



UNIVERSIDAD NACIONAL “SANTIAGO ANTÚNEZ DE MAYOLO”

ESCUELA DE POSTGRADO

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL CELULOLÍTICO Y XILANOLÍTICO DE *Geobacillus* sp. NATIVOS EMPLEANDO RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS

Tesis para optar el Grado de Maestro en
Ciencias e Ingeniería
Mención en Gestión Ambiental

ALBERTO CASTAÑEDA BARRETO

Asesora: **Dra. CARMEN DEL ROSARIO TAMARIZ ANGELES**

Huaraz - Ancash - Perú

2021

Nº Registro: **T0805**



FORMATO DE AUTORIZACIÓN PARA LA PUBLICACIÓN DE TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN, CONDUCENTES A OPTAR TÍTULOS PROFESIONALES Y GRADOS ACADÉMICOS EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

1. Datos del autor:

Apellidos y Nombres: Castañeda Barreto Alberto

Código de alumno: 2016.3134.4.AA Teléfono: 975355770

E-mail: acastanedab@unasam.edu.pe D.N.I. n°: 46145466

(En caso haya más autores, llenar un formulario por autor)

2. Tipo de trabajo de Investigación:

- Tesis Trabajo de Investigación
 Trabajo Académico

3. Trabajo de Investigación para optar el grado de:

Magíster

4. Título del trabajo de Investigación:

Evaluación del potencial celulolítico y xilanolítico de Geobacillus sp. nativos empleando residuos lignocelulósicos.

5. Escuela:

6. Programas:

7. Asesor:

Apellidos y nombres Tamariz Angeles Carmen Del Rosario D.N.I n°: 33343198

E-mail: ctamariz@unasam.edu.pe ID ORCID: https://orcid.org/0000-0001-5252-2757

8. Referencia bibliográfica:

9. Tipo de acceso al Documento:

- Acceso público* al contenido completo. Acceso
 restringido** al contenido completo

Si el autor eligió el tipo de acceso abierto o público, otorga a la Universidad Santiago Antúnez de Mayolo una licencia no exclusiva, para que se pueda hacer arreglos de forma en la obra y difundirlo en el Repositorio Institucional, respetando siempre los Derechos de Autor y Propiedad Intelectual de acuerdo y en el Marco de la Ley 822.


En caso de que el autor elija la segunda opción, es necesario y obligatorio que indique el sustento correspondiente:

Material para artículo científico.



10. Originalidad del archivo digital

Por el presente dejo constancia que el archivo digital que entrego a la Universidad, como parte del proceso conducente a obtener el título profesional o grado académico, es la versión final del trabajo de investigación sustentado y aprobado por el Jurado.



Firma del autor

11. Otorgamiento de una licencia *CREATIVE COMMONS*

Para las investigaciones que son de acceso abierto se les otorgó una licencia *Creative Commons*, con la finalidad de que cualquier usuario pueda acceder a la obra, bajo los términos que dicha licencia implica.



El autor, por medio de este documento, autoriza a la Universidad, publicar su trabajo de investigación en formato digital en el Repositorio Institucional, al cual se podrá acceder, preservar y difundir de forma libre y gratuita, de manera íntegra a todo el documento.

Según el inciso 12.2, del artículo 12º del Reglamento del Registro Nacional de Trabajos de Investigación para optar grados académicos y títulos profesionales - RENATI "Las universidades, instituciones y escuelas de educación superior tienen como obligación registrar todos los trabajos de investigación y proyectos, incluyendo los metadatos en sus repositorios institucionales precisando si son de acceso abierto o restringido, los cuales serán posteriormente recolectados por el Recolector Digital RENATI, a través del Repositorio ALICIA".


12. Para ser verificado por la Dirección del Repositorio Institucional

Fecha de Acto de sustentación:

Huaraz,

Firma:




Varillas William Eduardo
Asistente en Informática y Sistemas
- UNASAM -

***Acceso abierto:** uso lícito que confiere un titular de derechos de propiedad intelectual a cualquier persona, para que pueda acceder de manera inmediata y gratuita a una obra, datos procesados o estadísticas de monitoreo, sin necesidad de registro, suscripción, ni pago, estando autorizada a leerla, descargarla, reproducirla, distribuirla, imprimirla, buscarla y enlazar textos completos (Reglamento de la Ley No 30035).

**** Acceso restringido:** el documento no se visualizará en el Repositorio.



UNIVERSIDAD NACIONAL
"SANTIAGO ANTÚNEZ DE MAYOLO"
ESCUELA DE POSTGRADO

ACTA VIRTUAL DE SUSTENTACION DE TESIS

Los miembros del Jurado de Sustentación de Tesis, que suscriben, reunidos en acto público en la Plataforma Microsoft Teams, de la Universidad Nacional "Santiago Antúnez de Mayolo" para calificar la Tesis presentada por el:

Bachiller : **ALBERTO CASTAÑEDA BARRETO**

Título : **"EVALUACIÓN DEL POTENCIAL CELULOLÍTICO Y XILANOLÍTICO DE GEOBACILLUS SP NATIVOS EMPLEANDO RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS"**

Después de haber escuchado la sustentación, las respuestas a las preguntas y observaciones finales, la declaramos:

Aprobado con Mención , con el calificativo de **Diecisiete (17)**

De conformidad al Reglamento General a la Escuela de Postgrado y al Reglamento de Normas y Procedimientos para optar los Grados Académicos de Maestro y Doctor, queda en condición de ser aprobado por el Consejo de la Escuela de Postgrado y recibir el Grado Académico de Maestro en **CIENCIAS E INGENIERÍA** con Mención en **GESTIÓN AMBIENTAL** a otorgarse por el Honorable Consejo Universitario de la UNASAM.

Huaraz, 29 de diciembre del 2021

Dr. Heraclio Fernando Castillo Picon
PRESIDENTE

Dr. Edwin Julio Palomino Cadenas
SECRETARIO

Mag. Rosario Adriana Polo Salazar
VOCAL

MIEMBROS DEL JURADO

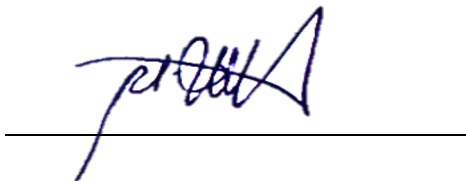
Doctor Heraclio Fernando Castillo Picón

Presidente



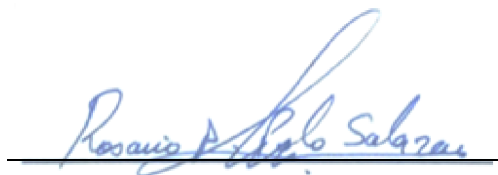
Doctor Edwin Julio Palomino Cadenas

Secretario



Magíster Rosario Adriana Polo Salazar

Vocal



ASESORA

Doctora Carmen del Rosario Tamariz Angeles



AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación de la Biodiversidad y Recursos Genéticos de Ancash (CIByRGA) de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Santiago Antúnez de Mayolo, por las facilidades de uso de sus laboratorios y equipamiento.

A la Dra. Carmen del Rosario Tamariz Angeles, por su asesoría constante, su enseñanza, consejos y confianza que me permitieron forjar el espíritu investigador.

Al Dr. Percy Eduardo Olivera Gonzáles, por su co-asesoría y dirección en la ejecución experimental del presente trabajo.

A la Mg. Miguelina Torres Santillán, por su apoyo y recomendaciones.

Al personal encargado del Laboratorio de Calidad de Suelos de la Facultad de Ciencias Agrarias y Mecánica de Suelos de la Facultad de Ingeniería Civil, por brindarme las facilidades para el pretratamiento físico de los residuos lignocelulósicos.

DEDICATORIA

A mi madre, por todo su amor y comprensión,
pilar fundamental de mi vida.

ÍNDICE

	Página
Resumen	xv
Abstract	xvi
INTRODUCCIÓN	1-2
Capítulo I	
PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	3-7
1.1. Planteamiento y formulación del problema	3
1.2. Objetivos	4
1.3. Justificación	4
1.4. Delimitación	7
Capítulo II	
MARCO TEÓRICO.....	8-17
2.1. Antecedentes de la investigación	8
2.2. Bases teóricas	9
2.2.1. Residuos lignocelulósicos	9
2.2.2. Enzimas lignocelulolíticas	12
2.2.3. Condiciones de cultivo	13
2.3. Definición de términos	14
2.4. Hipótesis	16
2.5. Variables	17
Capítulo III	
METODOLOGÍA.....	18-27
3.1. Tipo de investigación	18
3.2. Diseño de investigación	18
3.3. Población y muestra	19
3.3.1. Población	19

3.3.2. Muestra	19
3.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos	19
3.5. Plan de procesamiento y análisis de datos	25
Capítulo IV	
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27-74
4.1. Presentación de resultados	27
4.2. Pruebas de hipótesis	47
4.3. Discusión	66
Conclusiones	75
Recomendaciones	77
Referencias Bibliográficas	78-89
Anexos	90

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Variables de investigación	17
Tabla 2. Pesos obtenidos después de los tratamientos de sustratos	29
Tabla 3. Actividades endoglucanasa y xilanasa de los extractos enzimáticos crudos producidos por <i>Geobacillus</i> sp. 10AC usadas para evaluar la influencia de sustancias químicas	44
Tabla 4. Análisis de varianza para el efecto de la fuente carbonada sobre la actividad endoglucanasa	47
Tabla 5. Información agrupada utilizando el método de Tukey y una confianza de 95% para el efecto de la fuente carbonada sobre la actividad endoglucanasa	47
Tabla 6. Resumen del modelo del efecto de la fuente carbonada sobre la actividad endoglucanasa	48
Tabla 7. Análisis de varianza para el efecto de la fuente carbonada sobre la actividad xilanasa	48
Tabla 8. Información agrupada utilizando el método de Tukey y una confianza de 95% para el efecto de la fuente carbonada sobre la actividad xilanasa	48
Tabla 9. Resumen del modelo del efecto de la fuente carbonada sobre la actividad xilanasa	49
Tabla 10. Análisis de varianza para el efecto de la cantidad de inóculo y el tipo de fuente nitrogenada sobre la actividad endoglucanasa	49
Tabla 11. Resumen del modelo del efecto de la cantidad de inóculo y el tipo de fuente nitrogenada sobre la actividad endoglucanasa	49
Tabla 12. Información agrupada utilizando el método de Tukey y una confianza de 95% para el efecto de la cantidad de inóculo y el tipo de fuente nitrogenada sobre la actividad endoglucanasa	50
Tabla 13. Análisis de varianza para el efecto de la cantidad de inóculo y el tipo de fuente nitrogenada sobre la actividad xilanasa	50

Tabla 14. Resumen del modelo del efecto de la cantidad de inóculo y el tipo de fuente nitrogenada sobre la actividad xilanasa	50
Tabla 15. Información agrupada utilizando el método de Tukey y una confianza de 95% para el efecto de la cantidad de inóculo y el tipo de fuente nitrogenada sobre la actividad xilanasa	51
Tabla 16. Análisis de varianza para el efecto del tamaño de partícula sobre la actividad endoglucanasa	52
Tabla 17. Resumen del modelo del efecto del tamaño de partícula sobre la actividad endoglucanasa	52
Tabla 18. Información agrupada utilizando el método de Tukey y una confianza de 95% para el efecto del tamaño de partícula sobre la actividad endoglucanasa	52
Tabla 19. Análisis de varianza para el efecto del tamaño de partícula sobre la actividad xilanasa	53
Tabla 20. Resumen del modelo del efecto del tamaño de partícula sobre la actividad xilanasa	53
Tabla 21. Información agrupada utilizando el método de Tukey y una confianza de 95% para el efecto del tamaño de partícula sobre la actividad xilanasa	53
Tabla 22. Análisis de varianza para el efecto de la concentración del residuo lignocelulósico sobre la actividad endoglucanasa	54
Tabla 23. Resumen del modelo del efecto de la concentración del residuo lignocelulósico sobre la actividad endoglucanasa	54
Tabla 24. Información agrupada utilizando el método de Tukey y una confianza de 95% para el efecto de la concentración del residuo lignocelulósico sobre la actividad endoglucanasa	54
Tabla 25. Análisis de varianza para el efecto de la concentración del residuo lignocelulósico sobre la actividad xilanasa	55
Tabla 26. Resumen del modelo del efecto de la concentración del residuo lignocelulósico sobre la actividad xilanasa	55

Tabla 27. Información agrupada utilizando el método de Tukey y una confianza de 95% para el efecto de la concentración del residuo lignocelulósico sobre la actividad xilanasa	55
Tabla 28. Análisis de varianza para el efecto del tiempo de incubación sobre la actividad endoglucanasa	56
Tabla 29. Resumen del modelo del efecto del tiempo de incubación sobre la actividad endoglucanasa	56
Tabla 30. Información agrupada utilizando el método de Tukey y una confianza de 95% para el efecto del tiempo de incubación sobre la actividad endoglucanasa	56
Tabla 31. Análisis de varianza para el efecto del tiempo de incubación sobre la actividad xilanasa	57
Tabla 32. Resumen del modelo del efecto del tiempo de incubación sobre la actividad xilanasa	57
Tabla 33. Información agrupada utilizando el método de Tukey y una confianza de 95% para el efecto del tiempo de incubación sobre la actividad xilanasa	57
Tabla 34. Análisis de varianza para el efecto del pH sobre la actividad endoglucanasa	58
Tabla 35. Resumen del modelo del efecto del pH sobre la actividad endoglucanasa	58
Tabla 36. Información agrupada utilizando el método de Tukey y una confianza de 95% para el efecto del pH sobre la actividad endoglucanasa	58
Tabla 37. Análisis de varianza para el efecto del pH sobre la actividad xilanasa	59
Tabla 38. Resumen del modelo del efecto del pH sobre la actividad xilanasa	59
Tabla 39. Información agrupada utilizando el método de Tukey y una confianza de 95% para el efecto del pH sobre la actividad xilanasa	59
Tabla 40. Análisis de varianza para el efecto de la temperatura sobre la actividad endoglucanasa	60

Tabla 41. Resumen del modelo del efecto de la temperatura sobre la actividad endoglucanasa	60
Tabla 42. Información agrupada utilizando el método de Tukey y una confianza de 95% para el efecto de la temperatura sobre la actividad endoglucanasa	61
Tabla 43. Análisis de varianza para el efecto de la temperatura sobre la actividad xilanasa	62
Tabla 44. Resumen del modelo del efecto de la temperatura sobre la actividad xilanasa	62
Tabla 45. Información agrupada utilizando el método de Tukey y una confianza de 95% para el efecto de la temperatura sobre la actividad xilanasa	62
Tabla 46. Análisis de varianza para el efecto de sustancias químicas sobre la actividad endoglucanasa	63
Tabla 47. Resumen del modelo del efecto de sustancias químicas sobre la actividad endoglucanasa	63
Tabla 48. Información agrupada utilizando el método de Tukey y una confianza de 95% para el efecto de sustancias químicas sobre la actividad endoglucanasa	64
Tabla 49. Análisis de varianza para el efecto de sustancias químicas sobre la actividad xilanasa	64
Tabla 50. Resumen del modelo del efecto de sustancias químicas sobre la actividad xilanasa	65
Tabla 51. Información agrupada utilizando el método de Tukey y una confianza de 95% para el efecto de sustancias químicas sobre la actividad xilanasa	65
Tabla 52. Análisis de varianza para el efecto del manganeso sobre la actividad endoglucanasa	66
Tabla 53. Resumen del modelo del efecto del manganeso sobre la actividad endoglucanasa	66
Tabla 54. Información agrupada utilizando el método de Tukey y una confianza de 95% para el efecto del manganeso sobre la actividad endoglucanasa	66

Tabla 55. Comparación de la actividad xilanasa de *Geobacillus* sp. 10AC con otros microorganismos

74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Aplicaciones de las celulasas y xilanasas en diferentes industrias	13
Figura 2. Diagrama de flujo de la evaluación del potencial celulolítico y xilanolítico de <i>Geobacillus</i> sp.	26
Figura 3. Efecto del tipo de sustrato carbonado sobre la actividad endoglucanasa	31
Figura 4. Efecto del tipo de sustrato carbonado sobre la actividad xilanolítica	31
Figura 5. Efecto de la cantidad de inóculo sobre la actividad endoglucanasa de <i>Geobacillus</i> sp. 10AC	32
Figura 6. Efecto de la cantidad de inóculo sobre la actividad xilanolítica de <i>Geobacillus</i> sp. 10AC	33
Figura 7. Efecto del tamaño de partícula sobre la actividad endoglucanasa de <i>Geobacillus</i> sp. 10AC	35
Figura 8. Efecto del tamaño de partícula sobre la actividad xilanolítica de <i>Geobacillus</i> sp. 10AC	35
Figura 9. Efecto de la concentración del residuo lignocelulósico sobre la actividad endoglucanasa de <i>Geobacillus</i> sp. 10AC	36
Figura 10. Efecto de la concentración del residuo lignocelulósico sobre la actividad xilanolítica de <i>Geobacillus</i> sp. 10AC	37
Figura 11. Efecto del tiempo de incubación sobre la actividad endoglucanasa de <i>Geobacillus</i> sp. 10AC	38
Figura 12. Efecto del tiempo de incubación sobre la actividad xilanolítica de <i>Geobacillus</i> sp. 10AC	39
Figura 13. Efecto del pH sobre la actividad endoglucanasa	40
Figura 14. Efecto del pH sobre la actividad xilanolítica	41
Figura 15. Efecto de la temperatura sobre la actividad endoglucanasa	42

Figura 16. Efecto de la temperatura sobre la actividad xilanolítica	43
Figura 17. Actividad relativa endoglucanasa del extracto enzimático crudo de bagazo y coronta luego de adición de sustancias químicas	45
Figura 18. Actividad relativa xilanasa del extracto enzimático crudo de bagazo y coronta luego de la adición de sustancias químicas	45
Figura 19. Actividad relativa endoglucanasa luego de la adición de manganeso	46

RESUMEN

La bioconversión de los residuos lignocelulósicos en productos químicos y biocombustibles es una alternativa que promueve el desarrollo de un ambiente sostenible. Las enzimas celulolíticas y xilanolíticas, producidas por microorganismos termófilos, resultan de interés para la degradación inicial de la lignocelulosa a sus azúcares constituyentes. En este contexto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad enzimática celulolítica y xilanolítica de *Geobacillus* sp. empleando residuos de la agricultura. Inicialmente, se evaluó el efecto del tipo de fuente carbonada, el tamaño de inóculo, la cantidad y tamaño de partícula del residuo lignocelulósico (bagazo de caña de azúcar y coronta de maíz) y el tiempo de incubación sobre la actividad enzimática. Posteriormente, se evaluaron la temperatura y pH apropiados y el efecto de sustancias químicas sobre la actividad enzimática. Las condiciones de cultivo que permitieron obtener extractos enzimáticos crudos con la mayor actividad enzimática fueron: caldo Luria peptonado al 1%, pH 6, 55 °C, 180 rpm, tamaño de inóculo del 5% v/v, tamaño de partícula de 425-600 μm (para coronta) y 75-150 μm (para bagazo), concentración del 2.5% p/v y un tiempo de incubación de 32 horas. La coronta fue el sustrato que promovió la mayor actividad xilanasa comparada con el bagazo. Las condiciones adecuadas para la hidrólisis enzimática fueron pH 6 y 65 °C. La presencia de iones metálicos (Ca^{2+} , Mg^{2+} y Mn^{2+}) y Tritón 100X inhibió fuertemente la actividad xilanasa. Si bien la actividad endoglucanasa fue mínima en casi todos los ensayos, esta mejoró considerablemente (hasta 4.7 y 7.5 veces) cuando se adicionó Mn^{2+} (10 mM) a los extractos enzimáticos crudos de bagazo y coronta, respectivamente. Finalmente, se evidencia que el bagazo y la coronta son residuos agrícolas de interés para la producción de xilanasas de *Geobacillus* sp. 10AC y pueden ser empleados en la bioconversión de la lignocelulosa.

