cultivo de la etapa anterior se seleccionaron tres extractos para esta etapa de sacarificación: Los cultivos de 16 horas de *B. subtilis* usando quinua (Q16H-BS) y bagacillo (B16H-BS); y cultivo de 72 horas de *C. laeviribosi* usando bagacillo (B72H-CL).

En esta etapa los residuos agrícolas (Bagacillo, Trigo y Quinoa) y los controles positivos (xilano y CMC) fueron expuestos para su degradación sobre los extractos enzimáticos seleccionados B16H-BS, Q16H-BS y B72H-CL. La sacarificación se evaluó en periodos de 12, 24, 36, 48, 60 y 72 horas.

### **c.1 Sacarificación usando extractos enzimáticos crudos de *B. subtilis* DCH4**

En las Figuras 14 y 15 se muestra los resultados de la sacarificación (degradación liberando azúcares reductores) de los sustratos de Bagacillo, Trigo, Quinoa, Xilano y CMC, sobre los extractos B16H-BS y Q16H-BS respectivamente. Los resultados son expresados en miligramo de azúcares reductores liberados por gramo de sustrato utilizado (mg/g).

Según el análisis Duncan aplicado a un nivel de confianza de 1% ( $p=0,01$ ), el extracto crudo B16H-BS obtuvo el mejor resultado sobre el sustrato de trigo con 51.88 mg/g, seguido de sustrato de la quinua con 32.69 mg/g y en menor cantidad el sustrato de bagacillo con 6.10 mg/g. Dentro de los controles positivos, mediante su degradación, el que presento resultados más altos en comparación a los residuos agrícolas fue el xilano que expuesto al extracto crudo B16H-BS libero mayor cantidad de azúcares reductores con 149.81 mg/g; a su vez el sustrato de CMC presentó una liberación menor de azúcares reductores dando como resultado 46.27 mg/g.

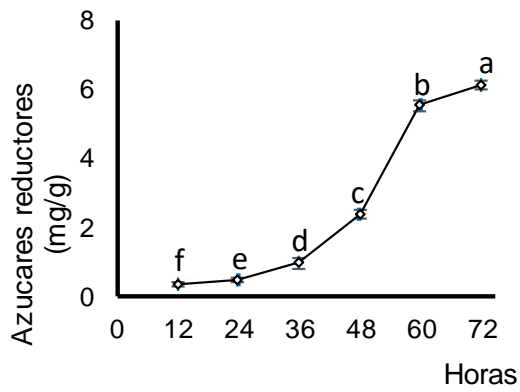
Para los resultados de liberación de azúcares reductores (degradación) de los residuos agrícolas (bagacillo, trigo y quinua) y controles positivos (xilano y CMC) usando el extracto crudo Q16H-BS también se aplicó en análisis Duncan a un nivel de confianza de 1% ( $p=0,01$ ), el mejor resultado se dio usando el sustrato de trigo con 54.44 mg/g, seguido de la quinua con 29.52 mg/g y en menor cantidad el sustrato de bagacillo con 12.50 mg/g. En los controles positivos el mejor resultado se dio en el xilano con 142.00 mg/g; mientras que con el sustrato de CMC el resultado fue menor obteniéndose 20.90 mg/g.

### **c.2 Sacarificación usando extractos enzimáticos crudos de *C. laeviribosi* EHB4**

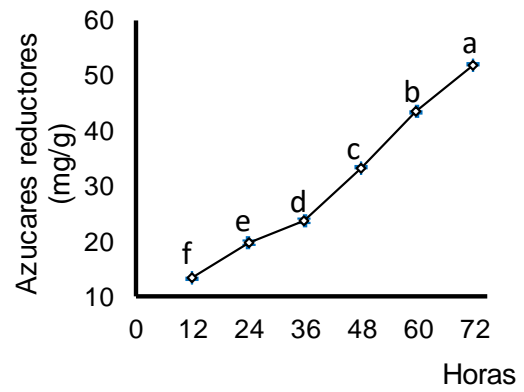
En la Figura 16 se observan los resultados de la sacarificación (degradación liberando azúcares reductores) de los sustratos de Bagacillo, Trigo, Quinoa, Xilano y CMC, sobre el extracto crudo B72H-CL. Los resultados son expresados en miligramo de azúcares reductores liberados por gramo de sustrato utilizado (mg/g).

Según el análisis Duncan aplicado a un nivel de confianza de 1% ( $p=0,01$ ), el extracto crudo B72H-CL obtuvo el mejor resultado, dentro de los residuos agrícolas, fue usando como sustrato el trigo, el cual libero 128.88 mg/g de azúcares reductores, seguido del sustrato de quinua con 24.69 mg/g y del sustrato de bagacillo con 20.63 mg/g. En los controles positivos el mejor resultado fue dado por el sustrato de xilano con 185.50 mg/g siendo mayor a los resultados obtenidos por los residuos agrícolas; para el CMC el resultado fue menor con 14.96 mg/g.

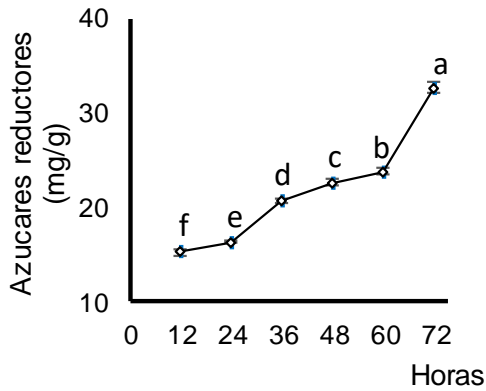
(a)



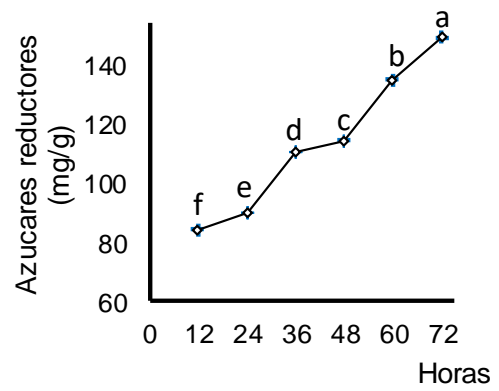
(b)



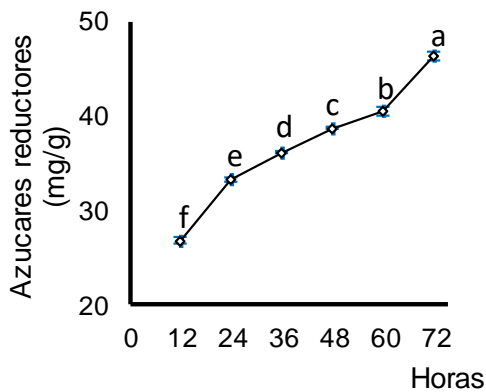
(c)



(d)



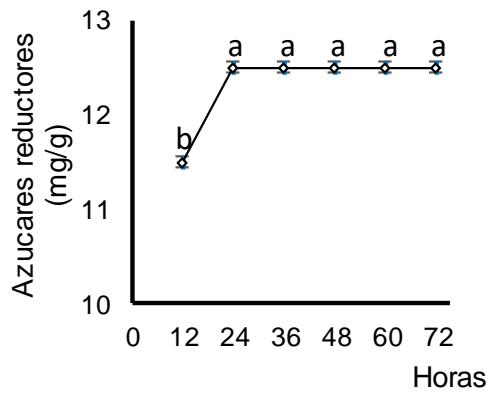
(e)



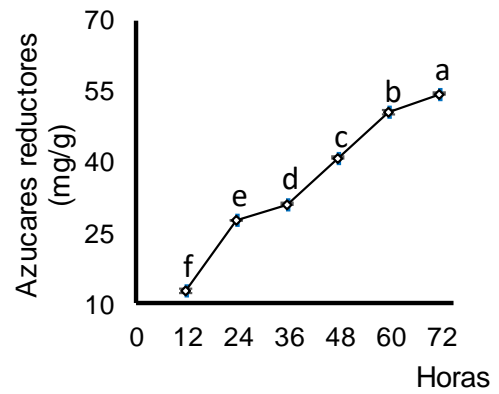
**Figura 14: Sacarificación usando el extracto enzimático crudo de *B. subtilis* incubado a 16 horas usando bagacillo (B16H-BS) sobre los sustratos: (a) bagacillo, (b) trigo, (c) quinua, (d) xilano y (e) CMC.**

**Nota:** Los valores son las medias de seis replicas  $\pm$  SD. Las letras indican los grupos según el análisis Duncan ( $p < 0,01$ ).

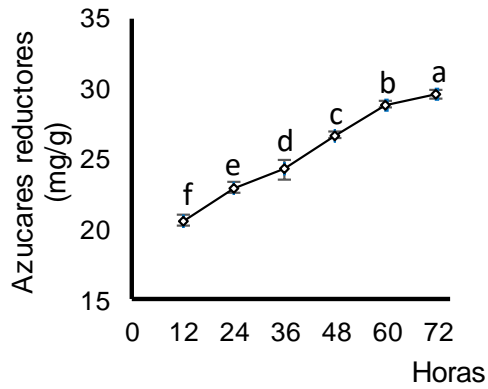
(a)



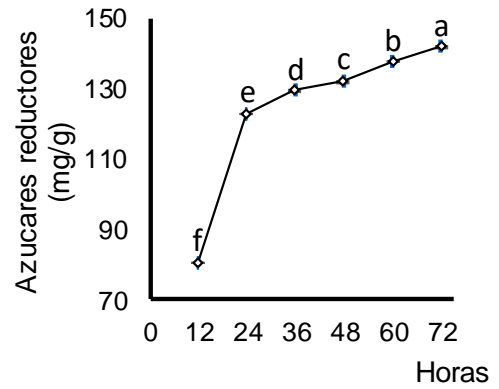
(b)



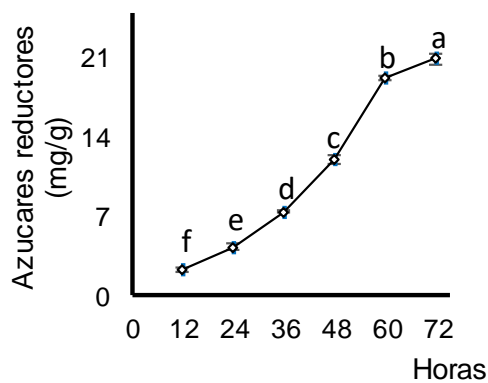
(c)



(d)