Palabras clave: *Geobacillus* sp., bagazo de caña de azúcar, coronta de maíz, xilanasas, endoglucanasas.

ABSTRACT

The bioconversion of lignocellulosic residues in chemicals and biofuels is an alternative that promotes the development of a sustainable environment. Cellulolytic and xylanolytic enzymes produced by thermophilic microorganisms are of interest for the initial degradation of lignocellulose to its constituent sugars. In this context, this study aimed to evaluate the cellulolytic and xylanolytic enzymatic activity of *Geobacillus* sp. using agricultural waste. The effect of the carbon source type, inoculum size, particle size of the lignocellulosic residues (sugar cane bagasse and corncob), and incubation time on enzyme activity were initially evaluated. Subsequently, the temperature, pH, and chemical effects on enzyme activity were evaluated. The culture conditions that allowed to obtain raw enzymatic extracts with the highest enzymatic activity were: 1% Luria peptone broth, pH 6, 55 °C, 180 rpm, inoculum size of 5% v/v, a particle size of 425-600 µm (for corncob) and 75-150 µm (for bagasse), concentration 2.5% w/v and incubation time of 32 hours. The corncob was the substrate that promoted the highest xylanase activity compared to bagasse. The suitable conditions for enzymatic hydrolysis were pH 6 and 65 °C. The presence of metal ions (Ca²⁺, Mg²⁺, and Mn²⁺) and Triton 100X strongly inhibited the xylanase activity. Although endoglucanase activity was minimal in almost all trials, it improved considerably (up to 4.7 and 7.5 times) when Mn²⁺ (10 mM) was added to the raw enzyme extracts of bagasse and corncob, respectively. Finally, it is evident that bagasse and corncob are agricultural residues of interest for the production of xylanase from *Geobacillus* sp. 10AC and can be used in the lignocellulose bioconversion.

Key Words: *Geobacillus* sp., bagasse sugarcane, corn cob, xylanases, endoglucanases.

INTRODUCCIÓN

Actualmente, las decisiones de las naciones a favor del ambiente se centran en la necesidad de ir reduciendo las emisiones de gases de efecto invernadero, mediante el reemplazo paulatino de combustibles fósiles por biocombustibles, principalmente en el sector transporte, con el objetivo de mitigar los impactos del cambio climático (Pratap & Kumar, 2014). Dichas preocupaciones se han manifestado en esfuerzos mundiales para utilizar la biomasa lignocelulósica como fuente de energía “verde” y que también pueda satisfacer la alta demanda energética (Zhao et al., 2015). En este sentido, los residuos lignocelulósicos agrícolas y forestales resultan ser sustratos claves para la generación de biocombustibles de segunda generación (Bhalla et al., 2015).

La biomasa lignocelulósica de la agricultura generalmente está compuesta de lignina (15-25%), hemicelulosa (23-32%) y celulosa (38-50%), de los cuales sólo estos dos últimos componentes pueden ser convertidos a azúcares fermentables (Arora et al., 2015). Para obtener dichos azúcares, es necesario romper eficazmente los polisacáridos presentes en la lignocelulosa recalcitrante, por ello, para la conversión eficaz de celulosa a glucosa y xilosa se vienen investigando enzimas como las celulasas y xilanasas que sean altamente eficientes (Blumer-Schuette et al., 2008). En este contexto, algunos microorganismos de los géneros *Bacillus* y *Geobacillus* han sido reportados como productores de enzimas termoestables que incluyen celulasas y xilanasas (Ng et al., 2009). Este tipo de enzimas termoestables resultan de interés para procesos industriales debido a su prolongada vida útil, compatibilidad con el pretratamiento térmico, disminuye la contaminación microbiana a altas temperaturas y presentan actividad durante más tiempo (Bhalla

et al., 2014). En este contexto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad enzimática celulolítica y xilanolítica de *Geobacillus* sp. procedente de la fuente termal Huancarhuás (Huaylas-Ancash, Perú), empleando residuos lignocelulósicos como el bagazo de caña de azúcar y la coronta de maíz amarillo, a fin de que promueven una mayor síntesis de enzimas endoglucanasas y xilanasas con un alto grado de hidrólisis enzimática y que liberen azúcares fermentables, sugiriendo que el empleo de las enzimas de *Geobacillus* sp. puede ser muy ventajoso en la obtención de azúcares para su posterior conversión en bioetanol. Asimismo, se ha determinado la temperatura y pH óptimos, y el efecto de sustancias como las sales de calcio y manganeso y el Tritón X100 sobre la actividad enzimática del extracto enzimático producido por *Geobacillus* sp.

Capítulo I

PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Planteamiento y formulación del problema

Los microorganismos termófilos son candidatos muy atractivos para la bioconversión de la lignocelulosa en biocombustibles de segunda generación, porque producen enzimas eficaces, robustas, degradadoras de carbohidratos hemicelulósicos y tienen la capacidad de sobrevivir bajo condiciones “duras” en bioprocesos que reflejan sus hábitats naturales (Blumer-Schuetz et al., 2014). Las celulasas y xilanasas, especialmente producidas por las bacterias termófilas pueden ser usadas para desarrollar procesos de conversión de la biomasa más eficientes y de costos efectivos sostenibles (Bhalla et al, 2013). Entre los microorganismos termófilos e hipertermófilos lignocelulolíticos potenciales se encuentran los del género *Geobacillus*, que ha sido reportado como productor de dichas enzimas a partir de su aislamiento desde ambientes termófilos. En este sentido, y producto de investigaciones anteriores en el Centro de Investigación de la Biodiversidad y Recursos Genéticos de Ancash de la Universidad Nacional Santiago Antúnez de Mayolo, se han aislado cepas del género *Geobacillus* desde la fuente termal Huancarhuás (Huaylas, Perú), por tanto, frente a la coyuntura antes descrita se plantea la interrogante: ¿Cuál es el potencial celulolítico y xilanolítico de *Geobacillus* sp. nativos empleando residuos lignocelulósicos?

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo general

Evaluar el potencial celulolítico y xilanolítico de *Geobacillus* sp. nativos empleando residuos lignocelulósicos.

1.2.2. Objetivos específicos

- Determinar el residuo lignocelulósico que promueve la mayor actividad celulolítica y xilanolítica en las cepas de *Geobacillus* sp. y seleccionar la mejor cepa.
- Determinar la cantidad de inóculo, el tamaño de partícula del residuo lignocelulósico, su concentración y el tiempo de incubación que promueve la mayor actividad celulolítica y xilanolítica en la cepa de *Geobacillus* sp. seleccionada.
- Caracterizar la actividad celulolítica y xilanolítica del mejor extracto enzimático en cuanto a pH y temperatura óptimos y el efecto de sustancias químicas.

1.3. Justificación

La composición de los residuos lignocelulósicos, su abundancia y sus costos bajos motivan a que sean considerados como material de partida ideal para la generación rentable de diferentes productos industriales. Sin embargo, su limitado uso comercial y las deficiencias en las infraestructuras para procesar desechos agrícolas orientadas a la adición de valor agregado actúan como disuasivos importantes para una utilización eficaz de la lignocelulosa.

Muchas iniciativas recientes de organizaciones gubernamentales en estrecha asociación con agricultores y científicos tienen como objetivo la utilización óptima de los desechos agrícolas mediante el uso de herramientas avanzadas de biología moderna y biotecnología lignocelulósica (Kapoor, Panwar, & Kaira, 2016). Una de las áreas más importantes de la investigación básica y aplicada en la actualidad en muchos laboratorios financiados con fondos públicos y privados es el valor agregado que se le puede dar a los desechos agrícolas al convertirlos en productos de interés industrial-comercial (Anwar, Gulfraz, & Irshad, 2014). Lo expuesto ha motivado que en la presente investigación se evalúe: (1) el potencial uso de los residuos como la coronta de maíz y el bagazo de caña de azúcar para producir enzimas lignocelulósicas y (2) el potencial enzimático celulolítico y xilanolítico del termófilo *Geobacillus* sp. 10AC aislado de una fuente termal regional (Ancash).

El Perú, a través del Ministerio del Ambiente (2021) ha establecido la *Política Ambiental Nacional del Ambiente al 2030*. Entre sus objetivos prioritarios se tiene el de mejorar la conservación de las especies y la diversidad genética con el lineamiento de fortalecer el desarrollo de la biotecnología. Por tal motivo y en concordancia con la política ambiental se considera que la presente investigación contribuye con: (1) estudiar las bondades de los microorganismos nativos aislados de la fuente termal Huancarhuaz (Huaylas, Ancash), (2) generar información para continuar con el desarrollo de la biotecnología regional y nacional, y (3) la información generada pueda servir para el fortalecimiento de capacidades de los funcionarios encargados de

formular políticas y lineamientos para la adecuada gestión de los recursos genéticos.

Por otra parte, el Ministerio de Agricultura ha mostrado el interés por planificar el uso de la biomasa como fuente de energía, por ello, elaboró la *Propuesta del Plan Nacional de Agroenergía 2009 – 2020*, en donde considera que las actividades de la agricultura, pecuarias y forestales son fuente de recursos energéticos, cuya biomasa residual constituye materia prima para producir biocombustibles líquidos, sólidos y gaseosos. Su uso tendría el potencial de contribuir a la diversificación de las fuentes de energía a nivel nacional, además constituye una nueva opción de desarrollo productivo para los agricultores de las zonas rurales pues se estaría generando un valor agregado a su producción, cuyos desechos agrarios generalmente son quemados o inadecuadamente dispuestos (Ministerio de Agricultura, 2009). Este plan tiene como lineamientos la promoción y desarrollo de investigaciones relacionadas con la generación de biocombustibles de segunda generación debido a que contribuiría con la reducción de los gases de efecto invernadero y un mejor uso de la biomasa residual, comuna mínima incidencia en el cambio de uso de las tierras, el recurso hídrico y los recursos naturales. Los residuos de la agricultura procedentes de la caña de azúcar, el arroz, la coronta de maíz, entre otros, y los residuos producidos por los aserraderos también pueden ser empleados para la producción de bioetanol como biocombustible líquido de segunda generación.

Dado que la eficiente hidrólisis de la biomasa lignocelulósica a azúcares fermentables necesita de un repertorio completo de enzimas, se propone el uso de celulasas y hemicelulasas, principalmente producidas por microorganismos termófilos. En este sentido, especies del género *Geobacillus* han sido reportadas como productoras de dichas enzimas a partir de su aislamiento desde ambientes termófilos (fuentes termales y composteras) y su cultivo en medios enriquecidos con sustratos lignocelulósicos agrícolas (bagazo de caña de azúcar, paja de arroz, pastizales, etc.). Ello conllevó a estudiar dos cepas de *Geobacillus* sp. nativas aisladas en investigaciones anteriores desde la fuente termal Huancarhuás para conocer su potencial enzimático empleando residuos lignocelulósicos.

1.4. Delimitación

Se trabajó con dos cepas de *Gebacillus* sp. pertenecientes al cepario del Centro de Investigación de la Biodiversidad y Recursos Genéticos de Ancash de la Facultad de Ciencias de la UNASAM, aisladas de la Fuente Termal Huancarhuás – Huaylas, Ancash. En cuanto a los residuos lignocelulósicos empleados fueron: Bagazo de caña de azúcar y coronta de maíz amarillo.

Capítulo II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de la investigación

Entre los reportes sobre *Geobacillus* sp. se tiene el de Ng et al. (2009), quienes aislaron desde una compostera de arroz en la fase termófila (55 – 70 °C) a un miembro del género *Geobacillus* al que denominaron *Geobacillus* sp. 70PC53, a partir del cual y luego de una evaluación inicial de su actividad celulasa del tipo endoglucanasa, clonaron el gen que expresaba la actividad celulolítica y la recombinaron sobre *E. coli*, dando como resultado el mejoramiento de ésta última en cuanto la producción de enzimas endoglucanasas altamente termostables (90% de actividad luego de 6 horas de incubación a 65 °C) con actividad sobre un amplio rango de temperaturas (45-75 °C) y pH, con óptimos a 65 °C y 5 respectivamente, características que según los autores, representan un alto potencial de aplicación de dichas enzimas en procesos industriales de conversión de la biomasa (residuos de agricultura y forestería), mejoramiento de detergentes, pulpa de papel, fabricación de textiles y clarificación de jugos.

Por otra parte, las hemicelulasas son consideradas como enzimas que juegan un papel importante en la hidrólisis del componente hemicelulósico de la lignocelulosa a xilooligosacáridos y xilosa, lo que ha llevado poner atención a las xilanasas termoestables por su importancia industrial debido a su prolongada vida media a elevadas temperaturas (Bhalla et al., 2014). Por ejemplo, Quintero et al. (2007) quienes desde la fuente termal de Las

Trincheras (Venezuela) que posee una temperatura de 90°C aislaron a la especie *Geobacillus pallidus* que presentó la capacidad productora de una enzima degradadora del xilano del tipo β -xilosidasa de característica termoestable (reteniendo el 60 % de su actividad luego de 4 horas de incubación a 70 °C), con temperatura óptima de 70 °C y pH 8 y que los autores consideraron necesario clonar el gen que expresaba la actividad xilanasas a fin de mejorar las propiedades enzimáticas para su posterior aplicación biotecnológica.

Por su parte, Bhalla et al. (2015) reportaron que *Geobacillus* sp. WSUCF1 a partir de su cultivo con materiales lignocelulósicos producía xilanasas con gran actividad en un amplio rango de temperaturas y pH, con óptimos de 70°C y 6.5 respectivamente y una alta termoestabilidad (vida media de 18 y 12 días a 60°C y 70°C respectivamente, propiedades que hacen que las xilanasas de WSUCF1 sean adecuadas para procesos de bioconversión termofílica de los materiales lignocelulósicos.

2.2. Bases teóricas

2.2.1. Residuos lignocelulósicos

Según Kumar et al. (2014) lignocelulosa es un término usado para definir a la biomasa vegetal generalmente no comestible y constituye el recurso natural renovable más abundante sobre la tierra, siendo sus fuentes principales los residuos agrícolas (bagazo de caña de azúcar, mazorcas de maíz, paja y cáscara de arroz, paja de trigo y cebada, etc.) y los residuos forestales (restos de madera de aserraderos, restos madereros de tala de bosques, etc.), también incluye a

los residuos industriales (restos de molinos y pasta de papel, etc.) y a los residuos orgánicos (restos vegetales de cocina, desechos de madera y papelería).

La biomasa lignocelulósica común contiene lignina (15-15%), hemicelulosa (23-32%) y celulosa (38-50%), estas dos últimas son polisacáridos que pueden ser convertidos en azúcares fermentables, mientras que la lignina es un componente polifenólico no fermentable (Arora et al., 2015). Según Bhatia et al. (2012), existe un gran interés para el reúso de dichos residuos, ya que desde un aspecto económico dichos residuos pueden ser utilizados como materias primas de bajo costo para para la producción de otros compuestos de valor agregado (como el bioetanol), con la expectativa de reducir los costos de producción.

a) Coronta de maíz

La coronta de maíz es un residuo agrícola que se genera a partir del maíz, el cual es uno de los principales cultivos comerciales del mundo. Según el Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI, 2019) y el Ministerio de Agricultura y Riego (MINAGRI, 2020) en Perú, la producción media anual de maíz (amiláceo y duro) entre los años 2014 y 2019 fue de 1575.8 miles de toneladas. Se estima que por cada 100 kg de granos de maíz se producen 18 kg de coronta (Kapoor et al., 2016; Knob et al., 2014); por lo que, teniendo en cuenta dicha relación, en Perú se estarían generando 283.6 miles de toneladas/año de coronta de maíz.

Generalmente, este residuo se desecha o se vende a precios muy bajos como piensos alimentarios para animales. En un contexto más local, es usado como fuente de energía primaria (leña) o es dispuesto de manera inadecuada. Sin embargo, resulta atractivo dada su composición de celulosa (48.1 %), hemicelulosa (37.2 %) y lignina (14.7 %) (Vassilev et al., 2012). Este contenido nutricional permite usarlo como fuente de carbono para cultivar microorganismos y obtener enzimas como las endoglucanasas y xilanasas o también puede ser convertido en otros químicos de valor agregado como xilitol, etanol, pigmento de monascus y xilooligosacáridos (Ashour et al., 2013; Patel & Shukla, 2017). Por tanto, es un residuo agrícola que necesita ser valorizado y no compite por el uso de la tierra en la producción de alimentos

b) Bagazo de caña azúcar

Según la Real Academia Española (RAE, 2017), el bagazo es un residuo fibroso resultante de la trituración, presión o maceración de frutos, semillas, tallos, etc., para extraerles su jugo, especialmente el de la vid o la caña de azúcar. Por su parte el Ministerio de Agricultura y Riego (MINAGRI, 2014) define la bagazo de caña de azúcar como el residuo que se obtiene al moler la caña. Según el Instituto Nacional de Estadística e Informática (2019) y el MINAGRI (2020) en Perú, la producción media anual de caña de azúcar entre los años 2014 y 2019 fue de 10345.5 miles de toneladas. Asimismo, se estima que por cada tonelada de caña de azúcar se producen 0.3 toneladas de bagazo (Chacón, 2014). Teniendo en cuenta dicha relación, en Perú se estarían generando 3103.6 miles de toneladas/año de

bagazo de caña de azúcar. Este residuo también resulta atractivo para estudios de potencial enzimático en diversos microorganismos dada su composición en celulosa (47.4 %), hemicelulosa (29.1 %) y lignina (23.5 %) (Vassilev et al., 2012).

2.2.2. Enzimas lignocelulolíticas

En los últimos años el empleo de residuos lignocelulósicos para la producción industrial de enzimas ha venido aumentando. Las enzimas como las celulasas y xilanasas son las de mayor interés por su capacidad para hidrolizar la biomasa en sus componentes estructurales. Los carbohidratos (celulosa y hemicelulosa) son hidrolizadas por celulasas y xilanasas a azúcares monómeros como glucosa, xilosa, manosa, arabinosa y galactosa. Estos azúcares monómeros se utilizan como fuentes de carbono para la producción de diferentes productos industriales como etanol, xilitol, biobutanol, biohidrógeno, etc. (A. Kumar, Gautam, & Dutt, 2016). Por ello, el interés de estudiar enzimas como las celulasas y xilanasas, sobre todo aquellas producidas por microorganismos termófilos.

a) Celulasas

Los microorganismos capaces de degradar la celulosa producen una batería de enzimas con diferentes especificidades. Según Sánchez (2009), las celulasas responsables de la hidrólisis de la celulosa la conforman una compleja mezcla de enzimas con diferentes sitios hidrolíticos específicos que actúan sobre los enlaces β -1,4-glicosídicos. Las celulasas se clasifican en tres principales grupos de acuerdo a su actividad enzimática: Endoglucanasas o

endo-1,4 β -glucanasa (EC 3.2.1.4), Celobiohidrolasas (EC 3.2.1.91) y β -glucosidasas (EC 3.2.1.21).

b) Xilanasas

Dada su habilidad de biodegradación del xilano, las endo-1,4- β -xilanasas resultan ser muy atractivas y pueden ser empleadas para la producción de etanol y xilitol. Además de la biorefinería, las xilanasas tienen un potencial industrial para su uso en la fabricación de vino, textilera, papelería y pulpa, crianza de animales, panadería y extracción de jugo de fruta (Chadha et al., 2019) (Figura 1).



Figura 1. Aplicaciones de las celulosas y xilanasas en diferentes industrias

Fuente: Tomado de Bhardwaj, Kumar, & Verma (2019)

2.2.3. Condiciones de cultivo

La actividad celulolítica y xilanolítica es altamente influenciada por las condiciones del medio de cultivo, como son: tipo de sustrato carbonado, pH,

disponibilidad de nutrientes, presencia y concentración de inductores o represores, temperatura y tiempo de incubación (Singhania et al., 2010). Por su parte, Vasconcellos et al. (2016) indican que iones metálicos como Mn^{+2} y Ca^{+2} cumplen una función potencial en la reducción de la adsorción de enzimas sobre la lignina durante los procesos de hidrólisis de la celulosa, lo que conduce a aumentos en la liberación de azúcares. Es por ello que en la evaluación del potencial enzimático celulolítico y xilanolítico de un microorganismo es necesario tener en cuenta la influencia de esos factores a fin de optimizar los resultados.

2.3. Definición de términos

a) Ácido 3,5-dinitro salicílico (DNS)

El ácido 3,5-dinitro salicílico es un reactivo usado para la determinación de azúcares reductores. Asimismo, es utilizado para la determinación de endocelulasas y endoxilanasas y se basa en la determinación de la presencia de grupos carbonilos libres ($C=O$) de los llamados azúcares reductores (Miller, 1959). Este reactivo no es específico y reacciona con azúcares reductores de cinco y seis carbonos, aunque este ensayo no permite la discriminación entre carbohidratos específicos, puede usarse para cuantificar la hidrólisis de una amplia gama de sustratos de polisacáridos (Ding et al., 2008).

b) Celulosa

La celulosa es un polímero de cadena larga compuesto de unidades repetitivas de D-glucosa, un azúcar simple; siendo el componente principal de las paredes de las células vegetales (V. Kumar et al., 2014). Está formada

por unidades paralelas de D-glucopiranosa no ramificadas unidas por enlaces β -1,4-glicosídicos que forman microfibrillas cristalinas y altamente organizadas mediante extensos enlaces hidrógeno inter e intramoleculares y fuerzas de Van Der Waals, la región de ruptura de dichos enlaces y en donde se pierde la disposición ordenada se conoce como celulosa amorfa (Quiroz-Castañeda & Folch-Mallol, 2013).

c) Endoglucanasas

Las endo- β -1,4-glucanasas (EC 3.2.1.4), también denominadas como endoglucanasas, son las principales enzimas responsables de la ruptura de los enlaces glicosídicos internos de las cadenas de celulosa (Santos et al., 2012).

d) Endoxilanasas

Son enzimas que catalizan la hidrólisis del esqueleto de xilano, produciendo xilooligosacáridos. Estos pueden ser convertidos a xilosa por las β -d-xilosidasas, que luego puede ser utilizada como fuente de energía por diferentes microorganismos (Parachin et al., 2009).

e) Xilano

Bibi et al. (2014) propone que el xilano es el segundo polisacárido ampliamente disponible en la naturaleza al constituir el componente mayoritario de la hemicelulosa. Estructuralmente está formado por unidades de azúcares de xilosa unidos por enlaces β -1,4 formando una cadena a los que se asocian otros grupos y azúcares como: ácido glucorónico, arabinosa y residuos de acetil o manosa.

2.4. Hipótesis

Por lo menos una cepa de *Geobacillus* sp. nativo presenta potencial para hidrolizar la celulosa y xilano contenida en los residuos lignocelulósicos.

2.5. Variables

Tabla 1. Variables de investigación

VARIABLES INDEPENDIENTES	DIMENSIONES	INDICADOR	
Condiciones de cultivo de <i>Geobacillus</i> sp.	Fuente de carbono	Tipo de residuo lignocelulósico	
	Inóculo	Cantidad de inóculo (% v/v)	
	Residuo lignocelulósico	Tamaño de partícula (µm)	
		Concentración de sustrato (% p/v)	
Condiciones de hidrólisis enzimática	Tiempo de incubación	Número de horas	
	pH	Udad. De pH	
	Temperatura	Temperatura (°C)	
	Sustancias químicas	Concentración de sustancias (mg/ml)	
DEPENDIENTE			
Actividad enzimática celulolítica y xilanolítica	La actividad celulolítica y xilanolítica se manifiesta en la capacidad enzimática de hidrolizar la celulosa y el xilano respectivamente, presentes en los residuos lignocelulósicos.	Actividades enzimáticas: celulolítica y xilanolítica (UI/L)	

Capítulo III

METODOLOGÍA

3.1. Tipo de investigación

Dada la naturaleza del objeto de estudio (potencial celulolítico y xilanolítico de *Geobacillus* sp.) se ha realizado una investigación del tipo experimental, pues se han manipulado y observado el efecto de ciertas variables sobre la actividad enzimática indicada.

3.2. Diseño de investigación

Se empleó un diseño de investigación experimental en el que se evaluaron los efectos que tenían las variables independientes (tipo de sustrato carbonado, tamaño de inóculo, tamaño de partícula, concentración de sustrato, pH, Temperatura y sustancias químicas) sobre la variable dependiente (actividad enzimática celulolítica y xilanolítica de *Geobacillus* sp.). Para ello, se cultivó la cepa de *Geobacillus* sp. en medios enriquecidos con residuos lignocelulósicos y se verificó su capacidad celulolítica y xilanolítica. Se manejó la metodología de la Optimización de Factor a la Vez (OFAT, por sus siglas en inglés), en el cual, por ejemplo, cuando se varió el tamaño de partícula del residuo lignocelulósico los otros factores de incubación (pH, temperatura, agitación, cantidad de inóculo, concentración de sustrato y tiempo de cultivo) se mantenían constantes. Asimismo, las pruebas de hidrólisis enzimática que permitían verificar las actividades endoglucanasa y xilanasas de los extractos enzimáticos crudos se realizaron por triplicado, manejando sus respectivos grupos de control.

3.3. Población y muestra

3.3.1. Población

Cepas de *Geobacillus* sp. del laboratorio del Centro de Investigación de la Biodiversidad y Recursos Genéticos de Ancash (CIByRGA) perteneciente a la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Santiago Antúnez de Mayolo.

3.3.2. Muestra

Está conformada por las cepas *Geobacillus* sp. 10AC y *Geobacillus* sp. 29AC, las mismas que se encuentran en el banco de cepas del Laboratorio del Centro de Investigación de la Biodiversidad y Recursos Genéticos de Ancash.

3.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

3.4.1. Preparación de sustratos lignocelulósicos

Los sustratos usados fueron el bagazo de caña de azúcar y la coronta de maíz amarillo. Estos sustratos fueron lavados y secados a temperatura ambiental hasta obtener un peso constante, posteriormente, la coronta de maíz fue triturada y tamizada, seleccionándose sólo las partículas con diámetros entre 4 y 4.75 mm (Tamiz ASTM N° 4). Las muestras secas de bagazo y coronta de maíz fueron sometidas a un pretratamiento químico-térmico, y luego, a un pretratamiento físico.

En el pretratamiento químico-térmico se mezclaron 100 g de muestra (residuo lignocelulósico) con 1 L de NaOH 2.4% (p/v) y se autoclavó a 121°C,

1 atm, 20 minutos. Seguidamente, se lavó con agua potable hasta obtener pH constante de 7, y se dejó secar hasta obtener peso constante (Tamariz-Angeles et al., 2020). El tratamiento físico consistió en la reducción del tamaño de partícula y se aplicó a las muestras secas de bagazo y coronta de maíz con tratamiento químico-térmico, para lo cual se usó un molino de laboratorio Thomas Wiley Modelo 4 y finalmente las muestras ya molidas fueron tamizadas con mallas ASTM N° 20 ($>850\ \mu\text{m}$), 30 ($600-850\ \mu\text{m}$), 40 ($425-600\ \mu\text{m}$), 50 ($300-425\ \mu\text{m}$), 100 ($150-300\ \mu\text{m}$) y 200 ($75-150\ \mu\text{m}$). Los pesos obtenidos fueron registrados en gramos, obteniendo promedios de 3 repeticiones \pm desviación estándar. Estos residuos pretratados fueron usados como única fuente de carbono en los posteriores estudios de fermentación sumergida.

3.4.2. Evaluación del efecto del tipo de sustrato carbonado sobre la actividad celulolítica y xilanolítica de *Geobacillus* sp.

Dada la composición nutricional de los residuos lignocelulósicos, estos pueden ser usados para el cultivo y producción de enzimas. Por ello, para dilucidar el potencial uso de la coronta de maíz y el bagazo de caña de azúcar como fuente de carbono para la producción de celulasas y xilanasas, las cepas de *Geobacillus* sp. fueron cultivadas en medios que contenían estos sustratos carbonados. En este sentido, las cepas de *Geobacillus* sp. 10AC y *Geobacillus* sp. 29AC fueron cultivados en caldo Luria peptonado variando la fuente carbonada.

La composición del caldo Luria fue: peptona (1 % p/v), cloruro de sodio (1 % p/v) y extracto de levadura (0.5 % p/v) con pH ajustado a 6.5. Los

sustratos carbonados fueron (1 % p/v): bagazo de caña de azúcar pretratado (partículas con tamaños entre 150 μm – 300 μm), coronta de maíz pretratado (partículas con tamaños entre 150 μm – 300 μm), carboximetilcelulosa, xilano y papel filtro. Asimismo, se emplearon inóculos frescos (20 h de cultivo) de 250 μL con 0.1 de densidad óptica (a 620 nm). La incubación se realizó a 55 °C en baño maría a 180 RPM por un tiempo de 24 horas. Terminado el periodo de incubación se extrajeron alícuotas de 2 mL que fueron centrifugadas a 13400 RPM por 2 minutos, luego se recuperaron los sobrenadantes a fin de tener los extractos enzimáticos libres de células y conteniendo sólo las enzimas extracelulares. Estos extractos fueron usados como fuente de enzimas para la evaluación de la actividad celulolítica y xilanolítica.

Para cuantificar la actividad enzimática celulasa (endoglucanasa) y xilanasa se empleó el método del DNS (ácido 3,5 dinitrosalicílico). Se procedió según (Tamariz-Angeles et al., 2014), para ello, se preparó buffer fosfato (50 mM; pH 6) suplementado con carboximetil celulosa (1% p/v) y xilano (1% p/v) respectivamente. La hidrólisis enzimática se realizó a 65 °C por 2 horas, empleándose 90 μL del sustrato carbonado y 90 μL del extracto enzimático crudo según Tamariz-Angeles et al. (2014) con modificación en la temperatura de incubación. Las pruebas se realizaron por triplicado. Para la cuantificación de los azúcares reductores producidos se empleó el método del DNS según King et al. (2009) modificado por (Tamariz-Angeles et al., 2014) para temperatura y tiempo de reacción (92 °C; 8 min). Finalmente, la cepa y el sustrato que produjeron la mayor actividad celulolítica y xilanolítica fueron seleccionados para los ensayos posteriores.

3.4.3. Evaluación del efecto de la concentración de inóculo, sustrato lignocelulósico y medio de cultivo sobre la actividad celulolítica y xilanolítica de la cepa de *Geobacillus* sp. seleccionada

La cepa de *Geobacillus* sp. 10AC fue cultivada en caldo Luria variando su composición nitrogenada (peptona o triptona al 1 % p/v, pH 6.5), enriqueciendo el medio con un sustrato carbonado (bagazo o coronta) y empleando inóculos frescos (20 horas de cultivo) con 0.1 de densidad óptica (a 620 nm) en concentraciones del 1, 2, 3, 4, 5 y 6 % (v/v). La incubación se realizó a 55 °C y 180 RPM por 24 horas. Para la recuperación de extractos enzimáticos y la cuantificación de la actividad enzimática se procedió según lo descrito anteriormente. Las pruebas se realizaron por triplicado seleccionando la concentración de inóculo y fuente nitrogenada que promueven la mayor actividad enzimática.

3.4.4. Evaluación del efecto del tamaño de partícula del residuo lignocelulósico sobre la actividad celulolítica y xilanolítica de la cepa de *Geobacillus* sp. seleccionada

La cepa de *Geobacillus* sp. 10AC fue cultivada en caldo Luria peptonado (1% p/v, pH 6.5), enriquecido al 1 % (p/v) con sustratos carbonados de coronta y bagazo. Los tamaños de partícula de los sustratos lignocelulósicos correspondían a los tamices ASTM 30 (600-850 µm), 40 (450-600 µm), 50 (300-450 µm), 100 (150-300 µm) y 200 (75-150 µm). Asimismo, se emplearon inóculos frescos (20 horas de cultivo) al 5 % (v/v) con densidad óptica de 0.1 (a 620 nm). La incubación se realizó a pH 6.5, 55 °C y 180 RPM por 24 horas. Terminado el tiempo de incubación se recuperaron los extractos enzimáticos y se cuantificó la actividad enzimática endoglucanasa y xilanasas según lo

descrito inicialmente. Las pruebas se realizaron por triplicado y se seleccionó el tamaño de partícula que promovía la mayor actividad enzimática.

3.4.5. Evaluación del efecto de la concentración de sustrato lignocelulósico sobre la actividad celulolítica y xilanolítica de la cepa de *Geobacillus* sp. seleccionada

Una vez seleccionado el tamaño de partícula adecuado se evaluó el efecto de la concentración del sustrato lignocelulósico sobre la actividad celulolítica y xilanolítica. Para ello, la cepa de *Geobacillus* sp. seleccionada fue cultivada en caldo Luria peptonado (1 % p/v, pH 6.5) enriquecido con bagazo o coronta de maíz con concentraciones del 1 al 3 % (p/v), con intervalos de 0.5 %. Asimismo, se emplearon inóculos frescos (20 horas de cultivo) al 5 % (v/v) con densidad óptica de 0.1 (a 620 nm). La incubación se realizó a 55 °C y 180 RPM por 24 horas. Terminado el tiempo de incubación se recuperaron los extractos enzimáticos y se cuantificó la actividad enzimática endoglucanasa y xilanasa según lo descrito inicialmente. Las pruebas se realizaron por triplicado y se seleccionó la concentración de sustrato lignocelulósico que promovía la mayor actividad enzimática.

3.4.6. Evaluación del efecto del tiempo de cultivo sobre la actividad celulolítica y xilanolítica de la cepa de *Geobacillus* sp. seleccionada

Una vez seleccionada la concentración de sustrato adecuado se evaluó el efecto del tiempo de incubación sobre la actividad celulolítica y xilanolítica. Para ello, la cepa de *Geobacillus* sp. seleccionada fue cultivada en caldo Luria peptonada (1 % p/v, pH 6.5) enriquecido con bagazo o coronta de maíz con concentraciones del 2.5 % (p/v). Asimismo, se emplearon inóculos frescos (20

horas de cultivo) al 5 % (v/v) con densidad óptica de 0.1 (a 620 nm). La incubación se realizó a 55 °C y 180 RPM por 12, 16, 20, 24, 28, 32 y 36 horas. Terminado el tiempo de incubación se recuperaron los extractos enzimáticos y se cuantificó la actividad enzimática endoglucanasa y xilanasa según lo descrito inicialmente. Las pruebas se realizaron por triplicado y se seleccionó el tiempo de incubación que promovía la mayor actividad enzimática.

3.4.7. Caracterización de la actividad enzimática celulolítica y xilanolítica de los extractos enzimáticos seleccionados

a) Evaluación del efecto del pH

A fin de evaluar el efecto del pH sobre la actividad endoglucanasa y xilanasa, las hidrólisis enzimáticas se realizaron a pH en el rango de 5 a 8 con incrementos de 0.5. Las pruebas se realizaron por triplicado y se seleccionó el pH donde la actividad enzimática era la mayor.

b) Evaluación del efecto de la temperatura

Teniendo en cuenta el pH adecuado, se evaluó el efecto de la temperatura entre 45 y 90 °C (con incrementos de 5 °C) sobre la actividad endoglucanasa y xilanasa. Las pruebas se realizaron por triplicado y se seleccionó la temperatura que mostró la mayor actividad enzimática.

c) Evaluación del efecto de sustancias químicas

Se evaluó también el efecto de sustancias químicas como las sales de calcio y manganeso y el agente surfactante Tritón X100 sobre la actividad celulolítica y xilanolítica del extracto enzimático seleccionado. Para evaluar el

efecto de iones metálicos como Ca^{+2} y Mn^{+2} sobre la actividad endoglucanasa y xilanasa se procedió según Vasconcellos (2016) agregándose el Ca^{+2} en forma de cloruro y el Mn^{+2} forma de sulfato con concentraciones finales de 1 mM y 10 mM en los volúmenes de reacción a temperatura y pH óptimos. Las actividades enzimáticas sin la adición de iones fueron usadas como valores referenciales. Las pruebas se realizaron por triplicado. Mientras que para evaluar el efecto del surfactante sobre la actividad enzimática se procedió según Odeniyi et al. (2012), para ello, se prepararon concentraciones de Tritón X100 (polyethylene- glicol *p*-isooctylphenyl ether) de 1 y 10 mM, la hidrólisis enzimática se realizó teniendo en cuenta la temperatura y pH óptimos. Las pruebas se realizaron por triplicado.

3.5. Plan de procesamiento y análisis estadístico de datos

Para el análisis de datos se empleó el software estadístico MiniTab aplicando el análisis de varianza (ANOVA) para determinar si las actividades enzimáticas difieren significativamente entre sí. Seguidamente, se realizó la comparación múltiple de medias mediante la prueba Tukey ($\alpha=0.05$) para determinar la condición que promovía la mayor actividad enzimática. Este análisis se empleó para las pruebas experimentales de evaluación del efecto de tipo de sustrato carbonado, tamaño de partícula, concentración de sustrato, tiempo de incubación, pH, temperatura y sustancias sobre la actividad enzimática celulolítica y xilanolítica.