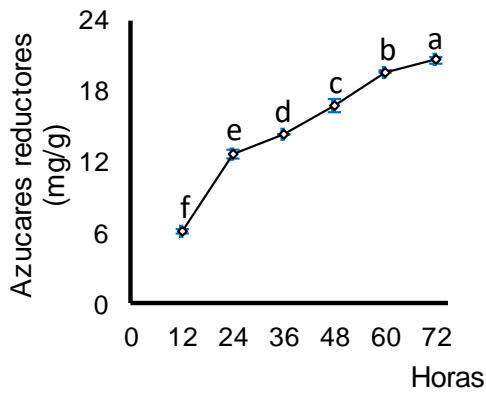
(e)



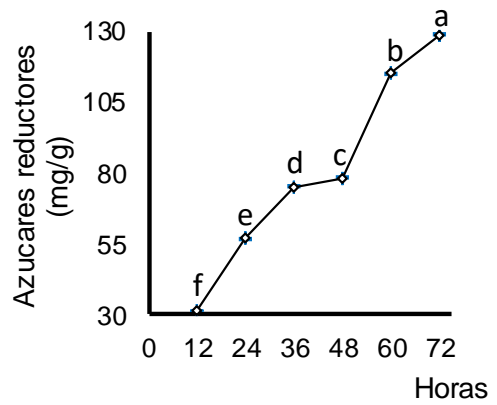
**Figura 15: Sacarificación usando el extracto enzimático crudo de *B. subtilis* incubado a 16 horas usando Quinoa (Q16H-BS) sobre los sustratos: (a) bagacillo, (b) trigo, (c) quinua, (d) xilano y (e) CMC.**

**Nota:** Los valores son las medias de seis replicas  $\pm$  SD. Las letras indican los grupos según el análisis Duncan ( $p < 0,01$ ).

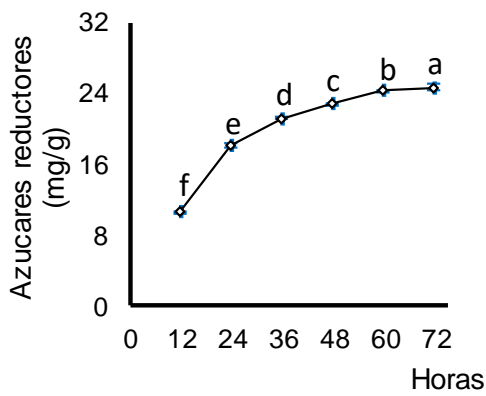
(a)



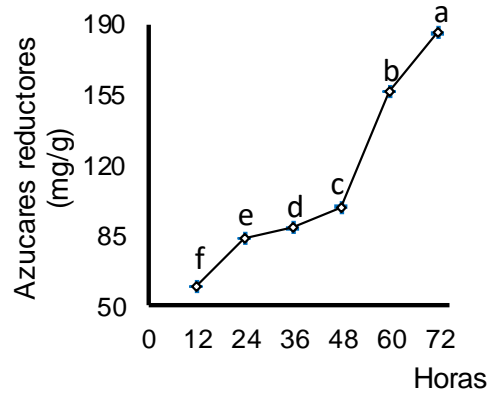
(b)



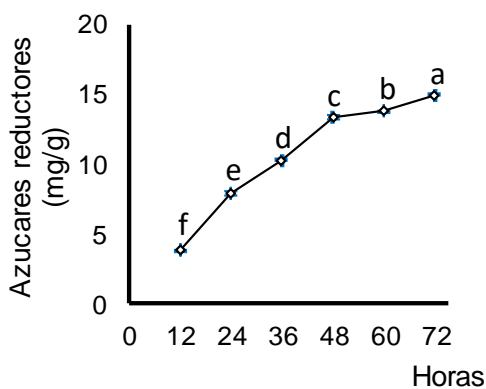
(c)



(d)



(e)



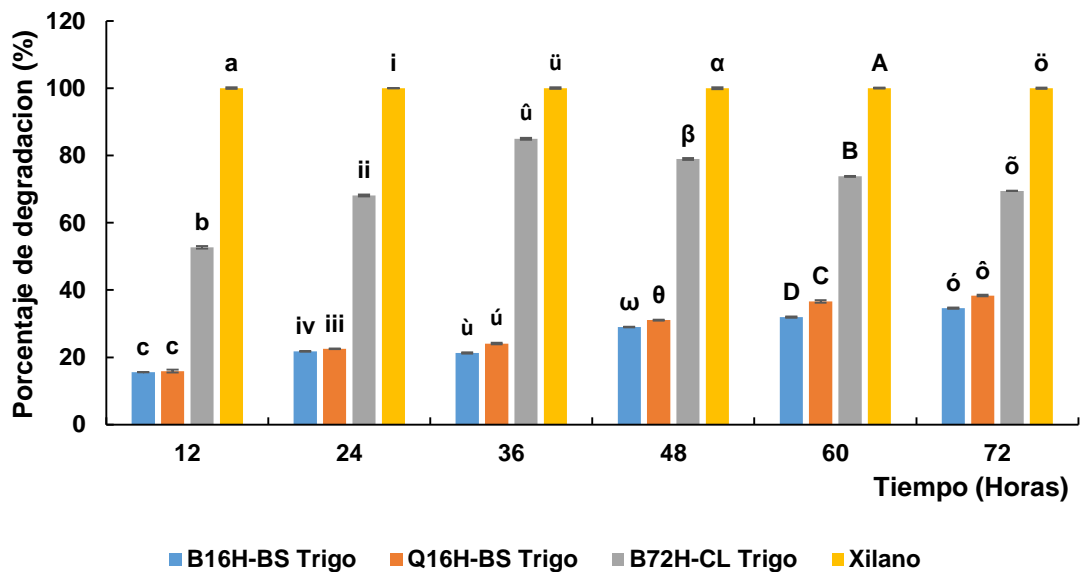
**Figura 16: Sacarificación usando el extracto enzimático crudo de *C. laeviribosi* encubado a 72 horas usando bagacillo (B72H-CL) sobre los sustratos de (a) bagacillo, (b) trigo, (c) quinua, (d) xilano y (e) CMC.**

**Nota:** Los valores son las medias de seis replicas  $\pm$  SD. Las letras indican los grupos según el análisis Duncan ( $p < 0,01$ ).

#### D. Comparación entre los mejores resultados de porcentajes de sacarificación usando los extractos crudos B16H-BS, Q16H-BS Y B72H-CL

Los mejores resultados de liberación de azúcares reductores (degradación) se dieron sobre el sustrato de trigo; el extracto de *C. laeviribosi* EHB4 obtenido a 72 horas (B72H-CL), fue el que obtuvo la mayor liberación de azúcares reductores con una cantidad de 128.88 mg/g, a comparación del extracto crudo de bagacillo y quinua con *B. subtilis* obtenido a 16 horas (B16H-BS y Q16H-BS) que obtuvieron 54.44 mg/g y 51.88 mg/g respectivamente.

Para realizar la comparación se optó por analizar los porcentajes de liberación de azúcares reductores (degradación) de los mejores resultados de sacarificación, tomando para cada evaluación según el extracto, como 100% al xilano por ser el control positivo con mayor cantidad de azúcares reductores liberados.



**Figura 17:** Comparación entre los porcentajes de degradación de los mejores resultados de sacarificación de los extractos crudos B16H-BS, Q16H-BS y B72H-CL, considerando al xilano como el 100%.

**Nota:** Según los resultados obtenidos extracto enzimático de *C. laeviribosi* EHB4 obtenido a 72 horas fue el que obtuvo el mayor porcentaje de degradación (liberación de azúcares reductores) con 85% a 36 horas, en comparación al xilano considerado el 100%. Los valores son las medias de seis replicas  $\pm$  SD. Las letras indican los grupos según el análisis Duncan ( $p < 0,01$ ).



En la figura 17 se observa la comparación porcentual, la cual se determinó teniendo como referente al xilano considerándolo como el que presentó el 100% de degradación frente a los extractos crudos, por tener la mayor cantidad de azúcares reductores liberados); en base a esto los mejores resultados usando como sustrato a degradar el trigo fueron: el extracto crudo de bagacillo con *C. laeviribosi* EHB4 obtenido a 72 horas (B72H-CL) con 85% de degradación del sustrato de trigo, seguido por el extracto crudo de quinua con *B. subtilis* obtenido a 16 horas (Q16H-BS) que tuvo una degradación de 38% del sustrato de trigo, y por último el extracto crudo de bagacillo con *B. subtilis* obtenido a 16 horas (B16H-BS) el cual obtuvo un porcentaje de degradación de 35% del trigo, todos los resultados evaluados frente al xilano (100%).

## 4.2 Discusión de resultados

La biomasa lignocelulósica es un recurso alternativo y rentable para la producción de biocombustibles debido a su abundancia y renovabilidad (Nandimath et al., 2016). La búsqueda de posibles fuentes de enzimas celulolíticas continúa en interés de una bioconversión exitosa de la biomasa lignocelulósica. Varias enzimas de origen fúngico y bacteriano han sido evaluadas por su capacidad para degradar sustratos celulósicos en monómeros de glucosa (Yu et al., 2007).

En este marco para la presente investigación se usaron las bacterias nativas *B. subtilis* y *C. laeviribosi* que mostraron actividad endoglucanasa y xilanasa (Tamariz, 2014), sin embargo, estas las evaluaciones fueron hechas usando solamente xilano y CMC (carboximetilcelulosa) como fuente de carbono, por lo tanto en este trabajo se presenta la evaluación de la capacidad de degradación que pudieran tener estas bacterias sobre sustratos lignocelulósicos agrícolas lo cual es necesario para los fines de sacarificación durante los bioprocesos de utilización de dichos residuos como alternativa de tecnologías limpias, como por ejemplo en la producción de biocombustibles de segunda generación a partir de biomasa lignocelulósica no alimentaria más abundante que es una opción más sostenible, los biocombustibles avanzados producidos de esta manera proporcionarían muchos beneficios, como la promoción de las economías rurales, la mejora de la seguridad energética, el aumento de la eficiencia energética de los procesos (producción / insumos) y la disminución de las emisiones de gases de efecto invernadero (Sathitsuksanoh et al., 2010).