Diagrama de flujo del trabajo realizado

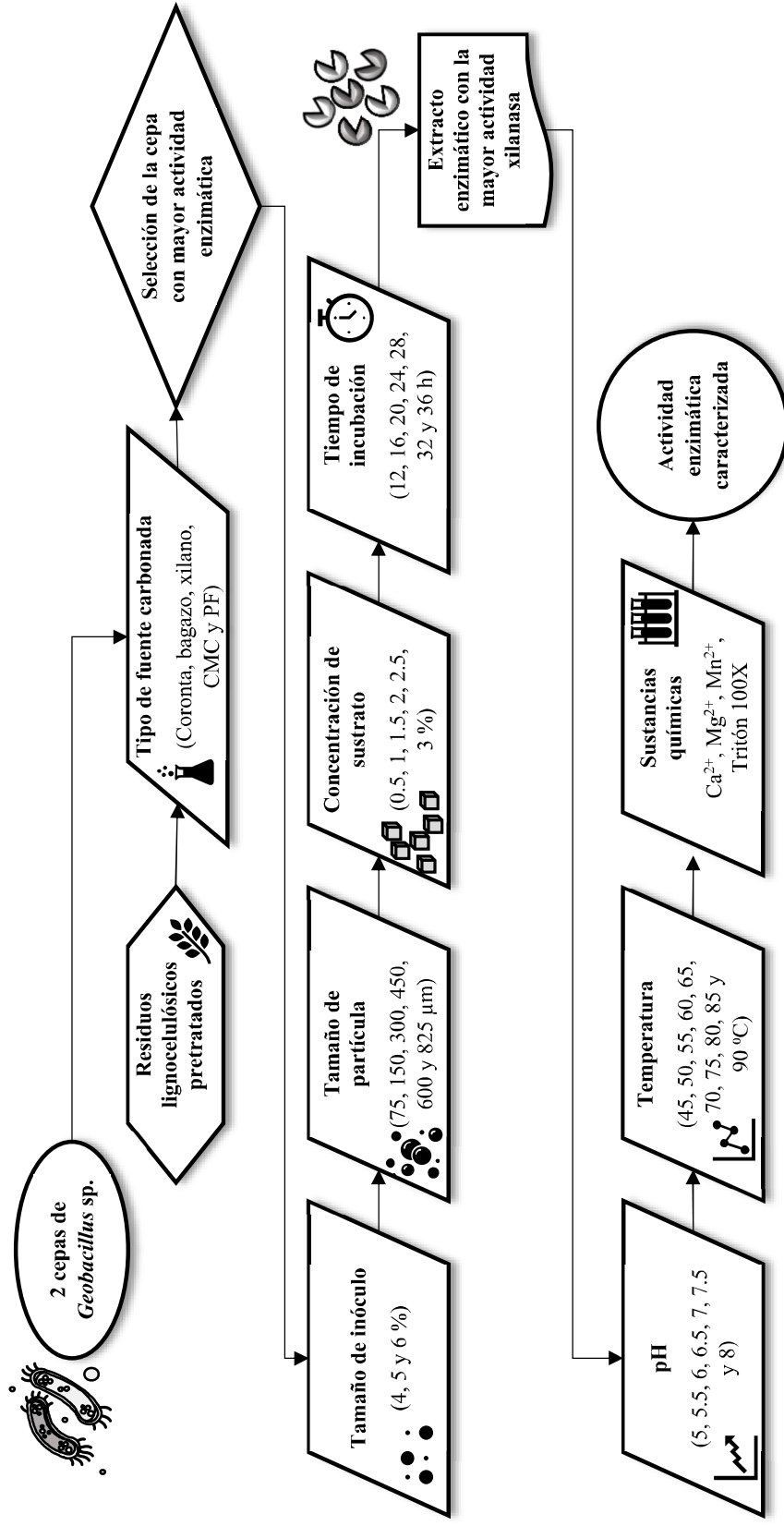


Figura 2. Diagrama de flujo de la evaluación del potencial celulolítico y xilanolítico de *Geobacillus* sp.

Capítulo IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Presentación de resultados

4.1.1. Pretratamiento de sustratos

Para el cultivo de las cepas de *Geobacillus* sp. se usó el bagazo de caña de azúcar pretratado y la coronta de maíz pretratada, para ello, dicho sustratos fueron sometido a los pretratamientos químico-térmico (hidrólisis alcalina con NaOH al 2.4% a 121°C por 20 minutos) y físico (molienda). El propósito de un pretratamiento con hidróxido de sodio es degradar la lignina, incrementar la superficie interna de la hemicelulosa, reducir la cristalinidad de la celulosa e incrementar la porosidad de los materiales y así mejorar la hidrólisis enzimática (Irfan, Gulsher, Abbas, Syed, & Nadeem, 2011; Singh, Shukla, Tiwari, & Srivastava, 2014). En este sentido, se pretrataron 100 g tanto de bagazo de caña de azúcar como de coronta de maíz, cuyos pesos obtenidos después del pretratamiento se presentan en la Tabla 2.

Posterior al pretratamiento indicado se realizó el pretratamiento mecánico mediante molienda para reducir el tamaño de las partículas del bagazo de caña de azúcar. Esto permite incrementar el área de superficie específica de las partículas y disminuir el grado de polimerización y cristalinidad de la celulosa, de éste modo volver a la biomasa lignocelulósica más susceptible a la digestibilidad microbiana y la hidrólisis enzimática (Singh et al., 2014).

Asimismo, el tamaño de las partículas del sustrato puede inducir significativamente en la producción de celulasas y xilanasas, así la actividad celulasa y/o xilanasas puede verse favorecida considerablemente a medida que el tamaño de la partícula disminuye (Ang et al., 2013). Por ello, posterior a la molienda, los diferentes tamaños de las partículas fueron separados usando tamices ASTM (N° 20, 30, 40, 50, 100 y 200). Los mayores pesos obtenidos para el caso del bagazo de caña de azúcar corresponden al tamiz N° 100 con tamaños de partículas comprendidas entre 150 y 300 μm . En el caso de la coronta de maíz el mayor tamaño corresponde al tamiz N° 40 con tamaños de partículas entre 425 y 600 μm (Tabla 2).

Tabla 2. Pesos obtenidos después de los tratamientos de sustratos

Sustrato pretratado	Peso inicial (g)	Químico – térmico (g)	Molienda (g)	Pretratamiento					Peso final (g)		
				Tamizado							
				< 200 (<75 µm)	200 (75-150 µm)	100 (150-300 µm)	50 (300-425 µm)	40 (425-600 µm)		30 (600-850 µm)	20 (>850 µm)
Bagazo de caña de azúcar	100.00 ± 0.01	48.77 ± 0.03	45.01 ± 0.10	7.51 ± 0.01	9.55 ± 0.01	23.90 ± 0.01	2.85 ± 0.01	0.96 ± 0.01	-	-	44.77 ± 0.01
Coronta de maíz	100.00 ± 0.01	49.17 ± 0.01	45.97 ± 0.10	2.03 ± 0.01	4.40 ± 0.01	9.98 ± 0.01	8.38 ± 0.01	14.9 ± 0.01	4.78 ± 0.01	1.15 ± 0.01	45.62 ± 0.01

Nota: Los valores son promedios de tres repeticiones ± desviación estándar.

4.1.2. Efecto del tipo de sustrato carbonado sobre la actividad celulolítica y xilanolítica de *Geobacillus* sp.

En la Figura 3 se observa que los diferentes sustratos carbonados indujeron una mínima actividad endoglucanasa (<100 UI/L) en *Geobacillus* sp. 10AC y *Geobacillus* sp. 29AC. Sin embargo, destaca que el bagazo de caña de azúcar y la coronta de maíz promovieron una actividad endoglucanasa ligeramente mayor que los sustratos industriales (papel filtro, xilano y carboximetilcelulosa) para ambas cepas bacterianas. En la Figura 4 se observa que la actividad xilanasas fue significativamente influenciada por el tipo de sustrato carbonado. Se infiere que los residuos lignocelulósicos al ser empleados como fuente de carbono indujeron la producción de enzimas xilanasas en las cepas de *Geobacillus* sp. La coronta de maíz fue más efectiva para inducir la actividad xilanasas en *Geobacillus* sp. 10AC pues generó la mayor actividad xilanasas (766.66 ± 18.89 UI/L), seguida del bagazo de caña de azúcar (546.36 ± 16.94 UI/L). Mientras que el bagazo indujo mayor actividad xilanasas en *Geobacillus* sp. 29AC (427.25 ± 7.10 UI/L), seguida de la coronta (349.82 ± 10.02 UI/L). En ambos casos, los sustratos carbonados naturales indujeron mayor actividad enzimática que los sustratos industriales, esto motivó a utilizar el bagazo y la coronta en las pruebas posteriores.

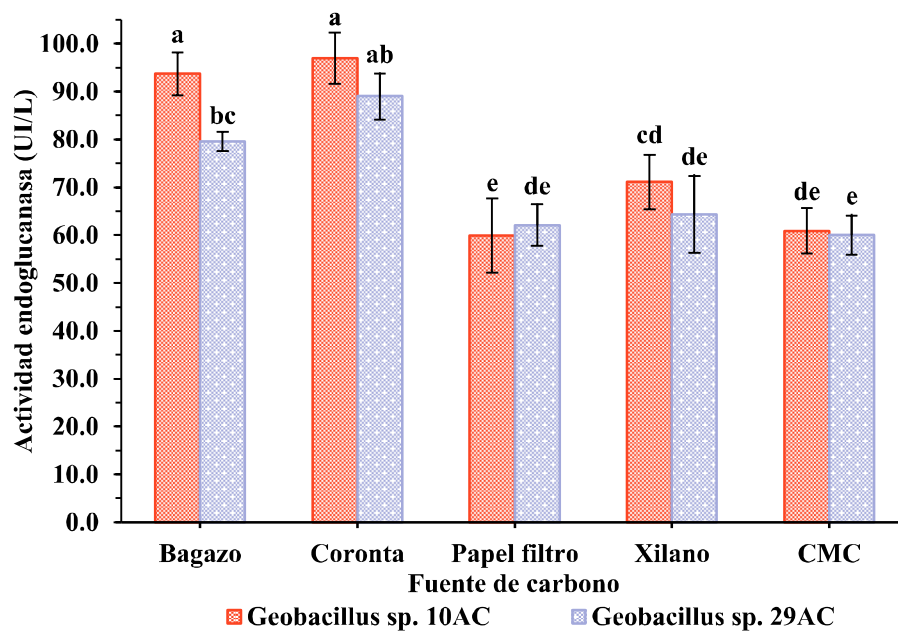


Figura 3. Efecto del tipo de sustrato carbonado sobre la actividad endoglucanasa

Nota: Los resultados son promedios de seis repeticiones \pm desviación estándar. Promedios con letra diferentes son significativamente diferentes (Prueba Tukey, $p < 0.05$)

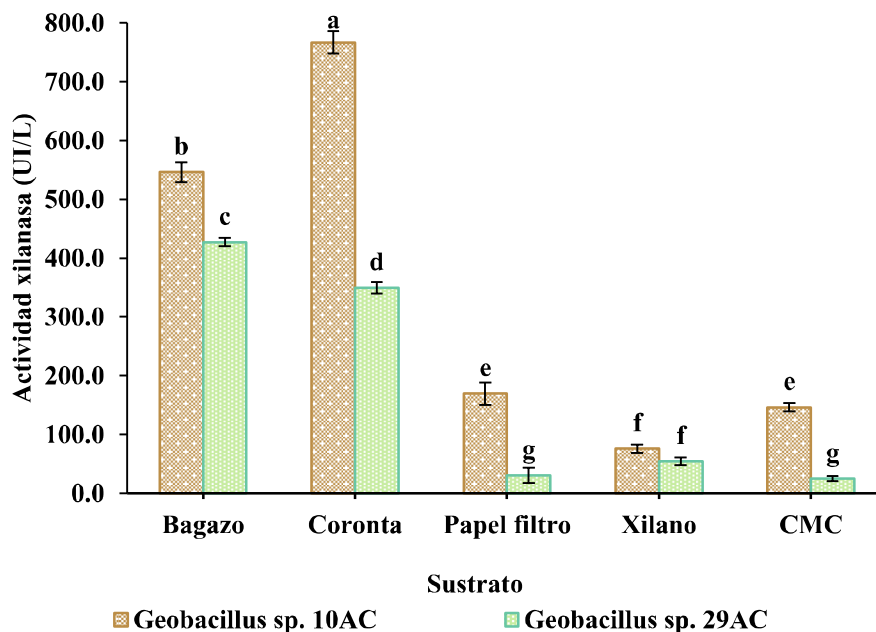


Figura 4. Efecto del tipo de sustrato carbonado sobre la actividad xilanólítica

Nota: Los resultados son promedios de seis repeticiones \pm desviación estándar. Promedios con letra diferentes son significativamente diferentes (Prueba Tukey, $p < 0.05$)

4.1.3. Efecto de la cantidad de inóculo y tipo de fuente nitrogenada sobre la actividad celulolítica y xilanolítica de *Geobacillus sp 10AC*

Para asegurar la máxima producción de enzimas, entre los diferentes factores que influyen, es necesario conocer la cantidad adecuada de inóculo, puesto que el recuento bacteriano inicial afectará en gran medida la tasa de consumo de nutrientes limitados en el medio de cultivo (Shanthi & Roymon, 2018). En la Figura 5 se observa que la actividad endoglucanasa fue mínimamente influenciada (<140 UI/L) por la cantidad de inóculo y la fuente nitrogenada. Sin embargo, se observa que cuando el inóculo fue del 5% v/v la actividad endoglucanasa fue ligeramente mayor comparada con otras concentraciones de inóculo; en concentraciones de inóculo menores al 4% no se evidenció la actividad.

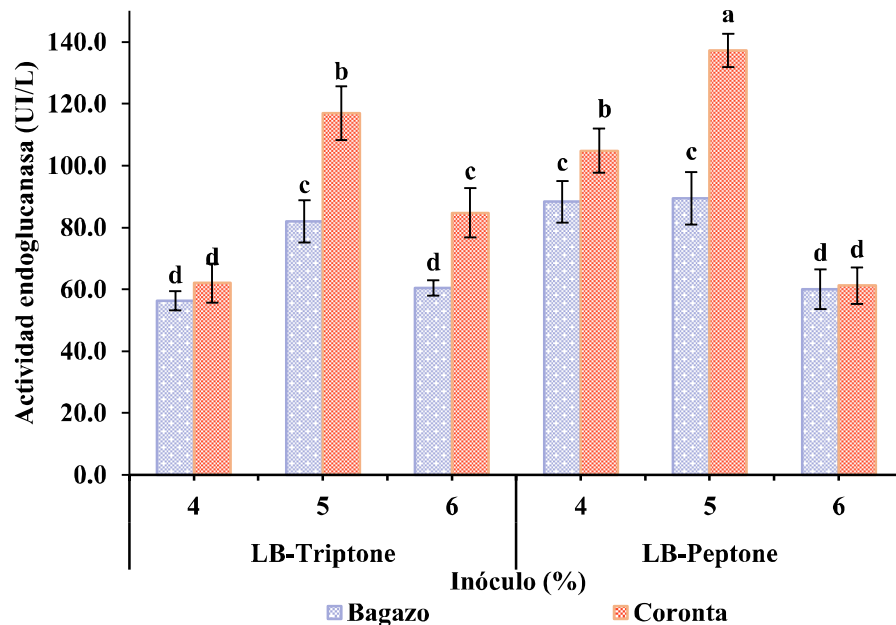


Figura 5. Efecto de la cantidad de inóculo sobre la actividad endoglucanasa de *Geobacillus sp. 10AC*

Nota: Los resultados son promedios de seis repeticiones \pm desviación estándar. Promedios con letra diferentes son significativamente diferentes (Prueba Tukey, $p < 0.05$)

En la Figura 6 se observa que la actividad xilanasa fue significativamente influenciada por la cantidad de inóculo y la fuente nitrogenada. La mayor actividad xilanasa (1399.65 ± 3.55 UI/L) fue inducida con una cantidad de inóculo del 5% (v/v), seguida de un inóculo del 4% (1305.07 ± 6.98 UI/L).

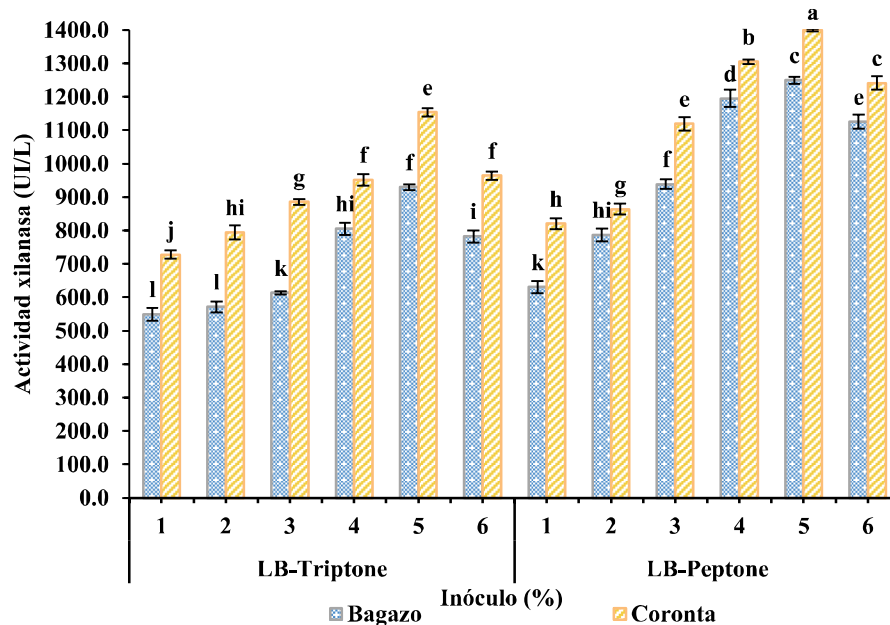


Figura 6. Efecto de la cantidad de inóculo sobre la actividad xilanolítica de *Geobacillus sp.* 10AC

Nota: Los resultados son promedios de seis repeticiones \pm desviación estándar. Promedios con letra diferentes son significativamente diferentes (Prueba Tukey, $p < 0.05$)

4.1.4. Efecto del tamaño de partícula del residuo lignocelulósico sobre la actividad celulolítica y xilanolítica de la cepa de *Geobacillus sp.* seleccionada

El tamaño de partícula influye en la accesibilidad al sustrato por parte de los microorganismos, un tamaño adecuado garantizará la adecuada transferencia de nutrientes y oxígeno, consecuentemente, el crecimiento microbiano, la producción de enzimas y el ataque de éstas a la biomasa hemicelulósica se verá mejorado (Ho, 2015). En ese sentido, en las Figura 7 y

Figura 8 se observa que los diferentes tamaños de partículas de coronta y bagazo indujeron actividades enzimáticas endoglucanasas y xilanasas distintas. La actividad endoglucanasa, aunque mínima, fue promovida en la misma medida por las partículas de coronta de maíz con tamaños entre 425-600 μm y las partículas de bagazo con tamaños entre 75-150 μm . Para tamaños de partícula mayores a 425 μm no se evidenció actividad endoglucanasa promovida por el bagazo; en el caso de la coronta, la actividad endoglucanasa promovida por un tamaño de partícula menor a 150 μm resultó ser igual al blanco de muestra y para tamaños mayores a 600 μm no se evidenció actividad (Figura 7).

La mayor actividad xilanasas (1439.43 ± 21.46 UI/L) fue promovida por la coronta de maíz con un tamaño de partícula entre 425 y 600 μm , seguida de un tamaño de partícula entre 300 y 425 μm . Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la actividad xilanasas promovida por partículas de coronta con tamaños entre 600-850 μm y 150-300 μm con partículas de bagazo con tamaños entre 75 y 150 μm . Esto significa, en términos de producción enzimática a nivel industrial, que para producir xilanasas empleando bagazo se requieren partículas más finas por tanto un mayor consumo energético en los procesos de reducción de tamaño como molienda. Por tanto, la coronta resultaría muy atractivo en términos de costos al requerir menor esfuerzo de reducción de tamaño y al promover mayor actividad enzimática xilanasas.