En la primera etapa se prepararon cultivos de 72, 144 y 216 horas usando residuos agrícolas (bagacillo, trigo y quinua), xilano y CMC como únicas fuentes carbonadas con el fin de conocer la capacidad de degradación de las bacterias encontrándose altos valores de azúcares reductores liberados (tabla 5 y 6) demostrándose que las bacterias *B. subtilis* y *C. laeviribosi* son capaces de producir enzimas celulasas y xilanasas que permiten la degradación de residuos agrícolas. También se encontró que los valores de liberación de azúcares son mayores a 72 horas, esto se debería a que las bacterias han producido las enzimas para la degradación de los sustratos hasta cierto tiempo y después al poseer ya su fuente de energía (azúcares reductores liberados) ya no tienen la necesidad de seguir produciendo las enzimas, además éstas pierden su actividad a medida que pasa el tiempo, por lo tanto los valores de azúcares liberados en los cultivos disminuye a 144 y 216 horas porque estos probablemente son utilizados por el microorganismo para su propio metabolismo, ya que su actividad está en función directa de la cantidad de moléculas que va a ser transformada y su acción es regulada en parte por la aparición en el medio del producto final de la reacción, que de hecho inhibe su actividad (Carrillo, 2003).

Las tablas 5 y 6 muestran que el xilano seguido del CMC son los sustratos que liberaron azúcares debido a que estos son de mayor facilidad en la degradación (McCleary & McGeough, 2015; The Merck Index, 2001) y que la mejor fuente nitrogenada fue la peptona (orgánico); esto concuerda con Tamariz (2014) que encontró que estas bacterias cultivadas en el medio caldo LB (con triptona como fuente nitrogenada orgánica) presentaba mayor actividad endoglucanasa y xilanasas. Bajo esta premisa se realizó la comparación de porcentaje de degradación entre los resultados de ambas bacterias con el medio salino con peptona (MSP); en las figuras A y B (*B. subtilis* DCH4), en donde se tomaron como referencia de 100% de degradación al xilano y CMC respectivamente, muestran el porcentaje de degradación (liberación de azúcares reductores) de los residuos agrícolas frente a los controles positivos; en la figura A el mejor resultado de degradación fue la del bagacillo a 72 horas de cultivo con 44% con respecto al xilano (100%), en la figura B el mejor resultado con respecto al CMC (100%) fue en la quinua a 216 horas de cultivo con 68% de degradación. En las figuras C y D (*C. laeviribosi* EHB4) también se tomaron como referencia al xilano y CMC como 100% de degradación respectivamente; en la figura C el mejor resultado fue sobre el bagacillo a 72 horas

de cultivo con el 30% de degradación con respecto al xilano (100%), mientras que en la figura D observamos que el mejor resultado se dio también sobre el bagacillo a 72 horas de cultivo con 44% de degradación con respecto al CMC. La eficiencia de las bacterias es ratificada con lo expuesto en Tamariz (2014); donde utilizo como cebo de aislamiento el bagacillo de caña de azúcar, es por ello que en la elección de sustratos de naturaleza agrícola se optó por complementar con dos residuos agrícolas locales como son el trigo y la quinua.

Luego de esta etapa donde se encontró que las bacterias *B. subtilis* y *C. laeviribosi* tienen mejor disposición a degradar los residuos en un medio salino orgánico y permitió establecer un rango de tiempo (menos o igual a 72 horas) para poder evaluar la producción de enzimas. Se procedió a realizar la evaluación de producción enzimática, usando como sustrato carbonado e inductor de endoglucanasas y xilanasas residuos agrícolas (bagacillo, trigo y quinua). Las figuras 6, 7, 8 y 9 muestran que la bacteria *B. subtilis* en tiempos de 16, 20, 24, 28, 48 y 72 horas de producción enzimática, donde la mayor cantidad de enzimas endoglucanasas y xilanasas se dio a 16 horas usando el sustrato de quinua (1986.43 U.I/L y 1492.79 U.I/L) y bagacillo (1963.82 U.I/L y 1865.67 U.I/L); mientras que la bacteria *C. laeviribosi* que fue evaluada en los mismos periodos de tiempo su mayor producción de endoglucanasas y xilanasas se dio a las 72 horas sobre el sustrato de bagacillo (1464.56 U.I/L y 969.32 U.I/L) como se puede observar en las figuras 10, 11, 12 y 13. En todas las figuras de esta etapa los azúcares liberados son acumulados, es decir que la tendencia debería ser ascendente, en el caso de la figura 15(a) se observa que la liberación de azúcares se da hasta las 24 horas y después mantiene una tendencia homogénea esto se debe a que las enzimas se regulan de acuerdo a los sustratos, cuando ya llegan al límite de su trabajo de degradación se estabilizan.

Según los resultados para la producción de enzimas se obtuvo mejores resultados usando bagacillo y quinua como sustratos inductores; así mismo el tiempo de incubación para la producción es corto entre 16 y 72 horas (*B. subtilis* y *C. laeviribosi* respectivamente), éstos valores son de gran importancia ya que el uso de residuos como parte del medio de cultivo también sería rentable porque estos son productos de fácil obtención y bajo costo.

Suesca (2012), en su investigación de “Producción de enzimas celulolíticas a partir de cultivos de *Trichoderma* sp. con biomasa lignocelulósica”, donde la verificación de la actividad enzimática de *T. asperellum* se realizó utilizando CMC y celulosa cristalina como fuente de carbono, logrando crecimiento del hongo en medio sólido y en medio líquido, y una actividad enzimática en medio líquido con celulosa de 216 U./L en CMC (carboximetilcelulosa) y 89 U./L en Avicel® (celulosa microcristalina), en el día 4 de incubación se logra la mayor concentración de enzimas sobre el intervalo estudiado (día 1- 11). Tenemos que considerar que en este trabajo usaron como fuente de carbono sustratos comerciales, a diferencia de los residuos agrícolas, su composición hará que la actividad enzimática siempre sea positiva, la desventaja es su elevado costo que limitaría su uso de manera a mayor escala. Realizando una comparación con nuestros resultados: *C. laeviribosi* endoglucanasas 969.32 U./L (en bagacillo a 72 horas), *B. subtilis* endoglucanasas 1865.67 U./L (en quinua a 16 horas) y endoglucanasas 1492.79 U./L (en bagacillo a 16 horas); podemos decir que los residuos agrícolas son más eficientes como fuente de carbono para la producción enzimática que el CMC y la celulosa cristalina, además que los tiempos de producción son menores; esto se debe a que entre los microbios, las bacterias son más confiables debido a su adaptabilidad a diferentes condiciones ambientales, crecimiento relativamente rápido que cualquier otro microbio y extremadamente tienen la capacidad de producir enzimas altamente estables que sirven como fuentes altamente potentes de enzimas individualmente importantes (Lugani et al., 2015).

En la etapa de sacarificación se utilizaron los extractos crudos de bagacillo con *C. laeviribosi* EHB4 obtenido a 72 horas (B72H-CL) y el de bagacillo y quinua con *B. subtilis* obtenido a 16 horas (B16H-BS y Q16H-BS) que obtuvieron las mejores actividades enzimáticas, estos extractos fueron parcialmente purificados y concentrados para degradar (liberación de azúcares) los residuos agrícolas (Bagacillo, Trigo y Quinua) y controles positivos (CMC y xilano); la mayor liberación para todos los extractos de azúcares reductores se dio sobre el sustrato de trigo (miligramos de azúcares reductores liberados por gramo de sustrato), B72H-CL obtuvo 128.88 mg/g de sustrato, B16H-BS y Q16H-BS que obtuvieron 54.44 mg/g de sustrato y 51.88 mg/g respectivamente.

Trivedi et al. (2015), en su trabajo "Fermentación en estado sólido (SSF) - celulasa derivada para la sacarificación del alga verde *Ulva* para la producción de bioetanol", el sustrato de algas marinas, que contenía hongos inoculados con un contenido de humedad del 60%, cultivado a 25° C y pH 4 durante cuatro días, mostró una producción óptima de enzimas. La hidrólisis del material de alimentación de *U. fasciata* con enzima (10 U/g) durante 24 horas a 40° C y pH 4 dio un rendimiento máximo de azúcar de  $112 \pm 10$  mg / g de peso en seco. Estos hallazgos indican que la celulasa producida por un hongo marino puede ser empleada para la sacarificación de materias primas celulósicas para la producción de biocombustibles renovables a partir de materias primas marinas. Comparando con nuestro mejor resultado (B72H-CL 128.88 mg/g evaluado hasta 72 horas) de azúcares reductores podemos ver que nuestro rendimiento es mayor y a un menor tiempo de cultivo, los factores que pueden influir son las distintas metodologías utilizadas para la obtención de enzimas, en el primer caso emplean la fermentación en estado sólido (SSF) y en el presente trabajo utilizamos la fermentación líquida sumergida, además que utilizaron diferentes parámetros para la optimización de sus cultivos como las diferentes dosificación enzimáticas.

Para la primera evaluación de degradación se realizó la cuantificación de azúcares reductores de las muestras crudas donde al analizar los resultados en porcentaje de degradación con respecto al xilano (100%) se obtuvo que la bacteria *B. subtilis* DCH4 sobre los residuos los mejores resultados fueron el bagacillo a 72 horas de cultivo (44%), seguido de la quinua a 216 horas de cultivo (43%) y del bagacillo a 144 horas de cultivo (41%), mientras que la bacteria *C. laeviribosi* EHB4 en MSP, con respecto al xilano (100%) los mejores resultados de degradación de los residuos agrícolas fueron el bagacillo a 72 horas de cultivo (30%), bagacillo a 144 horas de cultivo (24%) y bagacillo a 216 horas de cultivo (22%). En la última etapa de sacarificación se hizo una concentración enzimática y semi-purificación del extracto crudo obteniendo los mejores resultados en unidades porcentuales respecto al xilano (100%); el sustrato que presentó mayor degradación (sacarificación) fue el trigo que al ser expuesto al extracto crudo de bagacillo con *C. laeviribosi* EHB4 obtenido a 72 horas (B72H-CL) obtuvo 85% de degradación, seguido por el extracto crudo de quinua con *B. subtilis* obtenido a 16 horas (Q16H-BS) con 38%, y por último el extracto crudo de bagacillo con *B. subtilis* obtenido a 16 horas (B16H-BS) el cual obtuvo un porcentaje de degradación de 35%. Mediante

los resultados podemos decir que si es necesario realizar la concentración enzimática y la semi-purificación de los extractos ya que se obtienen mayores resultados de degradación mediante la liberación de azúcares reductores.