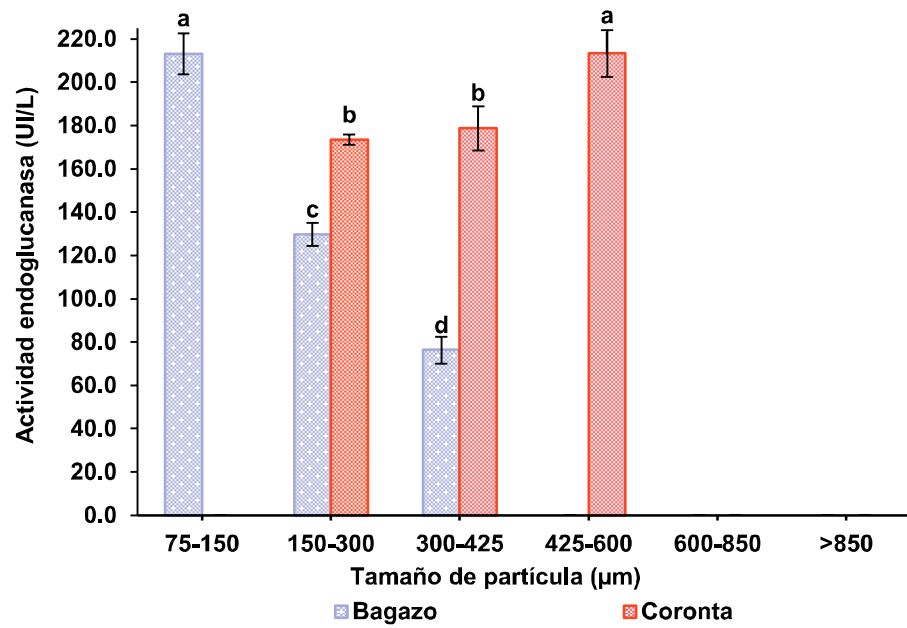


Figura 7. Efecto del tamaño de partícula sobre la actividad endoglucanasa de *Geobacillus* sp. 10AC

Nota: Los resultados son promedios de seis repeticiones \pm desviación estándar. Promedios con letra diferentes son significativamente diferentes (Prueba Tukey, $p < 0.05$)

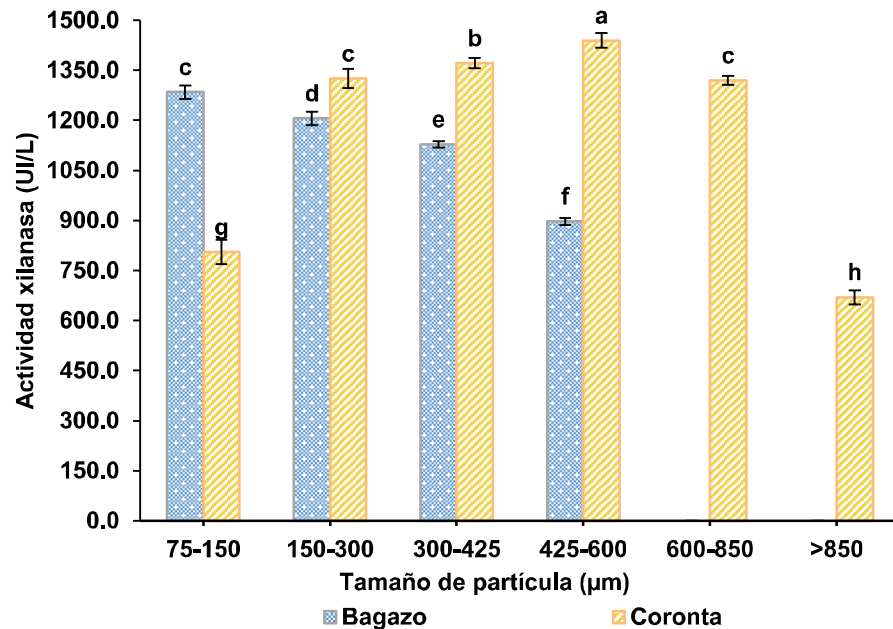


Figura 8. Efecto del tamaño de partícula sobre la actividad xilanólítica de *Geobacillus* sp. 10AC

Nota: Los resultados son promedios de seis repeticiones \pm desviación estándar. Promedios con letra diferentes son significativamente diferentes (Prueba Tukey, $p < 0.05$)

4.1.5. Efecto de la concentración del residuo lignocelulósico sobre la actividad celulolítica y xilanolítica de la cepa de *Geobacillus* sp. seleccionada

Generalmente, un incremento en la concentración del sustrato puede incrementar la velocidad de reacción de la enzima hasta mostrar un punto de saturación, a partir del cual, una mayor cantidad de sustrato significará una disminución de la actividad enzimática (Kereh & Mubarik, 2018). Por ello, resulta importante determinar la concentración adecuada de sustrato que promueve la mayor actividad enzimática. En la Figura 9 se observa que el incremento en la concentración de los sustratos lignocelulósicos de bagazo y coronta incrementa también la actividad endoglucanasa. La mayor actividad endoglucanasa fue promovida con una concentración de sustratos del 3 %, sin embargo, resulta ser mucho menor si se compara con la actividad xilanasa.

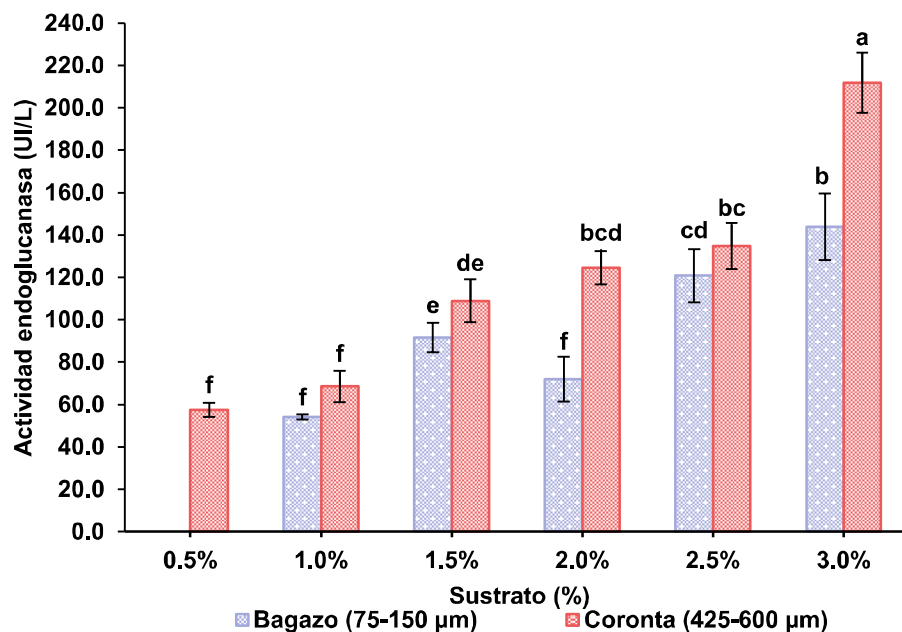


Figura 9. Efecto de la concentración del residuo lignocelulósico sobre la actividad endoglucanasa de *Geobacillus* sp. 10AC

Nota: Los resultados son promedios de seis repeticiones \pm desviación estándar. Promedios con letra diferentes son significativamente diferentes (Prueba Tukey, $p < 0.05$)

La Figura 10 describe el efecto de las diferentes concentraciones (0.5-3.0 %) de los residuos lignocelulósicos (coronta y maíz) sobre la actividad xilanasa producida por *Geobacillus* sp. 10AC. Los resultados indican que las concentraciones de bagazo del 3 % y 2.5 % y coronta al 2.5 % promovieron las mayores actividades enzimáticas xilanasas con valores de 1732.21 ± 16.05 UI/L, 1718.62 ± 19.29 UI/L y 1712.34 ± 21.62 UI/L, respectivamente; sin embargo, no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre ellas (Prueba Tukey, $\alpha=0.05$). Asimismo, no se observan diferencias significativas en la actividad xilanasa promovida por concentraciones de coronta del 1 % y 1.5 % con bagazo al 1.5 %. Por tanto, para obtener la mayor actividad enzimática xilanasa se podría emplear partículas de bagazo más finas (75-100 μm) o coronta de maíz con partículas un poco más grandes (425-600 μm), con concentraciones del 2.5 % en ambos casos.

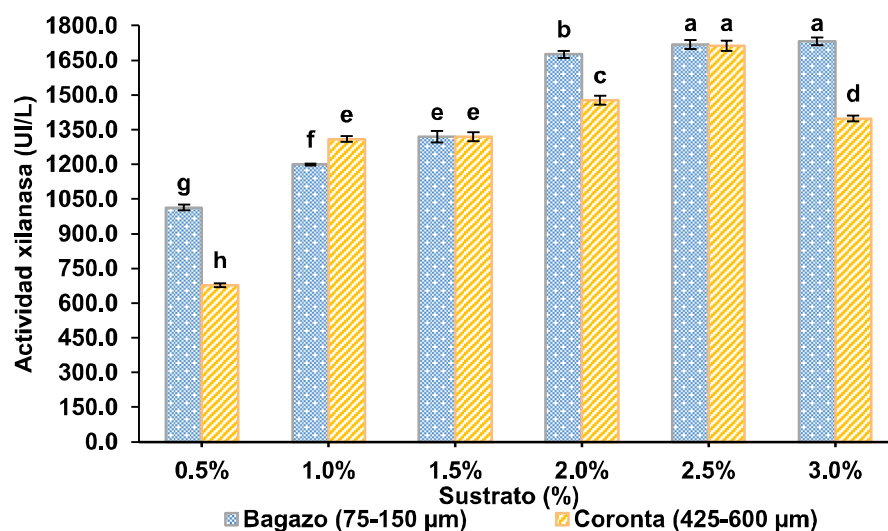


Figura 10. Efecto de la concentración del residuo lignocelulósico sobre la actividad xilanólica de *Geobacillus* sp. 10AC

Nota: Los resultados son promedios de seis repeticiones \pm desviación estándar. Promedios con letra diferentes son significativamente diferentes (Prueba Tukey, $p<0.05$)

4.1.6. Efecto del tiempo de incubación sobre la actividad celulolítica y xilanolítica de la cepa de *Geobacillus* sp. seleccionada

La Figura 11 muestra que la actividad endoglucanasa promovida por el bagazo y coronta estuvo influenciada por el tiempo de incubación. En las primeras 20 horas de cultivo no se evidenció actividad endoglucanasa, de 24 a 32 horas la actividad se incrementó conforme el tiempo de incubación también aumentó. Los extractos enzimáticos crudos de bagazo y coronta de 36 horas de cultivo ya contenían azúcares reductores, cuya cantidad fue similar a la generada por la hidrólisis enzimática del sustrato estándar (carboximetilcelulosa-CMC), esto no permitió evidenciar la actividad endoglucanasa.

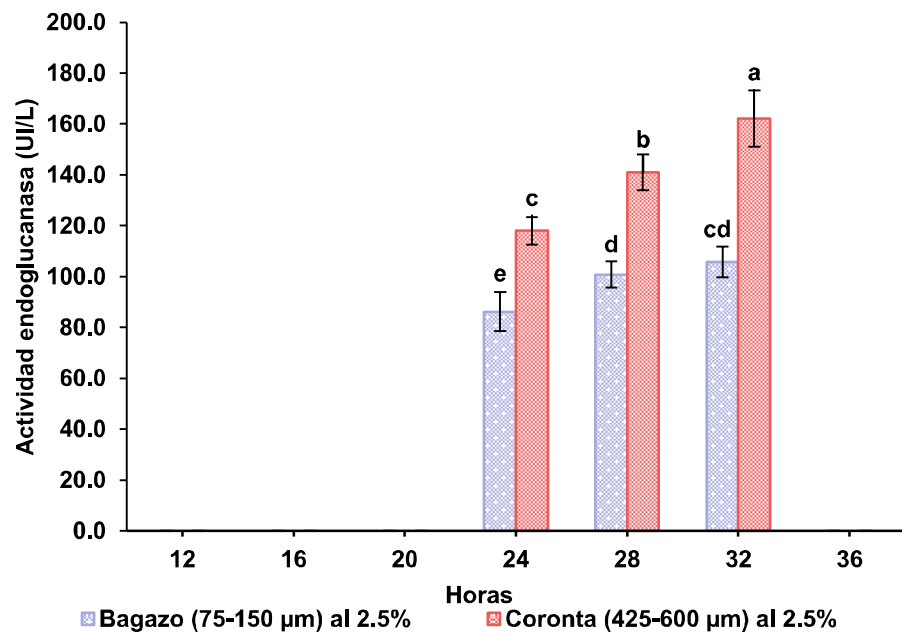


Figura 11. Efecto del tiempo de incubación sobre la actividad endoglucanasa de *Geobacillus* sp. 10AC

Nota: Los resultados son promedios de seis repeticiones \pm desviación estándar. Promedios con letra diferentes son significativamente diferentes (Prueba Tukey, $p < 0.05$)

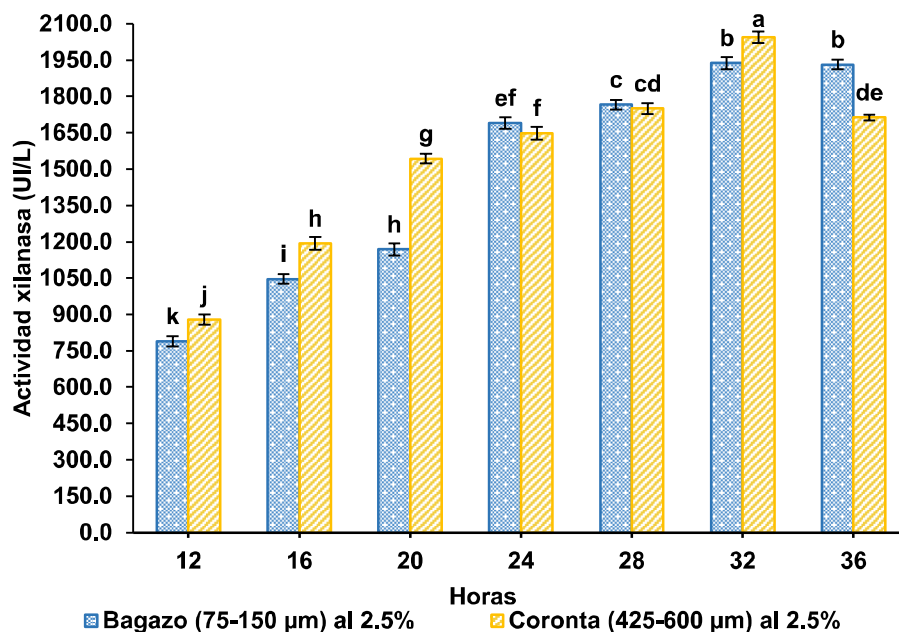


Figura 12. Efecto del tiempo de incubación sobre la actividad xilanólítica de *Geobacillus* sp. 10AC

Nota: Los resultados son promedios de seis repeticiones \pm desviación estándar. Promedios con letra diferentes son significativamente diferentes (Prueba Tukey, $p < 0.05$)

La Figura 12 muestra que la actividad xilanasa promovida por coronta aumenta hasta alcanzar un máximo a 32 horas para luego decaer; de manera similar sucede con la actividad promovida por el bagazo, sin embargo, esta se mantiene hasta 36 horas de incubación. En este sentido, el cultivo de *Geobacillus* sp. 10AC con coronta ($425 \leq \varnothing \leq 600 \mu\text{m}$; 2.5 % p/v) a 32 horas generó extractos enzimáticos con la mayor actividad xilanasa (2043.42 ± 23.49 UI/L). Dicha actividad, a 36 horas de incubación, disminuye en un 16.1 % llegando a valores de 1713.58 ± 12.29 UI/L.

4.1.7. Caracterización de la actividad enzimática celulolítica y xilanólítica de los extractos enzimáticos seleccionados

Las enzimas se caracterizan por presentar su máxima actividad cuando las condiciones son las más adecuadas, las desviaciones del óptimo ocasionan

una reducción de la actividad enzimática (Bisswanger, 2014). En ese sentido, se evaluó el efecto del pH y la temperatura sobre la actividad endoglucanasa y xilanasa de los extractos enzimáticos crudos de coronta y bagazo seleccionados.

a) Efecto del pH sobre la actividad celulolítica y xilanolítica del extracto enzimático crudo seleccionado

Se evaluó el efecto del pH sobre la actividad endoglucanasa y xilanasa de los extractos enzimáticos crudos de coronta y bagazo producidos por *Geobacillus* sp. 10AC. En la Figura 13 se observa que el extracto enzimático crudo de coronta de maíz presentó valores similares de actividad endoglucanasa a pH 6 y 6.5, no evidenciándose esta actividad para otros rangos de pH. En tanto que el bagazo de caña de azúcar mostró actividad endoglucanasa en el rango de pH de 6 y 7, siendo mayor a 6.5. En ambos casos, la actividad endoglucanasa (<160 UI/L) reportada fue mínima.

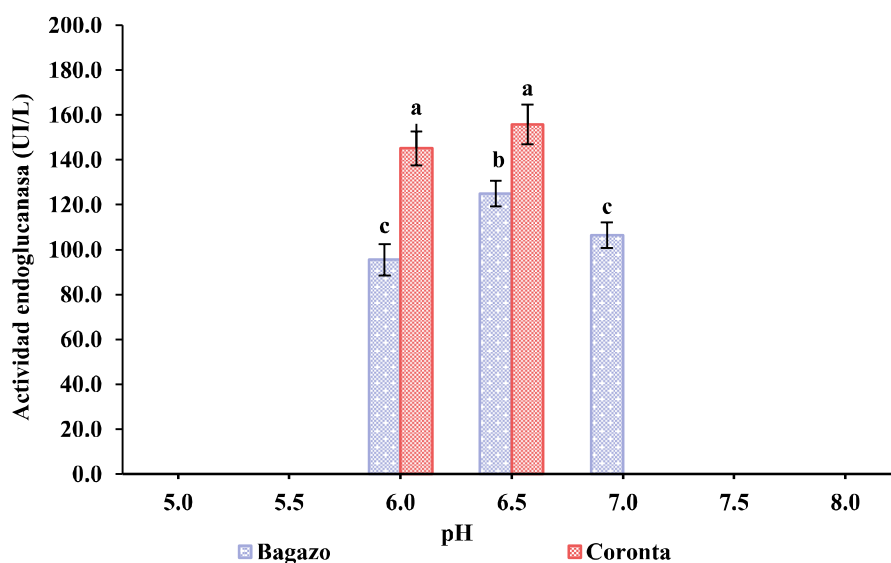


Figura 13. Efecto del pH sobre la actividad endoglucanasa

Nota: Los resultados son promedios de seis repeticiones \pm desviación estándar. Promedios con letra diferentes son significativamente diferentes (Prueba Tukey, $p < 0.05$)

En la Figura 14 se observa que el extracto enzimático de coronta produjo mayor actividad xilanasas que el bagazo en los diferentes perfiles de pH evaluados. En ambos casos, tanto la coronta como el bagazo mostraron aumentos de actividad xilanasas conforme el pH aumentaba hasta registrar la mayor actividad a un pH de 6.5, a partir del cual la actividad disminuyó conforme el pH seguía aumentando. En este sentido, el extracto enzimático proveniente del cultivo de *Geobacillus* sp. 10 AC en coronta de maíz (32 horas; $425 \leq \varnothing \leq 600 \mu\text{m}$; 2.5 % p/v) produjo la mayor actividad xilanasas (2347.11 \pm 21.40 UI/L) a un pH de 6.5. Mientras que el extracto enzimático procedente del cultivo en bagazo (32 horas; $75 \leq \varnothing \leq 150 \mu\text{m}$; 2.5 % p/v) también produjo mayor actividad enzimática (2078.48 \pm 31.13 UI/L) a pH 6.5, pero fue menor comparado con la coronta.

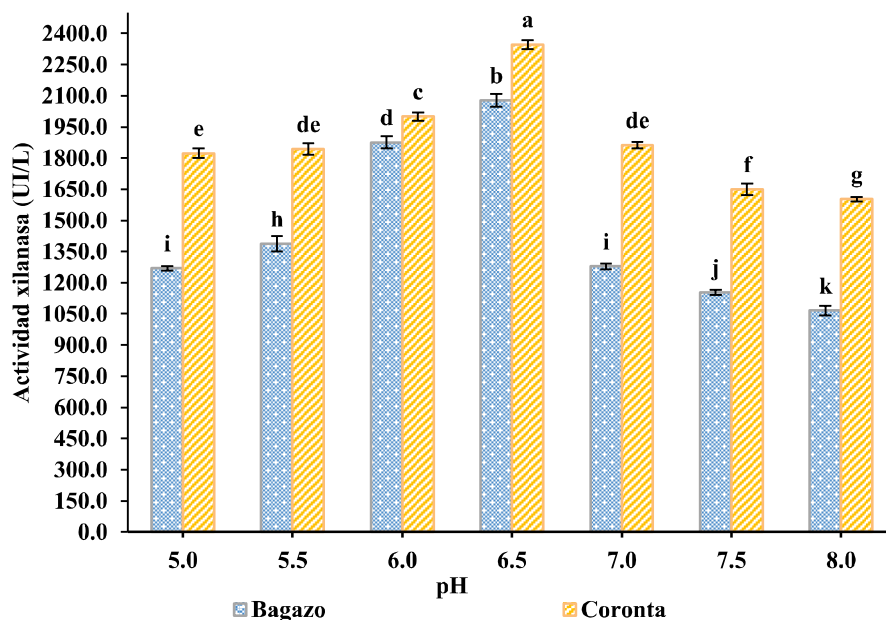


Figura 14. Efecto del pH sobre la actividad xilanólítica

Nota: Los resultados son promedios de seis repeticiones \pm desviación estándar. Promedios con letra diferentes son significativamente diferentes (Prueba Tukey, $p < 0.05$)

b) Efecto de la temperatura sobre la actividad celulolítica y xilanolítica de los extractos enzimáticos crudos seleccionados

Se evaluó el efecto de la temperatura sobre la actividad endoglucanasa y xilanasa de los extractos enzimáticos crudos de coronta y bagazo producidos por *Geobacillus* sp. 10AC. La Figura 15 muestra que la actividad endoglucanasa promovida por la coronta fue superior al del bagazo en todo el rango de temperaturas evaluadas (45-90 °C). Tanto para el extracto enzimático de la coronta como del bagazo la mayor actividad endoglucanasa se evidenció a 65 °C. Sin embargo, las actividades registradas son mucho menores comparadas con la actividad xilanasa.

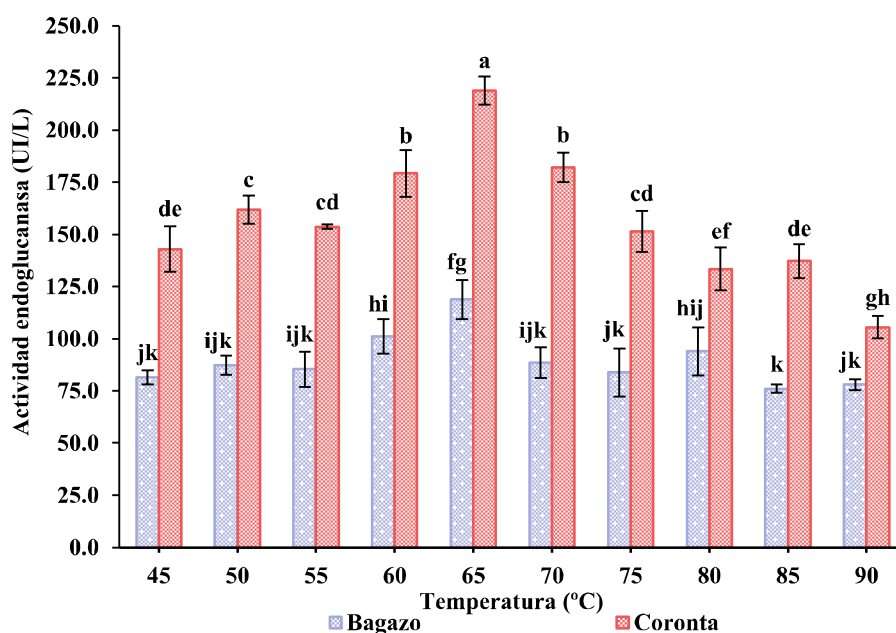


Figura 15. Efecto de la temperatura sobre la actividad endoglucanasa

Nota: Los resultados son promedios de seis repeticiones \pm desviación estándar. Promedios con letra diferentes son significativamente diferentes (Prueba Tukey, $p < 0.05$)

En la Figura 16 se observa que los extractos enzimáticos de coronta de maíz produjeron mayor actividad xilanasa que el bagazo casi en todos los diferentes perfiles de temperatura evaluados. En ambos casos, tanto la coronta

como el bagazo mostraron aumentos de actividad xilanasa conforme la temperatura aumentaba hasta registrar la mayor actividad a una temperatura de 65 °C, a partir del cual la actividad decae conforme la temperatura sigue aumentando. En este sentido, el extracto enzimático proveniente del cultivo de *Geobacillus* sp. 10AC en coronta de maíz (32 horas; $425 \leq \emptyset \leq 600 \mu\text{m}$; 2.5 % p/v) produjo la mayor actividad xilanasa ($2422.72 \pm 14.38 \text{ UI/L}$) a una temperatura de 65 °C y pH de 6.5, seguida de una temperatura de 70 °C ($2229.73 \pm 13.99 \text{ UI/L}$) y mismo pH.

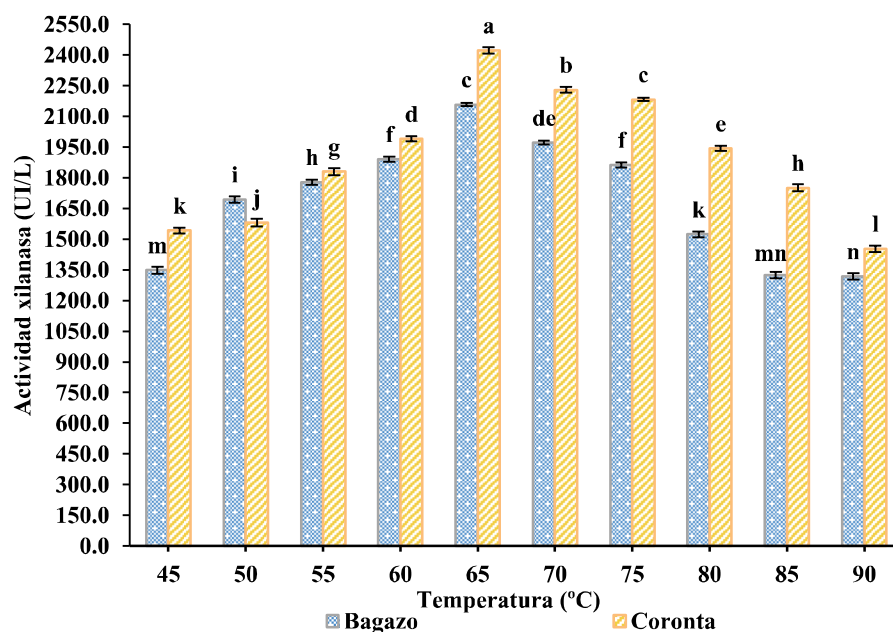


Figura 16. Efecto de la temperatura sobre la actividad xilanolítica

Nota: Los resultados son promedios de seis repeticiones \pm desviación estándar. Promedios con letra diferentes son significativamente diferentes (Prueba Tukey, $p < 0.05$)

El extracto enzimático procedente del cultivo en bagazo (32 horas; $75 \leq \emptyset \leq 150 \mu\text{m}$; 2.5% p/v) también produjo la mayor actividad xilanasa ($2158.15 \pm 9.12 \text{ UI/L}$) a 65 °C y pH 6.5, pero fue menor comparado con la coronta y no presentó diferencias significativas con la actividad xilanasa de la coronta a 75 °C. Asimismo, se observa que las actividades xilanolíticas de los

extractos de coronta a temperaturas mayor igual a 65 °C son mucho mayores comparados con los del bagazo. Esto podría significar que el cultivo de *Geobacillus* sp. 10AC en coronta de maíz produce xilanasas más resistentes a la degradación por incrementos de temperatura.

c) Efecto de sustancias químicas sobre la actividad celulolítica y xilanolítica de los extractos enzimáticos crudos seleccionados

Se evaluó la influencia de los iones metálicos divalentes (Ca^{2+} , Mg^{2+} y Mn^{2+}) y Tritón 100X sobre la actividad endoglucanasa y xilanasas del extracto enzimático crudo producido por *Geobacillus* sp. 10AC luego de su cultivo en bagazo de caña de azúcar y coronta de maíz (Figura 17 y Figura 18). Las actividades del extracto enzimático crudo obtenidas sin la adición de los iones metálicos (Tabla 3) fueron usadas como referencia para calcular el porcentaje de diferencia en la actividad obtenida con la presencia de sustancias químicas, los cuales fueron agregados a concentraciones de 1 y 10 mM.

Tabla 3. Actividades endoglucanasa y xilanasas de los extractos enzimáticos crudos producidos por *Geobacillus* sp. 10AC usadas para evaluar la influencia de sustancias químicas

Actividad enzimática (UI/L)	Endoglucanasa	Xilanasas
Extracto de bagazo	88.7 ± 2.4	911.7 ± 7.9
Extracto de coronta	197.9 ± 6.7	1526.0 ± 6.5

Nota: Los resultados son promedios de seis repeticiones ± desviación estándar

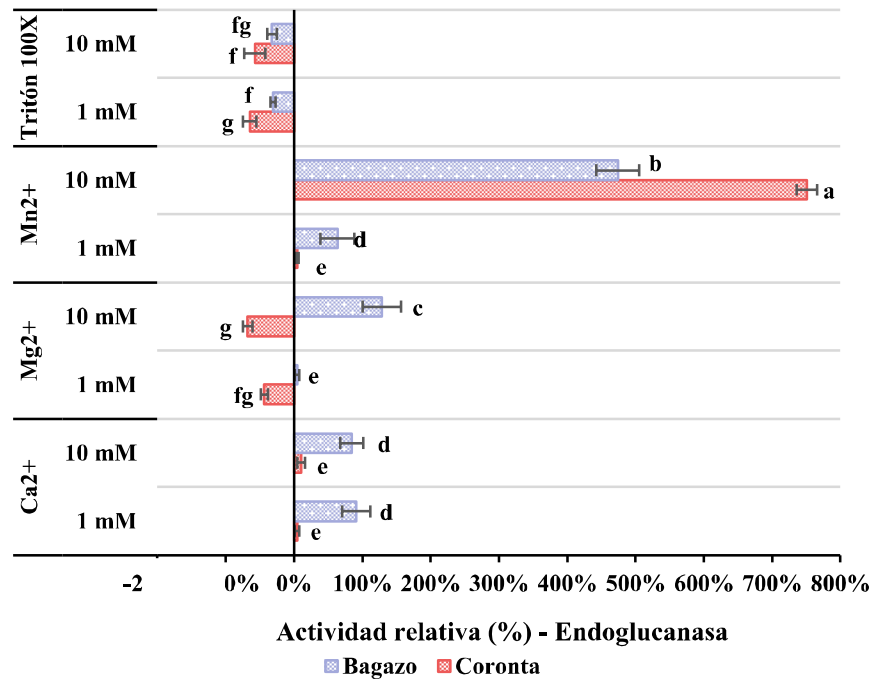


Figura 17. Actividad relativa endoglucanasa del extracto enzimático crudo de bagazo y coronta luego de adición de sustancias químicas

Nota: Los resultados son promedios de seis repeticiones ± desviación estándar. Promedios con letra diferentes son significativamente diferentes (Prueba Tukey, $p < 0.05$)

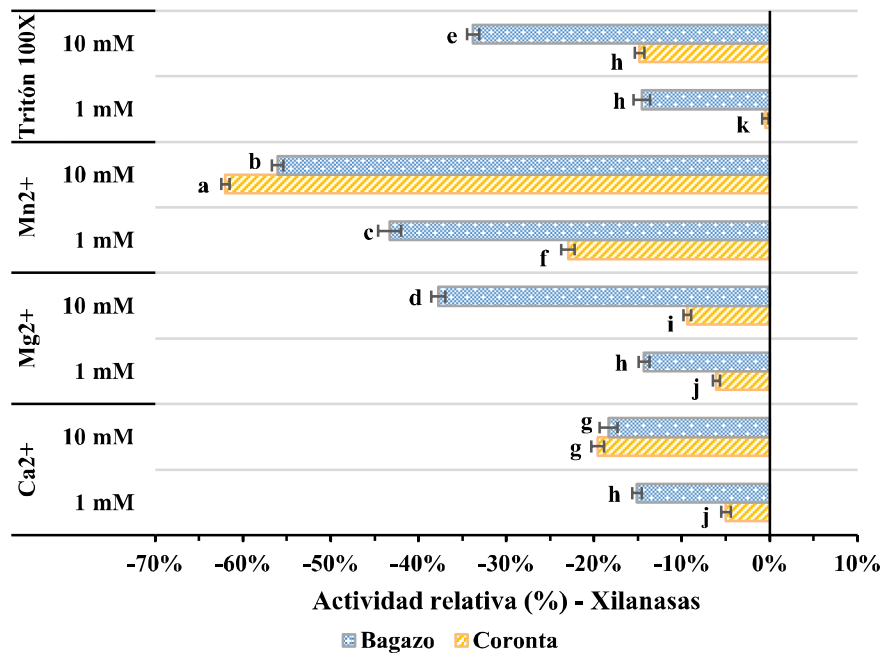


Figura 18. Actividad relativa xilanasa del extracto enzimático crudo de bagazo y coronta luego de la adición de sustancias químicas

Nota: Los resultados son promedios de seis repeticiones ± desviación estándar. Promedios con letra diferentes son significativamente diferentes (Prueba Tukey, $p < 0.05$)

Como la actividad endoglucanasa promovida por el Mn^{2+} presentó resultados prometedores se evaluó el efecto de varias concentraciones de este metal (Figura 19). Se encontró que este catión metálico mejoró considerablemente la actividad endoglucanasa tanto del extracto enzimático crudo de bagazo de caña de azúcar como del extracto de coronta de maíz. La mayor actividad endoglucanasa la presentó el extracto de coronta (750.92% \pm 15.3%) cuando la concentración de $MnSO_4$ fue de 10 mM, mientras que el extracto de bagazo alcanzó un 532.33% \pm 29.87% cuando la concentración de $MnSO_4$ fue 15 mM.

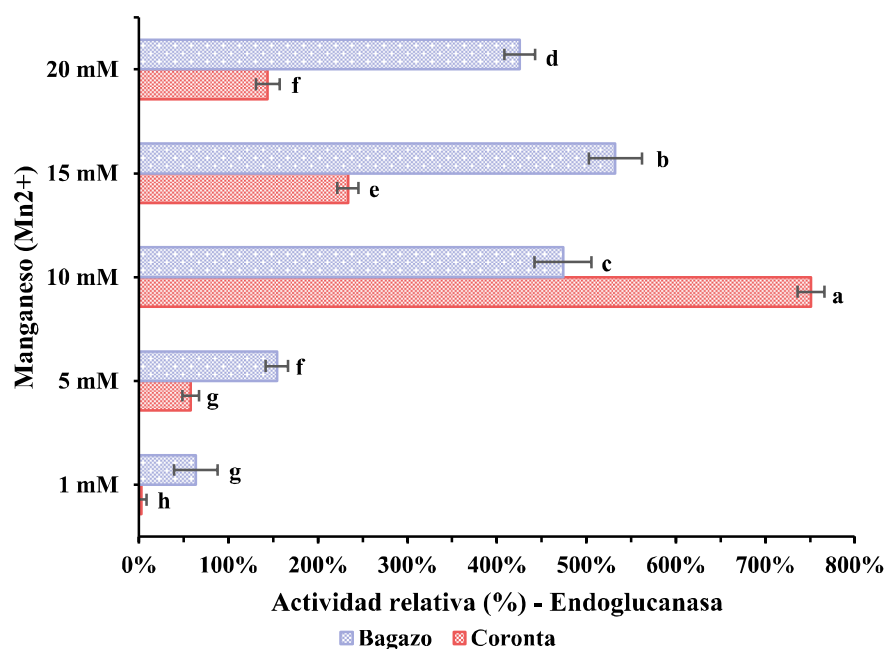


Figura 19. Actividad relativa endoglucanasa luego de la adición de manganeso

Nota: Los resultados son promedios de seis repeticiones \pm desviación estándar. Promedios con letra diferentes son significativamente diferentes (Prueba Tukey, $p < 0.05$)

4.2. Pruebas de hipótesis

4.2.1. Comparación múltiple de medias mediante la prueba Tukey del efecto del tipo de sustrato carbonado sobre la actividad endoglucanasa y xilanasa

Hipótesis nula: Todas las fuentes carbonadas promueven igual actividad endoglucanasa

Hipótesis alterna: No todas las fuentes carbonadas promueven igual actividad endoglucanasa

Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$

Tabla 4. Análisis de varianza para el efecto de la fuente carbonada sobre la actividad endoglucanasa

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Grupo	9	11882	1320.19	45.39	0.000
Error	50	1454	29.09		
Total	59	13336			

Tabla 5. Información agrupada utilizando el método de Tukey y una confianza de 95% para el efecto de la fuente carbonada sobre la actividad endoglucanasa

Grupo	N	Media	Agrupación
Coronta – <i>Geobacillus</i> sp. 10AC	6	96.92	a
Bagazo – <i>Geobacillus</i> sp. 10AC	6	93.75	a
Coronta – <i>Geobacillus</i> sp. 29AC	6	89.00	a b
Bagazo – <i>Geobacillus</i> sp. 29AC	6	79.584	b c
Xilano – <i>Geobacillus</i> sp. 10AC	6	71.08	c d
Xilano – <i>Geobacillus</i> sp. 29AC	6	64.33	d e
Papel filtro – <i>Geobacillus</i> sp. 29AC	6	62.08	d e
CMC – <i>Geobacillus</i> sp. 10AC	6	60.92	d e
CMC – <i>Geobacillus</i> sp. 29AC	6	60.00	e
Papel filtro – <i>Geobacillus</i> sp. 10AC	6	59.92	e