Finalmente, los resultados obtenidos demuestran que *B. subtilis* y *C. laeviribosi*, tienen el potencial para degradar residuos cuya bioconversión podría ser usada en tecnologías limpias como por ejemplo en la producción de bioetanol. Así mismo *B. subtilis* y *C. laeviribosi* pueden producir enzimas usando como sustrato residuos, lo cual a su vez podrían abaratar costos en casos de producción de enzimas a gran escala, del mismo modo éstas enzimas tienen numerosas aplicaciones como las celulasas tienen una amplia gama de aplicaciones, como en alimentos, cervecería, vino, pulpa y papel, textiles, detergentes, piensos y agricultura. Las celulasas también se usan en la industria textil para el pulido biológico de telas y el aspecto de lavado de piedras de los tejidos vaqueros y en detergentes domésticos para la ropa para mejorar la suavidad y el brillo de la tela. Las celulasas se utilizan en preparaciones de algodón, tratamientos de lana y teñido, en el tratamiento de efluentes, y también en industrias farmacéuticas (Nisha et al., 2014). Las posibles aplicaciones de xilanasas incluyen la bioconversión del material lignocelulósico y los agro-desechos a productos fermentativos, clarificación de zumos, mejora en la consistencia de la cerveza y la digestibilidad de la materia prima animal (Subramaniyan & Prema, 2002). La aplicación de xilanasas en la sacarificación de xilano en agro-desechos y agro-alimentos intensifica la necesidad de explotar el potencial de los mismos en la biotecnología.

## CAPITULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1 Conclusiones

- Las bacterias *B. subtilis* DHC4 y *C. laeviribosi* EHB4 son capaces de degradar residuos agrícolas como el bagacillo, trigo y quinua durante el cultivo, donde *B. subtilis* DHC4 liberó hasta un 44% de azúcares reductores de bagacillo a 72 horas de cultivo en comparación del xilano (100%) fue el bagacillo y *C. laeviribosi* EHB4 liberó hasta el 30% de azúcares reductores del bagacillo a 72 horas con respecto al xilano (100%).
- Ambas bacterias degradan mejor los residuos agrícolas y los controles cuando son cultivados en el medio salino con peptona (nitrógeno orgánico).
- En el caso de *B. subtilis* DCH4 la mejor actividad enzimática se obtuvo a las 16 horas de cultivo usando tallos de quinua (Q16H-BS) y bagacillo (B72H-CL), donde la actividad xilanasa fue 1986.43 U./L y 1963.82 U./L respectivamente; mientras que la mejor actividad endoglucanasa se obtuvo en quinua con 1865.67 U./L.
- En el caso de *C. laeviribosi* EHB4 la mejor actividad enzimática se obtuvo usando bagacillo a 72 horas de cultivo (B72H-CL), obteniéndose hasta 1464.56 U./L de actividad xilanasa y 969.32 U./L de endoglucanasa.
- Los resultados de sacarificación (degradación) usando extractos enzimáticos libre de microorganismos mostró que las enzimas de ambas bacterias tienen capacidad de degradar residuos agrícolas pre-tratados; donde el extracto de *C.*

*laeviribosi* EHB4 (B72H-CL) liberó mayor cantidad de azúcares reductores a partir del tallo de trigo obteniéndose hasta 128.88 mg/g, a comparación de los extractos B16H-BS y Q16H-BS que liberaron 54.44 mg/g y 51.88 mg/g respectivamente. En porcentajes y teniendo como referente a los azúcares reductores liberados a partir del xilano como el 100%, los niveles de liberación de azúcares reductores antes descritos corresponden al 85%, 38% y 35% cuando se usa el tallo de trigo.

## **5.2 Recomendaciones**

- Los resultados obtenidos muestran la potencialidad de las bacterias evaluadas como productoras de enzimas hidrolíticas; sin embargo, es necesario buscar una metodología para optimizar la producción de celulasas y xilanasas.
- Se debe buscar alternativas para mejorar el proceso de recuperación de extractos que minimicen la pérdida de la actividad enzimática.
- Evaluar la capacidad de usar otros residuos lignocelulósicos que podrían ser de provecho para la implementación de diversos procesos de tecnologías limpias.
- Profundizar el estudio bioquímico y genético de *Conhella laeviribosi* respecto a su capacidad celulolítica y xilanolítica porque muestra contener enzimas más resistentes.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abril, A. & Navarro, E.A. (2012). Etanol a partir de Biomasa Lignocelulósica. *Researchgate*, 1, 1-101.
- Alani, F., Anderson, W.A. & Moo-Young, M. (2008). New isolate of *Streptomyces* sp. with novel thermoalkalotolerant cellulases. *Biotechnol*, 30, 123-126.
- Aro, N., Pakula, T. & Penttila, M. (2005). Transcriptional regulation of plant cell Wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiol*, 29, 719–739.
- Azzam, A.M. (1989). Pretreatment of cane bagasse with alkaline hydrogen peroxide for enzymatic hydrolysis of cellulose and ethanol fermentation. *J. Environ*, 24, 421–433.
- Balan, V., da Costa Sousa, L., Chundawat, S.P., Vismeh, R., Jones, A.D. & Dale, B.E. (2008). Mushroom spent straw: a potential substrate for an ethanol-based biorefinery. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*, 35, 293-301.
- Baldrian, P. & Valaskova, V. (2008). Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. *FEMS Microbiol*, 32, 501–521.
- Ballesteros, I., Negro, M.J., Oliva, J.M., Cabanas, A., Manzanares, P. & Ballesteros, M. (2006). Ethanol production from steam-explosion pretreated wheat straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 130, 496-508.
- Bastawde, K.B. (1992). Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action. *World J Microbiol Biotechnol*, 8, 353–68.
- Béguin, P. & Aubert, J.P. (1994). The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol*, 13, 25-58.
- Ben Ghedalia, D. & Miron, J. (1981). The effect of combined chemical and enzyme treatment on the saccharification and in vitro digestion rate of wheat straw. *Biotechnol*, 23, 823–831.
- Cadoche, L. & Lopez, G.D. (1989). Assessment of size reduction as a preliminary step in the production of ethanol from lignocellulosic wastes. *Biology of Wastes*, 30, 153.

- Campbell, CH. & Laherrere, JH. (1998). The end of cheap oil. *Scientific American*, 1, 78-83.
- Carrillo Leonor. (2003). *Microbiología Agrícola*. 2, 1- 20.
- Castro Martínez, C., Valverde, M.E. & Paredes López, O. (2009). Biocombustibles: biomasa lignocelulósica y procesos de producción. *CONCYTEG*, 4 (54), 1246-1270.
- Chandrakant, P. & Bisaria, VS. (1998). Simultaneous bioconversion of cellulose and hemicellulose to ethanol. *Crit. Rev. Biotechnol*, 18, 295–331.
- Clark, TA. & Mackie, KL. (1987). Steam explosion of the soft-wood *Pinus radiata* with sulphur dioxide addition. *I. Process optimization. J. Wood Chem. Technol*, 7, 373–403.
- Cuervo, L., Folch, J.L. & Quiroz R.E. (2009). Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol. *BioTecnología*, 13 (3), 11-25.
- Demirbas, A. (2005). Bioethanol from cellulosic materials: a renewable motor fuel from biomass. *Energy Sources*, 27, 327-333.
- Dhussa, A. (2004). Biogas in India. Methane to markets partnership. *Meeting of agricultura subcommittee*.
- Duff, SJB & Murray, WD. (1996). Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review. *Bioresource Technology*, 55, 1-33.
- Eggeman, T. & Elander, RT. (2005). Process and economic analysis of pre-treatment technologies. *Bioresour.Technol*, 96, 2019-2025.
- Elberson, MA., Malekzadeh, F., Yazdi, MT., Kameranpour, N., Noori-Dalooi, MR., Matte, MH., Shahamat, M., Colwell, RR. & Sowers, KR. (2000). *Cellulomonas persica* sp. nov. and *Cellulomonas iranensis* sp. nov., mesophilic cellulose-degrading bacteria isolated from forest soils. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 993-996.
- Eveleigh, DE. & Montenecourt, BS. (1979). Increasing yields of extracellular enzymes. *Adv Appl Microbiol*, 25, 57–74.

- Fan, LT., Gharpuray, MM. & Lee, YH. (1987). In: Cellulose hydrolysis. *Biotechnology Monographs. Springer*, 1, 57.
- Gutiérrez Correa, M. & Tengerdy, R. (1997). Production of cellulase on sugar cane bagasse by fungal mixed culture solid substrate fermentation. *Biotechnology Letters*, 19, 665-667.
- Holtzapple, MT., Jun, JH., Ashok, G., Patibandla, SL. & Dale, BE. (1991). The ammonia freeze explosion (AFEX) process: a practical lignocellulose pretreatment. *Appl. Biochem. Biotechnol*, 28/29, 59–74.
- Howard, R.L.; Abotsi, E.; Van Rensburg, E.J.; Howard, S. (2004). Lignocellulose biotechnology: Issues of bioconversion and enzyme production. *Afr. J. Biotechnol*, 2, 602–619.
- Jeffries, TW. (1994). Biodegradation of lignin and hemicelluloses. *Biochemistry of microbial degradation*, 1, 233–277.
- Kilzer, FJ. & Broido, A. (1965) Speculations on the nature of cellulose pyrolysis. *Pyroynamics*, 2, 151–163.
- Kim, S. & Dale, BE. (2004). Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass and Bioenergy*, 26, 361-375.
- Kirk, TK. & Jeffries, TW. (1996). Roles for microbial enzymes in pulp and paper processing. In: Enzymes for pulp and paper processing. Jeffries TW & Viikari L (eds). *American Chemical Society*, 1, 2–14.
- Kraut, J. (1998), How Do Enzymes Work?. *Science* 242:533- 540.
- Leonor Carrillo, 2003. *Microbiología Agrícola*. 2, 1-20.
- Lugani, Y.; Singla, R.; Sooch, B.S. (2015). Optimization of Cellulase Production from Newly Isolated *Bacillus* sp. Y3. *J. Bioproc. Biotech*, 5.
- Lynd L, Weimer P, van Zyl W, Pretorius I. (2002). *Microbiol Mol Biol Rev*. 66(3): 506-577.

- Lynd, L., Weimer, P., Van Zyl, W. & Pretorius, I. (2002). Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 3, 506-577.
- Lynd, LR. & Wang, MQ. (2003). A product e nonspecific framework for evaluating the potential of biomass-based products to displace fossil fuels. *Journal of Industrial Ecology*, 7, 17-32.
- Martín, C., Galbe, M., Wahlbom, C.F., Hahn-Hägerdal, B., Jönsson, L.J. (2002). Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology*, 31, 274–282.
- McCleary, B. V. & McGeough, P. (2015). A Comparison of Polysaccharide Substrates and Reducing Sugar Methods for the Measurement of endo-1,4-b-Xylanase. *Appl. Biochem. Biotechnol*, 177, 1152-1163.
- Mes-Hartree, M., Dale, BE. & Craig, WK. (1988). Comparison of steam and ammonia pretreatment for enzymatic hydrolysis of cellulose. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 29, 462–468.
- Millet, MA., Baker, AJ. & Scatter, LD. (1976). Physical and chemical pretreatment for enhancing cellulose saccharification. *Biotech. Bioeng.* 6, 125–153.
- Nandimath, A.P.; Kharat, K.R.; Gupta, S.G.; Kharat, A.S. (2016). Optimization of cellulase production for *Bacillus* sp. and *Pseudomonas* sp. soil isolates. *Afr. J. Microbiol*, 10, 410–419.
- Nisha, P.; Das, A.; Saritha, K.V. (2014). Production of cellulase from *Micrococcus* sp. and effect of growth parameters. 2, 236–240.
- Okeke, B.C. & Obi, S.J.C. (1994). Lignocellulose and sugar compositions of some agro-waste materials. *Bioresource Technol*, 47, 283-284.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (2010). Bioenergía y seguridad alimentaria. 1, 71-95.
- Ovando Chacón, SL. & Waliszewski, KN. (2005). Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. *Universidad y Ciencia*, 21, 111-120.

- Pastor, Fl., Gallardo, O., Sanz, AJ. & Pilar, D. (2007). Xylanases: molecular properties and applications. *Industrial Enzymes*, 1, 65–82.
- Paul, E.A. & Clark, F.E. (1996). Soil microbiology and biochemistry. *Academic Press*, 1.
- Pérez, J., Muñoz Dorado, A., De la Rubia, T. & Martínez, E. (2002). Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *Int. Microbiol*, 5, 53–63.
- Quiroz-Castañeda, R.E., Balcázar-López, E., Dantán-González, E., Martinez, A., Folch-Mallol, J. & Martínez Anaya, C. (2009). Characterization of cellulolytic activities of *Bjerkandera adusta* and *Pycnoporus sanguineus* on solid wheat straw médium. *Electronic Journal of Biotechnology*, 4(12), 1-8.
- Ragauskas, AJ., Williams, CK., Davison, BH., Britovsek, G., Cairney, J., Eckert, CA., Frederick, WJ. Jr., Hallett, JP., Leak, DJ., Liotta, CL., Mielenz, JR., Murphy, R., Templer, R. & Tschaplinski, T. (2006). The path forward for biofuels and biomaterials. *Science*, 311, 484-489.
- Reshamwala, S., Shawky, BT., & Dale, BE. (1995). Ethanol production from enzymatic hydrolysates of AFEX-treated coastal *Bermuda grass* and switchgrass. *Appl. Biochem. Biotechnol*, 51/52, 43–55.
- Rubin, EM. (2008). Genomics of cellulose biofuels. *Nature*, 4, 841-845.
- Saber, M.S. (2001). Clean biotechnology for sustainable farming. *Eng. Life Sci*, 6, 1-7.
- Safaa M., Ali Sana H. Omar & Nadia A. Soliman. (2013). Co-Production of Cellulase and Xylanase Enzymes By Thermophilic *Bacillus subtilis* 276NS. *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries*, 2, 65-74.
- Sathitsuksanoh, N.; Zhu, Z.; Rollin, J. and Zhang, Y.-H. P. (2010). Solvent fractionation of lignocellulosic biomass. *Woodhead Publishing Series in Energy*, 3, 123.
- Shrestha, P., Khanal, SK., Pomettoiii, AL. & Van Leeuwen, J. (2009). Enzyme production by wood-rot and soft-rot fungi cultivated on corn fiber followed by simultaneous saccharification and fermentation. *J. Agric Food Chem*, 57(10), 4156–61.
- Somerville C. (2007). Biofuels. *Curr. Biol.*, 17, 115-119.

- Subramaniyan, S.; Prema, P. (2002). Biotechnology of microbial xylanases: Enzymology, molecular biology, and application. *Crit. Rev. Biotechnol*, 22, 33 - 64.
- Suesca Díaz, Adriana. (2012). Producción de enzimas celulolíticas a partir de cultivos de *Trichoderma* sp. con biomasa lignocelulósica. (Tesis Magistral). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C.-Colombia.
- Sun, Y. & Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour. Technol*, 83, 1–11.
- Sutcliffe, M. J., and Scrutton, N. S. (2008). Enzyme Catalysis: Over the Barrier or Through the Barrier? *Trends Biochem. Sci.* 25(9):405-408. Ai-Zuhair, 'The effect of crystallinity of cellulose on the rate of reducing sugars production by heterogeneous enzymatic hydrolysis', *Bioresource Technology*, 99(10), 4078-4085.
- Sztern, D. & Pravia, M. (1999). Manual para la elaboración de compost, bases conceptuales y procedimientos. Organización Panamericana de la Salud, Montevideo.
- Talebnia, D. Karakashev, I. Angelidaki. (2010). Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. *Bioresource Technology*, 101, 4744 – 4753.
- Tamariz Angeles Carmen del Rosario (2014). Diversidad de bacterias termotolerantes celulolíticas y xilanolíticas aisladas de fuentes termales del Callejon de Huaylas. (Tesis doctoral). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Perú.
- Tanaka, H., Koike, K., Itakura, S. & Enoki, A. (2009). Degradation of wood and enzyme production by *Ceriporiopsis subvermispota*. *Enzyme Microb Technol*, 45(5), 384–90.
- Techapun, C.; Charoenrat, T.; Watanabe, M.; Sasaki, K.; Poosaran, N. (2002). Optimization of thermostable and alkaline-tolerant cellulase-free xylanase production from agricultural waste by thermotolerant *Streptomyces* sp. Ab106, using the central composite experimental design. *Biochem. Eng. J*, 12, 99–105.
- The Merck Index. (2001). 13.

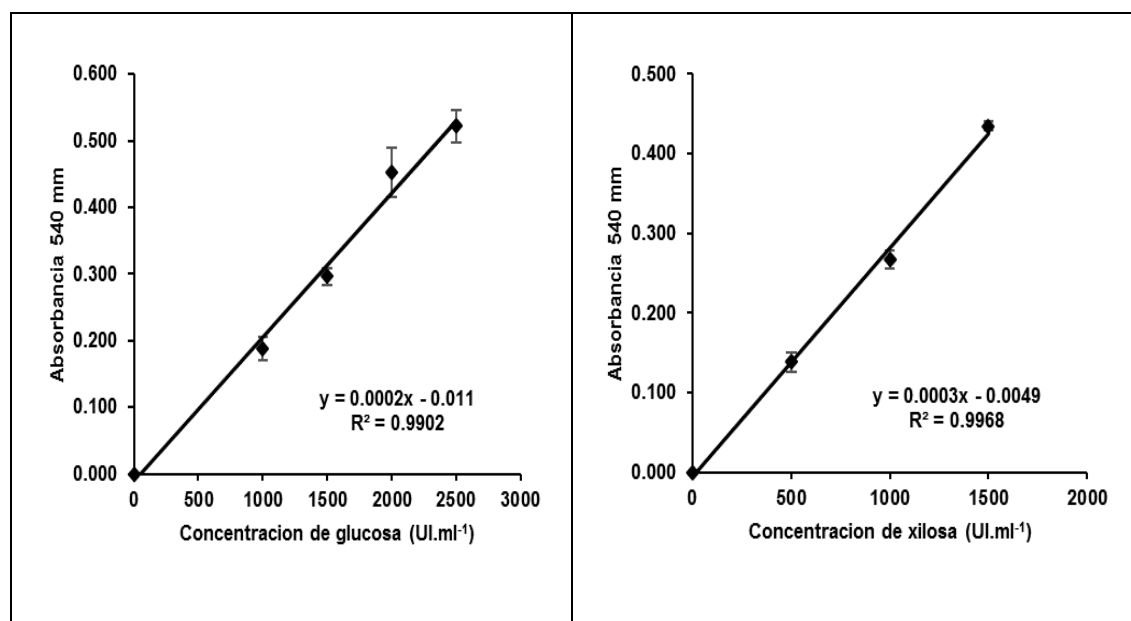
- the Weitz Center for Development Studies (2014). Clean Technologies – Environmental technology, innovation and management systems as means for regional and local economic development, 1, 1-4.
- Trivedi, N., Reddy, C.R.K., Radulovich R., Jha, B. (2015). Solid state fermentation (SSF)-derived cellulase for saccharification of the green seaweed *Ulva* for bioethanol production. *Elsevier*, 9, 48-54.
- Uihlein A. & Schbek L. (2009). Environmental impacts of a lignocellulosic feedstock biorefinery system: an assessment. *Biomass and Bioenergy*, 33, 793-802.
- Vlasenko, EY., Ding, H., Labavitch, JM. & Shoemaker, SP. (1997). Enzymatic hydrolysis of pretreated rice straw. *Bioresour. Technol*, 59, 109–119.
- Wong, K.Y.& Saddler, J.N. (1993). Hemicellulose and Hemicellulases. *Portland Press Research Monograph*, 4, 127.
- Yu, H.; Zeng, G.; Huang, H.; Xi, X.; Wang, R.; Huang, D.; Huang, G.; Li, J. (2007). Microbial community succession and lignocellulose degradation during agricultural waste composting. *Biodegradation*, 18, 793–802.
- Yuan, J.S., Tiller, K.H., Al-Ahmad, H., Stewart, N.R. & Stewart Jr, C.N. (2008). Plants to power: bioenergy to fuel the future. *Cell Press*, 1, 116.
- Zhao, X., Cheng, K. & Liu, D. (2009). Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82, 815–827.

# **ANEXOS**



## ANEXO 1: CURVA ESTÁNDAR DE AZÚCARES REDUCTORES

Se elaboraron las curvas estándares para glucosa y xilosa, las cuales se utilizaron para calcular la concentración de los azúcares reductores provenientes de hidrólisis de CMC - Papel filtro y xilano, respectivamente (Tamariz, 2014).



**Figura 18:** Curvas estándar de glucosa a la izquierda y de xilosa a la derecha, elaborada con el método de DNS para microplaca. Los valores corresponden al promedio de 8 repeticiones  $\pm$  DS.

Preparación de soluciones de glucosa o xilano de varias concentraciones para la curva estándar, para microplaca de titulación

Reactivos	Batería de tubos, volumen ( $\mu$ l)					
	BR	1	2	3	4	5
Estándar de azúcar a 3mg/ml	0	15	30	45	60	75
Buffer Fosfato 50mM pH 6*	180	165	150	135	120	105
Concentración mg/ml	0	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5

Retirar 60  $\mu$ l de cada concentración y colocarlo en una microplaca de PCR de 96 pozos.

Agregar 120 $\mu$ l de DNS en cada hoyo, tapar y colocar en un baño María a 92°C x 10 min.