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Tabla 6. Resumen del modelo del efecto de la fuente carbonada sobre la actividad endoglucanasa

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
5.39305	89.10%	87.13%	84.30%

Hipótesis nula: Todas las fuentes carbonadas promueven igual actividad xilanasa

Hipótesis alterna: No todas las fuentes carbonadas promueven igual actividad xilanasa

Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$

Tabla 7. Análisis de varianza para el efecto de la fuente carbonada sobre la actividad xilanasa

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Grupo	9	3478605	386512	2605.34	0.000
Error	50	7418	148		
Total	59	3486022			

Tabla 8. Información agrupada utilizando el método de Tukey y una confianza de 95% para el efecto de la fuente carbonada sobre la actividad xilanasa

Grupo	N	Media	Agrupación
Coronta – <i>Geobacillus</i> sp. 10AC	6	766.66	a
Bagazo – <i>Geobacillus</i> sp. 10AC	6	546.36	b
Bagazo – <i>Geobacillus</i> sp. 29AC	6	427.25	c
CMC – <i>Geobacillus</i> sp. 29AC	6	349.82	d
Papel filtro – <i>Geobacillus</i> sp. 10AC	6	169.70	e
CMC – <i>Geobacillus</i> sp. 10AC	6	146.49	e
Xilano – <i>Geobacillus</i> sp. 10AC	6	76.09	f
Xilano – <i>Geobacillus</i> sp. 29AC	6	54.42	f
Papel filtro – <i>Geobacillus</i> sp. 29AC	6	30.48	g
CMC – <i>Geobacillus</i> sp. 29AC	6	25.01	g

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Tabla 9. Resumen del modelo del efecto de la fuente carbonada sobre la actividad xilanasa

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
12.1801	99.79%	99.75%	99.69%

4.2.2. Comparación múltiple de medias mediante la prueba Tukey del efecto de la cantidad de inóculo y el tipo de fuente nitrogenada sobre la actividad endoglucanasa y xilanasa

Hipótesis nula: Todos los tamaños de inóculo y fuentes nitrogenadas promueven igual actividad endoglucanasa

Hipótesis alterna: No todos los tamaños y fuentes nitrogenadas promueven igual actividad endoglucanasa

Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$

Tabla 10. Análisis de varianza para el efecto de la cantidad de inóculo y el tipo de fuente nitrogenada sobre la actividad endoglucanasa

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Grupo	11	43897	3990.61	92.34	0.000
Error	60	2593	43.22		
Total	71	46490			

Tabla 11. Resumen del modelo del efecto de la cantidad de inóculo y el tipo de fuente nitrogenada sobre la actividad endoglucanasa

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
6.57389	94.42%	93.40%	91.97%

Tabla 12. Información agrupada utilizando el método de Tukey y una confianza de 95% para el efecto de la cantidad de inóculo y el tipo de fuente nitrogenada sobre la actividad endoglucanasa

Grupo	N	Media	Agrupación
Coronta - Triptona - 5%	6	137.25	a
Coronta - Triptona - 5%	6	117.00	b
Coronta - Peptona - 4%	6	104.83	b
Bagazo - Peptona - 5%	6	89.33	c
Bagazo - Peptona - 4%	6	88.33	c
Coronta - Triptona - 6%	6	84.75	c
Bagazo - Triptona - 5%	6	82.00	c
Coronta - Triptona - 4%	6	62.00	d
Coronta - Peptona - 6%	6	61.17	d
Bagazo - Triptona - 6%	6	60.42	d
Bagazo - Peptona - 6%	6	60.00	d
Bagazo - Triptona - 4%	6	56.25	d

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Hipótesis nula: Todos los tamaños de inóculo y fuentes nitrogenadas promueven igual actividad xilanasas

Hipótesis alterna: No todos los tamaños y fuentes nitrogenadas promueven igual actividad xilanasas

Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$

Tabla 13. Análisis de varianza para el efecto de la cantidad de inóculo y el tipo de fuente nitrogenada sobre la actividad xilanasas

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Grupo	23	8130634	353506	1352.07	0.000
Error	119	31375	261		
Total	142	8162009			

Tabla 14. Resumen del modelo del efecto de la cantidad de inóculo y el tipo de fuente nitrogenada sobre la actividad xilanasas

S	R-cuad.	R-cuad.(ajustado)	R-cuad.(pred)
16.1696	99.62%	99.54%	99.45%

Tabla 15. Información agrupada utilizando el método de Tukey y una confianza de 95% para el efecto de la cantidad de inóculo y el tipo de fuente nitrogenada sobre la actividad xilanasa

Grupo	N	Media	Agrupación
Coronta - Peptona - 5%	6	1399.65	a
Coronta - Peptona - 4%	6	1305.07	b
Bagazo - Peptona - 5%	6	1249.89	c
Coronta - Peptona - 6%	6	1241.55	c
Bagazo - Peptona - 4%	6	1195.3	d
Coronta- Triptona - 5%	6	1153.72	e
Bagazo - Peptona - 6%	6	1125.71	e
Coronta - Peptona - 3%	6	1119.65	e
Coronta - Triptona - 6%	6	964.20	f
Coronta - Triptona - 4%	6	951.87	f
Bagazo - Peptona - 3%	6	939.09	f
Bagazo - Triptona - 5%	6	929.79	f
Coronta - Triptona - 3%	6	885.60	g
Coronta - Peptona - 2%	6	863.90	g
Coronta - Peptona - 1%	6	820.54	h
Bagazo - Triptona - 4%	6	805.41	h i
Coronta -Triptona - 2%	6	794.19	h i
Bagazo - Peptona - 2%	6	786.88	h i
Bagazo - Triptona - 6%	6	782.41	i
Coronta - Triptona 1%	6	727.98	j
Bagazo - Peptona - 1%	6	630.85	k
Bagazo - Triptona - 3%	6	613.32	k
Bagazo - Triptona - 2%	6	571.78	l
Bagazo - Triptona - 1%	6	549.35	l

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes

4.2.3. Comparación múltiple de medias mediante la prueba Tukey del efecto del tamaño de partícula del residuo lignocelulósico sobre la actividad endoglucanasa y xilanasa

Hipótesis nula: Todos los tamaños de partícula promueven igual actividad endoglucanasa.

Hipótesis alterna: No todos los tamaños de partícula promueven igual actividad endoglucanasa.

Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$.

Tabla 16. Análisis de varianza para el efecto del tamaño de partícula sobre la actividad endoglucanasa

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Grupo	5	83957	16791.4	262.47	0.000
Error	30	1919	64.0		
Total	35	85876			

Tabla 17. Resumen del modelo del efecto del tamaño de partícula sobre la actividad endoglucanasa

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
7.99835	97.77%	97.39%	96.78%

Tabla 18. Información agrupada utilizando el método de Tukey y una confianza de 95% para el efecto del tamaño de partícula sobre la actividad endoglucanasa

Grupo	N	Media	Agrupación
Coronta 425-600 μm	6	213.25	a
Bagazo 75-150 μm	6	213.08	a
Coronta 300-425 μm	6	178.67	b
Coronta 150-300 μm	6	173.500	b
Bagazo 150-300 μm	6	129.83	c
Bagazo 300-425 μm	6	76.33	d

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Hipótesis nula: Todos los tamaños de partícula promueven igual actividad xilanasa.

Hipótesis alterna: No todos los tamaños de partícula promueven igual actividad xilanasa.

Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$.

Tabla 19. Análisis de varianza para el efecto del tamaño de partícula sobre la actividad xilanasa

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Grupo	9	3759919	417769	923.83	0.000
Error	50	22611	452		
Total	59	3782530			

Tabla 20. Resumen del modelo del efecto del tamaño de partícula sobre la actividad xilanasa

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
21.2645	99.40%	99.30%	99.14%

Tabla 21. Información agrupada utilizando el método de Tukey y una confianza de 95% para el efecto del tamaño de partícula sobre la actividad xilanasa

Grupo	N	Media	Agrupación
Coronta 425-600 μm	6	1439.43	a
Coronta 300-425 μm	6	1371.13	b
Coronta 150-300 μm	6	1325.3	c
Coronta 600-825 μm	6	1319.81	c
Bagazo 75-150 μm	6	1284.95	c
Bagazo 150-300 μm	6	1205.76	d
Bagazo 300-425 μm	6	1128.61	e
Bagazo 425-600 μm	6	895.24	f
Coronta 75-150 μm	6	805.8	g
Coronta >850 μm	6	669.84	h

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

4.2.4. Comparación múltiple de medias mediante la prueba Tukey del efecto de la concentración del residuo lignocelulósico sobre la actividad endoglucanasa y xilanasa

Hipótesis nula: Todas las concentraciones del residuo lignocelulósico promueven igual actividad endoglucanasa.

Hipótesis alterna: No todas las concentraciones del residuo lignocelulósico promueven igual actividad endoglucanasa.

Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$.

Tabla 22. Análisis de varianza para el efecto de la concentración del residuo lignocelulósico sobre la actividad endoglucanasa

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Grupo	10	130794	13079.4	129.29	0.000
Error	55	5564	101.2		
Total	65	136358			

Tabla 23. Resumen del modelo del efecto de la concentración del residuo lignocelulósico sobre la actividad endoglucanasa

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
10.0579	95.92%	95.18%	94.12%

Tabla 24. Información agrupada utilizando el método de Tukey y una confianza de 95% para el efecto de la concentración del residuo lignocelulósico sobre la actividad endoglucanasa

Grupo	N	Media	Agrupación
Coronta 3.0%	6	211.83	a
Bagazo 3.0%	6	143.83	b
Coronta 2.5%	6	134.92	b c
Coronta 2.0%	6	124.50	b c d
Bagazo 2.5%	6	120.75	c d
Coronta 1.5%	6	108.92	d e
Bagazo 1.5%	6	91.58	e
Bagazo 2.0%	6	71.92	f
Coronta 1.0%	6	68.58	f
Coronta 0.5%	6	57.50	f
Bagazo 1.0%	6	54.167	f

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Hipótesis nula: Todas las concentraciones del residuo lignocelulósico promueven igual actividad xilanasa.

Hipótesis alterna: No todas las concentraciones del residuo lignocelulósico promueven igual actividad xilanasa.

Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$.

Tabla 25. Análisis de varianza para el efecto de la concentración del residuo lignocelulósico sobre la actividad xilanasa

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Grupo	11	6714836	610440	2198.83	0.000
Error	60	16657	278		
Total	71	6731493			

Tabla 26. Resumen del modelo del efecto de la concentración del residuo lignocelulósico sobre la actividad xilanasa

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
16.6619	99.75%	99.71%	99.64%

Tabla 27. Información agrupada utilizando el método de Tukey y una confianza de 95% para el efecto de la concentración del residuo lignocelulósico sobre la actividad xilanasa

Grupo	N	Media	Agrupación
Bagazo 3.0%	6	1732.21	a
Bagazo 2.5%	6	1718.62	a
Coronta 2.5%	6	1712.34	a
Bagazo 2.0%	6	1676.41	b
Coronta 2.0%	6	1477.46	c
Coronta 3.0%	6	1398.27	d
Coronta 1.5%	6	1320.22	e
Bagazo 1.5%	6	1317.00	e
Coronta 1.0%	6	1309.10	e
Bagazo 1.0%	6	1200.15	f
Bagazo 0.5%	6	1013.36	g
Coronta 0.5%	6	677.90	h

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

4.2.5. Comparación múltiple de medias mediante la prueba Tukey del efecto del tiempo de incubación sobre la actividad endoglucanasa y xilanasa

Hipótesis nula: Todos los tiempos de incubación promueven igual actividad endoglucanasa.

Hipótesis alterna: No todos los tiempos de incubación promueven igual actividad endoglucanasa.

Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$.

Tabla 28. Análisis de varianza para el efecto del tiempo de incubación sobre la actividad endoglucanasa

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Grupo	5	23559	4711.78	87.35	0.000
Error	30	1618	53.94		
Total	35	25177			

Tabla 29. Resumen del modelo del efecto del tiempo de incubación sobre la actividad endoglucanasa

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
7.34469	93.57%	92.50%	90.74%

Tabla 30. Información agrupada utilizando el método de Tukey y una confianza de 95% para el efecto del tiempo de incubación sobre la actividad endoglucanasa

Grupo	N	Media	Agrupación
Coronta - 32 horas	6	162.17	a
Coronta - 28 horas	6	141.00	b
Coronta - 24 horas	6	118.00	c
Bagazo - 32 horas	6	105.75	c d
Bagazo - 28 horas	6	100.83	d
Bagazo - 24 horas	6	86.25	e

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Hipótesis nula: Todos los tiempos de incubación promueven igual actividad xilanasa.

Hipótesis alterna: No todos los tiempos de incubación promueven igual actividad xilanasa.

Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$.

Tabla 31. Análisis de varianza para el efecto del tiempo de incubación sobre la actividad xilanasa

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Grupo	13	13266982	1020537	2064.28	0.000
Error	70	34607	494		
Total	83	13301588			

Tabla 32. Resumen del modelo del efecto del tiempo de incubación sobre la actividad xilanasa

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
22.2346	99.74%	99.69%	99.63%

Tabla 33. Información agrupada utilizando el método de Tukey y una confianza de 95% para el efecto del tiempo de incubación sobre la actividad xilanasa

Grupo	N	Media	Agrupación
Coronta - 32 horas	6	2043.42	a
Bagazo - 32 horas	6	1937.90	b
Bagazo - 36 horas	6	1931.44	b
Bagazo - 28 horas	6	1766.04	c
Coronta - 28 horas	6	1749.64	c d
Coronta - 36 horas	6	1713.58	d e
Bagazo - 24 horas	6	1690.22	e f
Coronta - 24 horas	6	1648.80	f
Coronta - 20 horas	6	1543.21	g
Coronta - 16 horas	6	1193.20	h
Bagazo - 20 horas	6	1168.70	h
Bagazo - 16 horas	6	1046.94	i
Coronta - 12 horas	6	878.92	j
Bagazo - 12 horas	6	789.47	k

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

4.2.6. Comparación múltiple de medias mediante la prueba Tukey del efecto del pH sobre la actividad endoglucanasa y xilanasa

Hipótesis nula: Todos los pH promueven igual actividad endoglucanasa.

Hipótesis alterna: No todos los pH promueven igual actividad endoglucanasa.

Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$.

Tabla 34. Análisis de varianza para el efecto del pH sobre la actividad endoglucanasa

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Grupo	4	15387	3846.66	77.22	0.000
Error	25	1245	49.82		
Total	29	16632			

Tabla 35. Resumen del modelo del efecto del pH sobre la actividad endoglucanasa

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
7.05809	92.51%	91.31%	89.22%

Tabla 36. Información agrupada utilizando el método de Tukey y una confianza de 95% para el efecto del pH sobre la actividad endoglucanasa

Grupo	N	Media	Agrupación
Coronta - pH 6.5	6	155.75	a
Coronta - pH 6.0	6	145.17	a
Bagazo - pH 6.5	6	125.00	b
Bagazo - pH 7.0	6	106.33	c
Bagazo - pH 6.0	6	95.58	c

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Hipótesis nula: Todos los pH promueven igual actividad xilanasa.

Hipótesis alterna: No todos los pH promueven igual actividad xilanasa.

Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$.

Tabla 37. Análisis de varianza para el efecto del pH sobre la actividad xilanasa

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Grupo	13	11377841	875219	1660.79	0.000
Error	70	36902	527		
Total	83	11414742			

Tabla 38. Resumen del modelo del efecto del pH sobre la actividad xilanasa

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
22.9601	99.68%	99.62%	99.53%

Tabla 39. Información agrupada utilizando el método de Tukey y una confianza de 95% para el efecto del pH sobre la actividad xilanasa

Grupo	N	Media	Agrupación
Coronta - pH 6.5	6	2347.11	a
Bagazo - pH 6.5	6	2078.50	b
Coronta - pH 6.0	6	1999.88	c
Bagazo - pH 6.0	6	1876.90	d
Coronta - pH 7.0	6	1863.07	d e
Coronta - pH 5.5	6	1843.50	d e
Coronta - pH 5.0	6	1823.45	e
Coronta - pH 7.5	6	1649.50	f
Coronta - pH 8.0	6	1602.70	g
Bagazo - pH 5.5	6	1387.60	h
Bagazo - pH 7.0	6	1278.13	i
Bagazo - pH 5.0	6	1269.42	i
Bagazo - pH 7.5	6	1153.65	j
Bagazo - pH 8.0	6	1065.92	k

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

4.2.7. Comparación múltiple de medias mediante la prueba Tukey del efecto de la temperatura sobre la actividad endoglucanasa y xilanasa

Hipótesis nula: Todas las temperaturas promueven igual actividad endoglucanasa.

Hipótesis alterna: No todas las temperaturas promueven igual actividad endoglucanasa.

Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$.

Tabla 40. Análisis de varianza para el efecto de la temperatura sobre la actividad endoglucanasa

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Grupo	19	197052	10371.2	162.66	0.000
Error	100	6376	63.8		
Total	119	203429			

Tabla 41. Resumen del modelo del efecto de la temperatura sobre la actividad endoglucanasa

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
7.98509	96.87%	96.27%	95.49%

Tabla 42. Información agrupada utilizando el método de Tukey y una confianza de 95% para el efecto de la temperatura sobre la actividad endoglucanasa

Grupo	N	Media	Agrupación
Coronta – 65 °C	6	218.92	a
Coronta – 70 °C	6	182.08	b
Coronta – 60 °C	6	179.17	b
Coronta - 50 °C	6	161.92	c
Coronta - 55 °C	6	153.667	c d
Coronta - 75 °C	6	151.50	c d
Coronta - 45 °C	6	142.92	d e
Coronta - 85 °C	6	137.25	d e
Coronta - 80 °C	6	133.42	e f
Bagazo - 65 °C	6	118.75	f g
Coronta - 90 °C	6	105.42	g h
Bagazo - 60 °C	6	101.17	h i
Bagazo - 80 °C	6	94.00	h i j
Bagazo - 70 °C	6	88.42	i j k
Bagazo - 50 °C	6	87.25	i j k
Bagazo - 55 °C	6	85.33	i j k
Bagazo - 75 °C	6	83.83	j k
Bagazo - 45 °C	6	81.58	j k
Bagazo - 90 °C	6	78.00	j k
Bagazo - 85 °C	6	76.000	k

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Hipótesis nula: Todas las temperaturas promueven igual actividad xilanasa.

Hipótesis alterna: No todas las temperaturas promueven igual actividad xilanasa.

Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$.