Retirar y colocar sobre agua helada, retirar y colocar 36 $\mu$ l a una placa de microtitulación de 96 hoyos, transparente y de fondo plano que contiene 160  $\mu$ l de agua por hoyo. Mezclar bien y leer por duplicado a 540nm.

## ANEXO 2: PROTOCOLO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA MINIATURIZADO

El siguiente protocolo se hizo de acuerdo a Tamariz (2014):

	Blanco DNS	Blanco Sustrato	Blanco de Muestra	Muestra
	( $\mu$ l)	( $\mu$ l)	( $\mu$ l)	( $\mu$ l)
Buffer*	180	90	90	-
Sustrato	-	90	-	90
Extracto	-	-	90	90
(t), Incubar a 50°C ** por 2h (CMC y Xilano), ó 20 h (Papel Filtro)				
	Reacción de coloración DNS			
Prod. Incubación	60	60	90	60
DNS	120	120	120	120
(t), Incubar a 92°C por 10 minutos				
	Para la lectura a 540nm ***			
Reacción de DNS	36	36	36	36
Agua	160	160	160	160
Leer a 540nm de longitud de onda				
Resultados	Abs. 0,000	ABS	ABM	AMT

\*, el pH y la composición del buffer dependerá de las condiciones a las que se desee evaluar la actividad enzimática.

\*\* , la temperatura puede variar de acuerdo a las condiciones a las que se desee evaluar la actividad enzimática.

\*\*\*, usa microplaca de titulación transparente de fondo plano.

(t), indica que los microtubos o placas de PCR que contienen la reacción deben ser tapados herméticamente.

### ANEXO 3: CÁLCULOS PARA LA CONVERSIÓN A UNIDADES ENZIMÁTICAS

Tamariz, 2014. Para calcular la concentración de los azúcares reductores producidos, se debe calcular la absorbancia neta de la muestra (AMN):

$$AMN = AMB - (ABM+ABS) \dots\dots\dots (1)$$

De acuerdo a las curvas del Anexo 02:

$$[Glucosa]= (y + 0.011) /0.0002) \mu\text{g/ml} \dots\dots\dots (2)$$

$$[Xilosa]= (y+ 0.0049 /0.0003) \mu\text{g/ml} \dots\dots\dots (3)$$

Para una muestra desconocida X, se reemplaza (1) en (2) y (3) y expresándolo en  $\mu\text{g/ml}$ :

$$[X \text{ glu}] = (AMN + 0.011) /0.0002) \times 1000 \mu\text{g/L} \dots\dots\dots (4)$$

$$[X \text{ xil}] = (AMN+ 0.0049 /0.0003) \times 1000 \mu\text{g/L} \dots\dots\dots (5)$$

#### **Cálculo de las Unidades Enzimáticas**

Las unidades enzimáticas se definen como el número de micromoles ( $\mu\text{M}$ ) de glucosa o xilosa que produce 1ml de enzima (en este caso extracto) por minuto a las condiciones de ensayo determinadas (pH y  $T_0$ ).

#### **Cálculo de Unidades Enzimáticas**

$$U = \mu\text{M} / t \text{ min} \dots\dots\dots(6)$$

$$\mu\text{M} = X\mu\text{g} / PM \text{ (glucosa o xilano)} \dots\dots\dots(7)$$

Reemplazando (7) en (6)

$$U = X\mu\text{g} / (PM \times t \text{ min}) \dots\dots\dots(8)$$

#### **Cálculo de Unidades Enzimáticas/ml**

Como el volumen de muestra en la reacción es 90 $\mu\text{l}$ , para expresarlo por 1ml se realiza una regla de tres simple para obtener:

$$U/\text{ml} = U \times 1/0,09 \text{ ml} \dots\dots\dots(9)$$

Reemplazando (8) en (9)

$$U/\text{ml} = X\mu\text{g} \times 11,1 / (PM \times t \text{ min}) \dots\dots\dots(10)$$

De acuerdo a la fórmula (10), el tiempo para endoglucanasa (CMSasa) y Xilanasa es de 120 min., mientras que para Celulasa total (PFasa) es de 1200min., además reemplazando los Pesos moleculares (PM) de los respectivos azúcares se tiene las siguientes fórmulas:

$$\text{Endoglucanasa (U/L)} = X\mu\text{g} \times 0.001 \dots\dots\dots (11)$$

$$\text{Xilanasa (U/L)} = X\mu\text{g} \times 0.00062 \dots\dots\dots (12)$$

$$\text{PFasa} = X\mu\text{g}$$

**ANEXO 4**

**ANÁLISIS ESTADÍSTICOS PARA LA PRIMERA  
EVALUACIÓN DE DEGRADACIÓN**

### Liberación de azúcares reductores (ug/ml) para *B. subtilis* DCH4:

#### ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
MSP	Inter-grupos	1,291E8	14	9218098,430	2121,934	,000
	Intra-grupos	325814,723	75	4344,196		
	Total	1,294E8	89			
MSA	Inter-grupos	6404467,990	14	457461,999	321,735	,000
	Intra-grupos	106639,517	75	1421,860		
	Total	6511107,507	89			

#### DUNCAN

MSP							
Sustrato y Tiempo (H)	N	Subconjunto para alfa = 0.01					
		l	k	j	l	h	g
T-216	6	349.06					
B-216	6		546.13				
Q-216	6		608.78				
Q-144	6		628.72				
T-144	6			775.35			
CMC-216	6				900.51		
B-144	6					1042.08	
Q-72	6					1300.75	
T-72	6					1345.00	
Sig.		1.00	,042	1.00	1.00	1.00	,249
		f	e	d	c	b	a
T-72	6	1345.00					
X-216	6	1418.48					
CMC-144	6		1660.98				
B-72	6			1958.67			
X-144	6				2550.97		
CMC-72	6					4105.58	
X-72	6						4416.91
Sig.		,057	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos y usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

DUNCAN							
MSA							
Sustrato y Tiempo (H)	N	Subconjunto para alfa = 0.01					
		F	E	D	C	B	A
Q-216	6	54.81					
B-216	6	58.99	58.99				
Q-144	6	75.37	75.37				
B-144	6	78.57	78.57				
T-216	6	79.16	79.16				
CMC-216	6	87.65	87.65				
Q-72	6	100.96	100.96				
T-144	6	101.46	101.46				
B-72	6	112.49	112.49				
T-72	6		124.31				
CMC-144	6			263.01			
X-216	6			278.41			
CMC-72	6				583.53		
X-144	6					642.35	
X-72	6						980.31
Sig.		.03	.01	.48	1.00	1.00	1.00

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos y usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

**Degradación en porcentaje de los residuos agrícolas con respecto a xilano para *B. subtilis* DCH4:**

ANOVA						
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
72	Inter-grupos	19991.764	3	6663.921	3271.850	.000
	Intra-grupos	40.735	20	2.037		
	Total	20032.499	23			
144	Inter-grupos	21640.153	3	7213.384	1416.227	.000
	Intra-grupos	101.868	20	5.093		
	Total	21742.020	23			
216	Inter-grupos	19842.448	3	6614.149	22184.657	.000
	Intra-grupos	5.963	20	.298		
	Total	19848.411	23			

Duncan				
72 Horas				
Sustratos	N	Subconjunto para alfa = 0.01		
		c	b	a
Quinoa	6	29		
Trigo	6	30		
Bagacillo	6		44	
Xilano	6			100
Sig.		.24	1.00	1.00

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos y usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

Duncan					
144 Horas					
Sustratos	N	Subconjunto para alfa = 0.01			
		$\omega$	$\beta$	$\theta$	$\alpha$
Quinoa	6	25			
Trigo	6		30		
Bagacillo	6			41	
Xilano	6				100
Sig.		1.00	1.00	1.00	1.00

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos y usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

Duncan					
216 Horas					
Sustratos	N	Subconjunto para alfa = 0.01			
		4	3	2	1
Trigo	6	25			
Bagacillo	6		38		
Quinoa	6			43	
Xilano	6				100
Sig.		1.00	1.00	1.00	1.00

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos y usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.



**Degradación en porcentaje de los residuos agrícolas con respecto a CMC para  
B. subtilis DCH4:**

**ANOVA**

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
72	Inter-grupos	18606.493	3	6202.164	1119.497	.000
	Intra-grupos	110.803	20	5.540		
	Total	18717.296	23			
144	Inter-grupos	13573.251	3	4524.417	377.929	.000
	Intra-grupos	239.432	20	11.972		
	Total	13812.684	23			
216	Inter-grupos	11560.912	3	3853.637	167.745	.000
	Intra-grupos	459.463	20	22.973		
	Total	12020.375	23			

**Duncan**

72 Horas				
Sustratos	N	Subconjunto para alfa = 0.01		
		c	b	a
Quinua	6	32		
Trigo	6	33		
Bagacillo	6		48	
Xilano	6			100
Sig.		.44	1.00	1.00

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos y usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

**Duncan**

144 Horas					
Sustratos	N	Subconjunto para alfa = 0.01			
		$\Omega$	$\beta$	$\theta$	$\alpha$
Quinua	6	38			
Trigo	6		47		
Bagacillo	6			63	
Xilano	6				100
Sig.		1.00	1.00	1.00	1.00

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos y usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

Duncan				
216 Horas				
Sustratos	N	Subconjunto para alfa = 0.01		
		1	2	3
Trigo	6	39		
Bagacillo	6		61	
Quinoa	6		68	
Xilano	6			100
Sig.		1.00	.02	1.00

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos y usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

**Liberación de azúcares reductores (ug/ml) para *C. laeviribosi* EHB4:**

**ANOVA**

		Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
MSP	Inter-grupos	39205218,475	14	2800372,748	2088,163	,000
	Intra-grupos	100580,237	75	1341,070		
	Total	39305798,712	89			
MSA	Inter-grupos	9607780,121	14	686270,009	848,525	,000
	Intra-grupos	60658,462	75	808,779		
	Total	9668438,583	89			

**DUNCAN**

MSP							
Sustrato y Tiempo (H)	N	Subconjunto para alfa = 0.01					
		k	j	i	h	g	f
T-216	6	131.26					
Q-216	6	163.33	163.33				
T-144	6		194.38				
Q-144	6		204.73				
B-216	6		215.36				
T-72	6			347.46			
Q-72	6			349.53			
B-144	6				423.33		
B-72	6					690.25	
CMC-216	6						880.68
Sig.		.13	.03	.92	1.00	1.00	1.00
		e	d	c	b	a	
X-216	6	981.25					
CMC-144	6		1,291.35				
CMC-72	6			1,584.21			
X-144	6				1,764.08		
X-72	6					2,299.07	
Sig.		1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos y usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

**DUNCAN**

MSA										
Sustrato y Tiempo (H)	N	Subconjunto para alfa = 0.01								
		l	h	g	f	e	d	c	b	a
T-216	6	76.68								
Q-216	6	83.12								
B-216	6	87.49								
CMC-216	6	96.70	96.70							
T-144	6	121.98	121.98							
Q-144	6		136.60							
X-216	6		138.89							
B-144	6			197.30						
T-72	6			223.68	223.68					
Q-72	6				243.56					
CMC-144	6					337.67				
B-72	6						468.06			
X-144	6							746.78		
CMC-72	6								983.74	
X-72	6									1,097.91
Sig.		.01	.02	.11	.23	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos y usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

**Degradación en porcentaje de los residuos agrícolas con respecto a xilano para *C. laeviribosi* EHB4:**

ANOVA						
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
72	Inter-grupos	29602.481	3	9867.494	6583.064	.000
	Intra-grupos	29.978	20	1.499		
	Total	29632.459	23			
144	Inter-grupos	32744.971	3	10914.990	1960.582	.000
	Intra-grupos	111.344	20	5.567		
	Total	32856.316	23			
216	Inter-grupos	30984.092	3	10328.031	821.597	.000
	Intra-grupos	251.413	20	12.571		
	Total	31235.505	23			

<b>Duncan</b>				
72 Horas				
Sustratos	N	Subconjunto para alfa = 0.01		
		c	b	a
Trigo	6	15		
Quinoa	6	15		
Bagacillo	6		30	
Xilano	6			100
Sig.		.90	1.00	1.00

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos y usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

<b>Duncan</b>				
144 Horas				
Sustratos	N	Subconjunto para alfa = 0.01		
		$\beta$	$\theta$	$\alpha$
Trigo	6	11		
Quinoa	6	12		
Bagacillo	6		24	
Xilano	6			100
Sig.		.67	1.00	1.00

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos y usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

<b>Duncan</b>				
216 Horas				
Sustratos	N	Subconjunto para alfa = 0.01		
		1	2	3
Trigo	6	13		
Quinoa	6	17	17	
Bagacillo	6		22	
Xilano	6			100
Sig.		.13	.02	1.00

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos y usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

**Degradación en porcentaje de los residuos agrícolas con respecto a CMC para  
*C. laeviribosi* EHB4:**

**ANOVA**

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
72	Inter-grupos	24425.465	3	8141.822	2490.015	.000
	Intra-grupos	65.396	20	3.270		
	Total	24490.861	23			
144	Inter-grupos	29124.600	3	9708.200	818.972	.000
	Intra-grupos	237.083	20	11.854		
	Total	29361.683	23			
216	Inter-grupos	29583.936	3	9861.312	1231.053	.000
	Intra-grupos	160.209	20	8.010		
	Total	29744.146	23			

**Duncan**

72 Horas				
Sustratos	N	Subconjunto para alfa = 0.01		
		c	b	a
Trigo	6	22		
Quinoa	6	22		
Bagacillo	6		44	
Xilano	6			100
Sig.		.90	1.00	1.00

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos y usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

**Duncan**

144 Horas				
Sustratos	N	Subconjunto para alfa = 0.01		
		$\beta$	$\theta$	$\alpha$
Trigo	6	15		
Quinoa	6	16		
Bagacillo	6		33	
Xilano	6			100
Sig.		.69	1.00	1.00

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos y usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

**Duncan**

216 Horas				
Sustratos	N	Subconjunto para alfa = 0.01		
		1	2	3
Trigo	6	15		
Quinua	6	19		
Bagacillo	6		24	
Xilano	6			100
Sig.		.04	1.00	1.00

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos y usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

## **ANEXO 5**

# **ANÁLISIS ESTADÍSTICOS PARA LA SEGUNDA EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA**



## Cultivo con inoculo de *Bacillus subtilis*

### ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Xilanasas 24, 48 y 72 horas	Inter-grupos	2331284.98	8	291410.62	3588964.47	.00
	Intra-grupos	1.46	18	.08		
	Total	2331286.44	26			
Endoglucanasas 24, 48 y 72 horas	Inter-grupos	2604498.65	8	325562.33	2663853.25	.00
	Intra-grupos	2.20	18	.12		
	Total	2604500.85	26			
Xilanasas 16, 20, 24 y 28 Horas	Inter-grupos	5983509.52	11	543955.41	7656251.63	.00
	Intra-grupos	1.71	24	.07		
	Total	5983511.23	35			
Endoglucanasas 16, 20, 24 y 28 horas	Inter-grupos	5983468.46	11	543951.68	15079516.73	.00
	Intra-grupos	.87	24	.04		
	Total	5983469.33	35			

### DUNCAN

#### XILANASAS

TIEMPO (H) Y SUSTRATO	N	Subconjunto para alfa = 0.01								
		i	h	g	f	e	D	c	b	a
72 Bagacillo	6	486.31								
72 Quinoa	6		492.38							
48 Quinoa	6			583.27						
48 Bagacillo	6				594.27					
72 Trigo	6					595.38				
48 Trigo	6						633.60			
24Trigo	6							966.16		
24 Quinoa	6								1,102.27	
24 Bagacillo	6									1,367.60
Sig.		1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos y usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

**DUNCAN**

**XILANASAS**

TIEMPO (H) Y SUSTRATO	N	Subconjunto para alfa = 0.01					
		l	k	j	l	h	g
28 Quinoa	6	695.53					
28 Bagacillo	6		937.49				
24 Trigo	6			957.87			
28 Trigo	6				958.93		
24 Quinoa	6					1,187.98	
20 Trigo	6						1,265.56
Sig.		1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
		f	e	d	c	b	a
24 Bagacillo	6	1,321.60					
16 Trigo	6		1,505.23				
20 Quinoa	6			1,678.21			
20 Bagacillo	6				1,726.15		
16 Bagacillo	6					1,963.82	
16 Quinoa	6						1,986.43
Sig.		1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos y usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

**DUNCAN**

**ENDOGLUCANASAS**

TIEMPO (H) Y SUSTRATO	N	Subconjunto para alfa = 0.01								
		i	h	g	f	e	d	c	b	a
72 Trigo	6	331.23								
72 Quinoa	6		510.23							
72 Bagacillo	6			523.93						
48 Trigo	6				642.34					
48 Quinoa	6					857.41				
48 Bagacillo	6						916.55			
24 Trigo	6							942.67		
24 Quinoa	6								1,073.67	
24 Bagacillo	6									1,392.67
Sig.		1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos y usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

**DUNCAN**

**ENDOGLUCANASAS**

TIEMPO (H) Y SUSTRATO	N	Subconjunto para alfa = 0.01					
		l	k	j	i	h	g
28 Trigo	6	895.38					
24 Trigo	6		967.11				
28 Quinoa	6			982.45			
20 Trigo	6				1,000.73		
16 Trigo	6					1,075.67	
24 Quinoa	6						1,143.65
Sig.		1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
		f	e	d	c	b	a
28 Bagacillo	6	1,276.44					
24 Bagacillo	6		1,312.48				
20 Bagacillo	6			1,391.76			
16 Bagacillo	6				1,492.79		
20 Quinoa	6					1,623.69	
16 Quinoa	6						1,865.67
Sig.		1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos y usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

## Cultivo con inoculo de *Cohnella laeviribosi*

### ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Xilanasas 24, 48 y 72 horas	Inter-grupos	1857018.72	8	232127.34	6877469.73	.00
	Intra-grupos	.61	18	.03		
	Total	1857019.32	26			
Endoglucanasas 24, 48 y 72 horas	Inter-grupos	1022899.13	8	127862.39	6445639.59	.00
	Intra-grupos	.36	18	.02		
	Total	1022899.49	26			
Xilanasas 16, 20, 24 y 28 Horas	Inter-grupos	2019718.55	11	183610.78	8647289.35	.00
	Intra-grupos	.51	24	.02		
	Total	2019719.06	35			
Endoglucanasas 16, 20, 24 y 28 horas	Inter-grupos	2103850.83	11	191259.17	17191835.21	.00
	Intra-grupos	.27	24	.01		
	Total	2103851.10	35			

### DUNCAN

#### XILANASAS

TIEMPO (H) Y SUSTRATO	N	Subconjunto para alfa = 0.01								
		i	h	g	f	e	d	c	b	a
24 Quinua	6	512.36								
48 Quinua	6		583.10							
24 Bagacillo	6			773.56						
24 Trigo	6				775.52					
48 Trigo	6					947.40				
48 Bagacillo	6						960.06			
72 Trigo	6							978.41		
72 Quinua	6								987.41	
72 Bagacillo	6									1,464.56
Sig.		1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos y usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

**DUNCAN**

**XILANASAS**

TIEMPO (H) Y SUSTRATO	N	Subconjunto para alfa = 0.01					
		l	k	j	i	h	g
16 Bagacillo	6	216.11					
16 Quinoa	6		421.36				
20 Quinoa	6			498.31			
24 Quinoa	6				526.33		
20 Bagacillo	6					564.92	
28 Quinoa	6						578.53
Sig.		1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
		f	e	d	c	b	a
24 Bagacillo	6	721.40					
16 Trigo	6		793.78				
28 Bagacillo	6			867.06			
20 Trigo	6				946.94		
24 Trigo	6					976.32	
28 Trigo	6						1,000.10
Sig.		1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos y usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

**DUNCAN**

**ENDOGLUCANASAS**

TIEMPO (H) Y SUSTRATO	N	Subconjunto para alfa = 0.01								
		i	h	g	f	e	d	c	b	a
24 Trigo	6	316.78								
24 Bagacillo	6		484.33							
48 Trigo	6			519.63						
48 Bagacillo	6				673.81					
24 Quinoa	6					695.17				
48 Quinoa	6						767.27			
72 Quinoa	6							835.83		
72 Trigo	6								850.77	
72 Bagacillo	6									969.32
Sig.		1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos y usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

**DUNCAN**

**ENDOGLUCANASAS**

TIEMPO (H) Y SUSTRATO	N	Subconjunto para alfa = 0.01					
		l	k	j	i	h	g
16 Trigo	6	255.93					
16 Bagacillo	6		278.83				
20 Trigo	6			299.81			
24 Trigo	6				327.75		
20 Bagacillo	6					333.00	
28 Trigo	6						403.65
Sig.		1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
		f	e	d	c	b	a
24 Bagacillo	6	458.23					
28 Bagacillo	6		512.58				
16 Quinoa	6			784.23			
20 Quinoa	6				819.44		
24 Quinoa	6					881.62	
28 Quinoa	6						901.23
Sig.		1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos y usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

## **ANEXO 6**

# **ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LA LIBERACIÓN DE AZUCARES USANDO EXTRACTOS ENZIMÁTICOS CRUDOS**

## ANÁLISIS DUNCAN PARA EL EXTRACTO ENZIMÁTICO B16H-BS

Prueba en sustratos (a)Bagacillo, (b)Trigo, (c)Quinua, (d)Xilano y (e)CMC.

### (a) DUNCAN

TIEMPO (Horas)	N	Subconjunto para alfa = 0.01					
		f	e	d	c	b	a
72	6						6.10
60	6					5.52	
48	6				2.35		
36	6			0.94			
24	6		0.47				
12	6	0.35					
Sig.		1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos y usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

### (b) DUNCAN

TIEMPO (Horas)	N	Subconjunto para alfa = 0.01					
		f	e	d	c	b	a
72	6						51.88
60	6					43.23	
48	6				33.25		
36	6			23.56			
24	6		19.63				
12	6	13.16					
Sig.		1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos y usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.



**(c) DUNCAN**

TIEMPO (Horas)	N	Subconjunto para alfa = 0.01					
		f	e	d	C	b	a
72	6						32.69
60	6					23.81	
48	6				22.60		
36	6			20.69			
24	6		16.31				
12	6	15.23					
Sig.		1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos y usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

**(d) DUNCAN**

TIEMPO (Horas)	N	Subconjunto para alfa = 0.01					
		f	e	d	C	b	a
72	6						149.81
60	6					135.44	
48	6				114.81		
36	6			110.88			
24	6		90.19				
12	6	84.44					
Sig.		1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos y usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

**(e) DUNCAN**

TIEMPO (Horas)	N	Subconjunto para alfa = 0.01					
		f	e	d	C	b	a
72	6						46.27
60	6					40.48	
48	6				38.69		
36	6			36.15			
24	6		33.19				
12	6	26.81					
Sig.		1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos y usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

## ANÁLISIS DUNCAN PARA EL EXTRACTO ENZIMÁTICO Q16H-BS

Prueba en sustratos (a)Bagacillo, (b)Trigo, (c)Quinua, (d)Xilano y (e)CMC.

### (a) DUNCAN

TIEMPO (Horas)	N	Subconjunto para alfa = 0.01	
		b	a
72	6		12.50
60	6		12.50
48	6		12.50
36	6		12.50
24	6		12.50
12	6	11.50	
Sig.		1.00	1.00

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos y usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

### (b) DUNCAN

TIEMPO (Horas)	N	Subconjunto para alfa = 0.01					
		f	e	d	c	b	a
72	6						54.44
60	6					50.35	
48	6				40.94		
36	6			31.13			
24	6		27.69				
12	6	12.77					
Sig.		1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos y usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

**(c) DUNCAN**

TIEMPO (Horas)	N	Subconjunto para alfa = 0.01				
		e	d	c	b	a
72	6					29.52
60	6					28.85
48	6				26.69	
36	6			24.23		
24	6		22.98			
12	6	20.63				
Sig.		1.00	1.00	1.00	1.00	.07

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos y usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

**(d) DUNCAN**

TIEMPO (Horas)	N	Subconjunto para alfa = 0.01					
		f	e	d	c	b	a
72	6						142.00
60	6					137.56	
48	6				131.81		
36	6			129.31			
24	6		123.00				
12	6	80.38					
Sig.		1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos y usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

**(e) DUNCAN**

TIEMPO (Horas)	N	Subconjunto para alfa = 0.01					
		f	e	d	c	b	a
72	6						20.90
60	6					19.19	
48	6				11.94		
36	6			7.44			
24	6		4.31				
12	6	2.31					
Sig.		1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos y usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

## ANÁLISIS DUNCAN PARA EL EXTRACTO ENZIMÁTICO B72H-CL

Prueba en sustratos (a)Bagacillo, (b)Trigo, (c)Quinoa, (d)Xilano y (e)CMC.

### (a) DUNCAN

TIEMPO (Horas)	N	Subconjunto para alfa = 0.01					
		f	e	d	c	b	a
72	6						20.63
60	6					19.63	
48	6				16.79		
36	6			14.31			
24	6		12.63				
12	6	6.06					
Sig.		1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos y usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

### (b) DUNCAN

TIEMPO (Horas)	N	Subconjunto para alfa = 0.01					
		f	e	d	c	b	a
72	6						128.88
60	6					115.13	
48	6				78.44		
36	6			75.29			
24	6		56.79				
12	6	31.54					
Sig.		1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos y usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

**(c) DUNCAN**

TIEMPO (Horas)	N	Subconjunto para alfa = 0.01				
		e	d	c	B	a
72	6					24.69
60	6					24.25
48	6				22.75	
36	6			21.13		
24	6		18.08			
12	6	10.63				
Sig.		1.00	1.00	1.00	1.00	.02

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos y usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

**(d) DUNCAN**

TIEMPO (Horas)	N	Subconjunto para alfa = 0.01					
		f	e	d	c	b	a
72	6						185.50
60	6					156.06	
48	6				99.33		
36	6			88.63			
24	6		83.38				
12	6	59.88					
Sig.		1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos y usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

**(e) DUNCAN**

TIEMPO (Horas)	N	Subconjunto para alfa = 0.01					
		f	e	d	c	b	a
72	6						14.96
60	6					13.79	
48	6				13.33		
36	6			10.29			
24	6		7.92				
12	6	3.83					
Sig.		1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos y usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

## **ANEXO 7**

# **ANÁLISIS ANOVA Y DUNCAN PARA LA COMPARACIÓN DE MEJORES RESULTADOS DE PORCENTAJES DE SACARIFICACIÓN**

**ANOVA**

Tiempo (Horas)		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
12	Inter-grupos	52046.407	5	10409.281	129743.339	.000
	Intra-grupos	2.407	30	.080		
	Total	52048.814	35			
24	Inter-grupos	43656.454	5	8731.291	481843.427	.000
	Intra-grupos	.544	30	.018		
	Total	43656.997	35			
36	Inter-grupos	44352.530	5	8870.506	92779.684	.000
	Intra-grupos	2.868	30	.096		
	Total	44355.399	35			
48	Inter-grupos	35528.082	5	7105.616	164185.674	.000
	Intra-grupos	1.298	30	.043		
	Total	35529.381	35			
60	Inter-grupos	31181.193	5	6236.239	175396.524	.000
	Intra-grupos	1.067	30	.036		
	Total	31182.260	35			
72	Inter-grupos	29221.435	5	5844.287	162493.190	.000
	Intra-grupos	1.079	30	.036		
	Total	29222.514	35			

**Duncan**

12 Horas				
Extracto y sustrato	N	Subconjunto para alfa = 0.01		
		c	b	a
B16H-BS Trigo	6	16	53	100
Q16H-BS Trigo	6	16		
B72H-CL Trigo	6			
B16H-BS Xilano	6			100
Q16H-BS Xilano	6			100
B72H-CL Xilano	6			100
Sig.		.08	1.00	1.00

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos y usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

Duncan					
24 Horas					
Extracto y sustrato	N	Subconjunto para alfa = 0.01			
		iv	iii	ii	i
B16H-BS Trigo	6	22			
Q16H-BS Trigo	6		23		
B72H-CL Trigo	6			68	
B16H-BS Xilano	6				100
B72H-CL Xilano	6				100
Q16H-BS Xilano	6				100
Sig.		1.00	1.00	1.00	1.00

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos y usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

Duncan					
36 Horas					
Extracto y sustrato	N	Subconjunto para alfa = 0.01			
		ù	ú	û	ü
B16H-BS Trigo	6	21			
Q16H-BS Trigo	6		24		
B72H-CL Trigo	6			85	
Q16H-BS Xilano	6				100
B16H-BS Xilano	6				100
B72H-CL Xilano	6				100
Sig.		1.00	1.00	1.00	1.00

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos y usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.



<b>Duncan</b>					
48 Horas					
Extracto y sustrato	N	Subconjunto para alfa = 0.01			
		$\omega$	$\theta$	B	$\alpha$
B16H-BS Trigo	6	29	31	79	100
Q16H-BS Trigo	6				
B72H-CL Trigo	6				
Q16H-BS Xilano	6				100
B16H-BS Xilano	6				100
B72H-CL Xilano	6				100
Sig.		1.00	1.00	1.00	1.00

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos y usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

<b>Duncan</b>					
60 Horas					
Extracto y sustrato	N	Subconjunto para alfa = 0.01			
		D	C	B	A
B16H-BS Trigo	6	32	37	74	100
Q16H-BS Trigo	6				
B72H-CL Trigo	6				
B16H-BS Xilano	6				100
Q16H-BS Xilano	6				100
B72H-CL Xilano	6				100
Sig.		1.00	1.00	1.00	1.00

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos y usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

**Duncan**

72 Horas					
Extracto y sustrato	N	Subconjunto para alfa = 0.01			
		ó	ô	õ	ö
B16H-BS Trigo	6	35			
Q16H-BS Trigo	6		38		
B72H-CL Trigo	6			69	
Q16H-BS Xilano	6				100
B16H-BS Xilano	6				100
B72H-CL Xilano	6				100
Sig.		1.00	1.00	1.00	1.00

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos y usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

**ANEXO 8**

**PANEL FOTOGRAFICO**

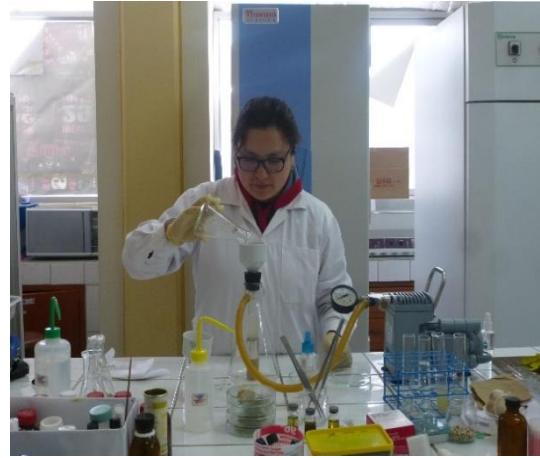
**A****B****C****D****E**

**Fotografias:** Pesaje de los residuos agrícolas (A), mezcla de los residuos con la solución de NaOH para el pretratamiento termoalcalino (B), los residuos agrícolas puestos al autoclave por 40 min. (C), lavado para eliminar el residuo de la solución de NaOH (D) y medición de pH de los residuos agrícolas (E).

F



G



H



I



J



**Fotografias:** Cultivo de muestras (F), obtencion de extractos crudos (G), concentracion enzimatica de los extractos crudos (H), prueba de DNS (I) y lectura de prueba DNS (J).