Tabla 43. Análisis de varianza para el efecto de la temperatura sobre la actividad xilanasa

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Grupo	19	11600133	610533	3054.13	0.000
Error	100	19990	200		
Total	119	116320123			

Tabla 44. Resumen del modelo del efecto de la temperatura sobre la actividad xilanasa

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
14.1387	99.83%	99.80%	99.75%

Tabla 45. Información agrupada utilizando el método de Tukey y una confianza de 95% para el efecto de la temperatura sobre la actividad xilanasa

Grupo	N	Media	Agrupación
Coronta - 65 °C	6	2422.72	a
Coronta - 70 °C	6	2229.73	b
Coronta - 75 °C	6	2182.88	c
Bagazo - 65 °C	6	2158.15	c
Coronta - 60 °C	6	1990.13	d
Bagazo - 70 °C	6	1971.57	d e
Coronta - 80 °C	6	1943.39	e
Bagazo - 60 °C	6	1890.86	f
Bagazo - 75 °C	6	1862.69	f
Coronta - 55 °C	6	1830.07	g
Bagazo - 55 °C	6	1777.33	h
Coronta - 85 °C	6	1750.47	h
Bagazo - 50 °C	6	1693.36	i
Coronta - 50 °C	6	1580.83	j
Coronta - 45 °C	6	1542.63	k
Bagazo - 80 °C	6	1523.44	k
Coronta - 90 °C	6	1452.97	l
Bagazo - 45 °C	6	1348.26	m
Bagazo - 85 °C	6	1324.01	mn
Bagazo - 90 °C	6	1317.50	n

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

4.2.8. Comparación múltiple de medias mediante la prueba Tukey del efecto de sustancias químicas sobre la actividad endoglucanasa y xilanasa

Hipótesis nula: Todas las sustancias químicas (Ca^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} y Tritón 100X) promueven igual actividad endoglucanasa.

Hipótesis alterna: No todas las sustancias químicas (Ca^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} y Tritón 100X) promueven igual actividad endoglucanasa.

Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$.

Tabla 46. Análisis de varianza para el efecto de sustancias químicas sobre la actividad endoglucanasa

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Grupo	15	439.029	29.2686	1207.59	0.000
Error	80	1.939	0.0242		
Total	95	440.968			

Tabla 47. Resumen del modelo del efecto de sustancias químicas sobre la actividad endoglucanasa

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.155683	99.56%	99.48%	99.37%

Tabla 48. Información agrupada utilizando el método de Tukey y una confianza de 95% para el efecto de sustancias químicas sobre la actividad endoglucanasa

Grupo	N	Media	Agrupación
Coronta-Mn ⁺² -10 mM	6	7.5092	a
Bagazo-Mn ⁺² -10 mM	6	4.739	b
Bagazo-Mg ⁺² -10 mM	6	1.284	c
Bagazo-Ca ⁺² -1 mM	6	0.9107	d
Bagazo-Ca ⁺² -10 mM	6	0.8449	d
Bagazo-Mn ⁺² -1 mM	6	0.634	d
Coronta-Ca ⁺² -10 mM	6	0.1038	e
Coronta-Mn ⁺² -1 mM	6	0.0492	e
Bagazo-Mg ⁺² -1 mM	6	0.0451	e
Coronta-Ca ⁺² -1 mM	6	0.0438	e
Bagazo- Tritón 100X -1 mM	6	-0.3073	f
Bagazo- Tritón 100X -10 mM	6	-0.3252	f
Coronta-Mg ⁺² -1 mM	6	-0.4345	f g
Coronta- Tritón 100X -10 mM	6	-0.5734	f g
Coronta- Tritón 100X -1 mM	6	-0.6489	g
Coronta-Mg ⁺² -10 mM	6	-0.6789	g

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Hipótesis nula: Todas las sustancias químicas (Ca⁺², Mg⁺², Mn⁺² y Tritón 100X) promueven igual actividad xilanasa.

Hipótesis alterna: No todas las sustancias químicas (Ca⁺², Mg⁺², Mn⁺² y Tritón 100X) promueven igual actividad xilanasa.

Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$.

Tabla 49. Análisis de varianza para el efecto de sustancias químicas sobre la actividad xilanasa

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Grupo	15	3.07283	0.204855	3942.40	0.000
Error	80	0.00416	0.000052		
Total	95	3.07699			

Tabla 50. Resumen del modelo del efecto de sustancias químicas sobre la actividad xilanasa

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.0072085	99.86%	99.84%	99.81%

Tabla 51. Información agrupada utilizando el método de Tukey y una confianza de 95% para el efecto de sustancias químicas sobre la actividad xilanasa

Grupo	N	Media	Agrupación
Coronta-Tritón 100X-1 mM	6	-0.00582	a
Coronta-Ca ⁺² -1 mM	6	-0.04885	b
Coronta-Mg ⁺² -1 mM	6	-0.05485	b
Coronta-Mg ⁺² -10 mM	6	-0.10063	c
Coronta- Tritón 100X -10 mM	6	-0.15245	d
Bagazo-Mg ⁺² -1 mM	6	-0.15396	d
Bagazo-Ca ⁺² -1 mM	6	-0.16140	d
Bagazo- Tritón 100X -1 mM	6	-0.16359	d
Coronta-Ca ⁺² -10 mM	6	-0.19863	e
Bagazo-Ca ⁺² -10 mM	6	-0.20051	e
Coronta-Mn-1 mM	6	-0.22116	f
Bagazo- Tritón 100X -10 mM	6	-0.34112	g
Bagazo-Mg ⁺² -10 mM	6	-0.38677	h
Bagazo-Mn ⁺² -1 mM	6	-0.44960	i
Bagazo-Mn ⁺² -10 mM	6	-0.56831	j
Coronta-Mn ⁺² -10 mM	6	-0.63097	k

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

4.2.9. Comparación múltiple de medias mediante la prueba Tukey del efecto del manganeso sobre la actividad endoglucanasa y xilanasa

Hipótesis nula: Todas las concentraciones de manganeso promueven igual actividad endoglucanasa.

Hipótesis alterna: No todas las concentraciones de manganeso promueven igual actividad endoglucanasa.

Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$.

Tabla 52. Análisis de varianza para el efecto del manganeso sobre la actividad endoglucanasa

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Grupo	9	332.410	36.9344	1022.60	0.000
Error	50	1.806	0.0361		
Total	59	334.216	65		

Tabla 53. Resumen del modelo del efecto del manganeso sobre la actividad endoglucanasa

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.190048	99.46%	99.36%	99.22%

Tabla 54. Información agrupada utilizando el método de Tukey y una confianza de 95% para el efecto del manganeso sobre la actividad endoglucanasa

Grupo	N	Media	Agrupación
Coronta-Mn ⁺² -10 mM	6	7.5092	a
Bagazo-Mn ⁺² -15 mM	6	5.323	b
Bagazo-Mn ⁺² -10 mM	6	4.739	c
Bagazo-Mn ⁺² -20 mM	6	4.2537	d
Coronta-Mn ⁺² -15 mM	6	2.3336	e
Bagazo-Mn ⁺² -5 mM	6	1.5395	f
Coronta-Mn ⁺² -20 mM	6	1.4391	f
Bagazo-Mn ⁺² -1 mM	6	0.634	g
Coronta-Mn ⁺² -5 Mm	6	0.5759	g
Coronta-Mn ⁺² -1 mM	6	0.0242	h

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

4.3. Discusión

4.3.1. Efecto del tipo de sustrato carbonado sobre la actividad celulolítica y xilanolítica de *Geobacillus* sp.

La carboximetil celulosa (CMC) y el xilano son sustratos modelos usados para la producción industrial de enzimas como las celulasas y xilanasas, respectivamente. Sin embargo, para el presente estudio resultaron ser fuentes carbonadas poco favorables la producción de enzimas tanto en *Geobacillus* sp. 10AC como en *Geobacillus* sp. 29AC. Si a esto se le suma su

elevado costo, resultan ser sustratos menos atractivos para su uso industrial. Por tanto, los residuos lignocelulósicos como la coronta de maíz y el bagazo de caña de azúcar pueden ser usados como fuente de carbono en el cultivo de *Geobacillus* sp. y al mismo tiempo obtener enzimas como las xilanasas. Considerando que estos residuos son baratos, abundantes y renovables, representan una oportunidad para reducir los costos de producción de xilanasas para diferentes aplicaciones industriales. Finalmente, se seleccionó la cepa *Geobacillus* sp. 10AC para ensayos posteriores por ser la que produjo la mayor actividad enzimática.

La mayor actividad xilanasa promovida por la coronta de maíz comparada con la del bagazo de caña de azúcar se explicaría por la composición de estos residuos lignocelulósicos, pues luego de un pretratamiento alcalino térmico con NaOH al que fueron sometidos los contenidos de celulosa y hemicelulosa tienden a incrementarse mientras la lignina disminuye. Según Boonsombuti et al. (2013) y Sahare et al. (2012) la coronta de maíz presenta contenidos de celulosa, hemicelulosa y lignina entre 50.4 - 75.73%, 19.47 - 31.7% y 2.55 - 7.4% respectivamente. Para el caso del bagazo de caña de azúcar los contenidos de celulosa, hemicelulosa y lignina son del 59.2, 22.3 y 11.4% respectivamente Visser et al. (2015). Teniendo en cuenta ello, el bagazo presenta un mayor contenido de lignina que la coronta. El menor contenido de lignina en la coronta podría derivar en una mayor conversión de la hemicelulosa de la coronta. Según Lloyd et al. (2016) la lignina presenta una estructura susceptible a la unión no productiva de enzimas, reduciendo la actividad enzimática y una escasa conversión del sustrato. Por

tanto, el mayor contenido de lignina en el bagazo afectaría en la menor actividad enzimática de *Geobacillus* sp. 10 AC.

4.3.2. Efecto de la cantidad de inóculo y tipo de fuente nitrogenada sobre la actividad celulolítica y xilanolítica de *Geobacillus* sp 10AC

La peptona ha sido reportada como la mejor fuente de nitrógeno para la producción de enzimas como las xilanasas (Bharti et al., 2018). En concordancia con ello, los medios de cultivo que contenían coronta de maíz como fuente carbonada y peptona como fuente nitrogenada promovieron una mayor actividad xilanasas en *Geobacillus* sp. 10AC en comparación con los medios que tuvieron bagazo y triptona. Una cantidad de inóculo por encima del óptimo podría resultar en un menor rendimiento dado el rápido consumo de nutrientes en el medio de cultivo (L. Kumar et al., 2014), sumado a que probablemente el incremento de la viscosidad del medio acarrea problemas en la aireación y la distribución de nutrientes (Raj et al., 2013). Este hecho explicaría la reducción de la actividad enzimática en un 11.3 % cuando la cantidad de inóculo fue del 6 % (v/v).

4.3.3. Efecto del tamaño de partícula del residuo lignocelulósico sobre la actividad celulolítica y xilanolítica de la cepa de *Geobacillus* sp. seleccionada

Se observa que a un mayor tamaño de partícula tanto de coronta como de bagazo la actividad xilanasas disminuye. Suvarna et al. (2011) señala que un tamaño de partícula grande puede proporcionar una mejor aireación a los microbios, sin embargo, puede resultar en un acceso deficiente a los nutrientes, limitando el crecimiento microbiano y consecuentemente disminuye la

producción de enzimas. En el caso del bagazo se observa que a un menor tamaño de partícula la actividad enzimática xilanasa aumenta (Figura 8). Según Suvarna et al. (2011), las partículas más pequeñas proporcionan un área superficial mayor para la adhesión microbiana, haciendo que el entorno sea ventajoso para la transferencia de calor y el intercambio de oxígeno y dióxido de carbono entre el aire y la superficie sólida. Sin embargo, este hecho no se cumple para el caso de la coronta pues a tamaños menores a 425 μm la actividad xilanasa empieza a decaer. La explicación se encontraría en lo señalado por Xin & Geng (2010) que a un tamaño de partículas demasiado pequeño puede resultar en la aglomeración del sustrato, interfiriéndose la respiración microbiana, por tanto, un deficiente crecimiento celular.

4.3.4. Efecto de la concentración del residuo lignocelulósico sobre la actividad celulolítica y xilanolítica de la cepa de *Geobacillus* sp. seleccionada

Se observa que concentraciones de coronta y bagazo menores al 2.5 % generan una menor actividad xilanasa debido a una menor disponibilidad de nutrientes procedentes de dichos sustratos. Una concentración de coronta mayor a 2.5 % genera también una disminución de la actividad xilanasa. Este último podría explicarse por el aumento de la viscosidad del medio de cultivo que eventualmente habría afectado la circulación uniforme de nutrientes y oxígeno que, consecuentemente, provocan una disminución en la producción de enzimas (Karim et al., 2015).

4.3.5. Efecto del tiempo de incubación sobre la actividad celulolítica y xilanolítica de la cepa de *Geobacillus* sp. seleccionada

La disminución de la actividad enzimática podría ocurrir como consecuencia del agotamiento de nutrientes y la acumulación de sustancias tóxicas en el medio de cultivo, que altera el funcionamiento microbiano cuya respuesta es inhibir el proceso de secreción de enzimas extracelulares incluyendo las enzimas degradadoras de lignocelulosa (A. Kumar et al., 2016a; Martínez-Pacheco et al., 2020). Por otra parte, los cultivos con bagazo ($75 \leq \emptyset \leq 150 \mu\text{m}$; 2.5 % p/v) a 32 y 36 horas de incubación generaron extractos enzimáticos con actividades xilanasa que no mostraron diferencias significativas (Prueba Tukey, $\alpha=0.05$) con valores de 1937.91 ± 24.64 UI/L y 1931.44 ± 20.30 UI/L, respectivamente.

4.3.6. Caracterización de la actividad enzimática celulolítica y xilanolítica de los extractos enzimáticos seleccionados

a) Efecto del pH sobre la actividad celulolítica y xilanolítica del extracto enzimático crudo seleccionado

Toda enzima tiene un pH óptimo específico, es decir, un pH en el que produce un máxima actividad enzimática (Meryandini et al., 2006). Además, es uno de los factores que puede afectar la conformación tridimensional de la proteína, llegando incluso a desnaturalizarla e inactivarla, consecuentemente, la actividad enzimática se ve reducida (Chen et al., 2016). Se encontró que el pH más adecuado para la reacción enzimática es de 6.5.

b) Efecto de la temperatura sobre la actividad celulolítica y xilanolítica de los extractos enzimáticos crudos seleccionados

La temperatura influye en la velocidad de reacción de una enzima, una temperatura elevada conducirá a una mayor actividad, pero como proteína estará limitada a su desnaturalización térmica (Yun et al., 2015). La variación de la temperatura puede afectar la integridad de la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria de una enzima, afectándose también la actividad enzimática (Meryandini et al., 2006). Se encontró que la temperatura más adecuada para la reacción enzimática es de 65 °C.

c) Efecto de sustancias químicas sobre la actividad celulolítica y xilanolítica de los extractos enzimáticos crudos seleccionados

La adición de Ca^{2+} a concentraciones de 1 y 10 mM favoreció mayor medida a la actividad endoglucanasa del extracto de bagazo y en menor medida a la actividad del extracto de coronta. Resultó interesante que la adición de 10 mM de Mn^{2+} incrementó significativamente las actividades endoglucanasas de los extractos de bagazo y coronta hasta 4.7 y 7.5 veces, respectivamente, comparado con el control. Por otra parte, el Mg^{2+} mejoró la actividad endoglucanasa del extracto de bagazo (128.4%) cuando la concentración se incrementó a 10 mM; sin embargo, resultó adverso para el extracto de coronta al reducir su actividad en un 64%. Para el caso del Tritón 100X, este resultó ser adverso al reducir las actividades endoglucanasas en ~30% y ~60% de los extractos enzimáticos crudos de bagazo y coronta, respectivamente.

La actividad xilanasa fue inhibida por todas las sustancias químicas evaluadas (Figura 18). El incremento de la concentración de los iones metálicos (Ca^{2+} , Mg^{2+} y Mn^{2+}) y del Tritón 100X de 1 a 10 mM redujo aún más la actividad xilanasa. El Mn^{2+} a una concentración de 10 mM fue el que provocó

la mayor inhibición de la actividad xilanasa tanto para el extracto de bagazo como de la coronta, siendo del 56% y 62%, respectivamente. El Mg^{2+} y el tritón 100X resultaron adversos para la actividad endoglucanasa y xilanasa del extracto enzimático de coronta de maíz. La inhibición de la actividad xilanasa por iones metálicos también ha sido reportado para otras especies de *Geobacillus* sp. Por ejemplo, Wu, Liu, & Zhang (2006) reportan que la actividad xilanasa recombinante de *Geobacillus* sp. MT-1 fue inhibida por 10 mM de Mg^{2+} en un 27.7%, asimismo, 1 mM de Ca^{2+} inhibió en un 6.7% y 10 mM en un 56.7%, 1 mM de Mn^{2+} en un 68.8% y 10 mM en un 100%, mientras que con el Tritón 100X al 0.1% la actividad se mantuvo estable.

El incremento significativo de la actividad endoglucanasa debido a la presencia de Mn^{2+} podría explicarse porque este metal mejora la estabilidad conformacional y la actividad catalítica de la enzima (Vasconcellos et al., 2016). La diferente actividad endoglucanasa del extracto de bagazo y coronta bajo una misma concentración de Mn^{2+} podría sugerir que *Geobacillus* sp. 10AC produce diferentes enzimas según la fuente carbonada empleada en su cultivo. Otros estudios también reportan que la adición de Mn^{2+} mejora considerablemente la actividad endoglucanasa, por ejemplo, Ng et al. (2009) reportan que la actividad endoglucanasa del gen *CelA* de *Geobacillus* sp. 70PC53 expresada en *E. Coli* se incrementó en un 100% cuando se adicionó 2 mM de $MnSO_4$. Mientras que la adición de Ca^{2+} mejoró parcialmente la actividad endoglucanasa a 5 y 10 mM; por otra parte, la adición de Mg^{2+} no mostró efecto alguno. Por tanto, para mejorar la actividad de las

endoglucanasas sintetizadas por *Geobacillus* sp. 10AC resulta necesario la adición de Mn^{2+} en forma de sulfato.

En la Tabla 55 se presenta la comparación de la actividad xilanasas de *Geobacillus* sp. 10AC, reportada en el presente estudio, frente a otras especies de *Geobacillus*. Se observa que *Geobacillus* sp. 10AC presentó mayor actividad que *Geobacillus thermodenitrificans* A333 y *Bacillus subtilis* DCH4, sin embargo, fue mucho menor que la reportada para *Geobacillus* sp. WSUCF1 y *G. thermodenitrificans* X1, cuyos tiempos de cultivo fueron más prolongados y con sustratos lignocelulósicos diferentes a la coronta y al bagazo. Para mejorar la producción de xilanasas de *Geobacillus* sp. 10AC se sugiere optimizar las condiciones de cultivo mediante la metodología de respuesta de superficies (RSM). Seguidamente, para mejorar la actividad xilanasas se recomienda purificar los extractos enzimáticos crudos y posteriormente, identificar, aislar, clonar y expresar en *E. Coli* el gen xilanasas codificante de *Geobacillus* sp. 10AC.

Tabla 55. Comparación de la actividad xilanasa de *Geobacillus* sp. 10AC con otros microorganismos

Microorganismo	Origen	Fuente de carbono	Inoculo (%v/v)	Tamaño de partícula (µm)	Concentración de sustrato (%p/v)	Tiempo de incubación (h)	pH óptimo	Temperatura óptima (°C)	Actividad xilanasa (UI/ml)	Referencia
<i>Geobacillus</i> sp. 10AC	Fuente termal	Coronta de maíz	5	425-600	2.5	32	6.5	65	2.4	Presente estudio
<i>Geobacillus</i> sp. 10AC	Fuente termal	Bagazo de caña de azúcar	5	75-150	2.5	32	6.5	65	2.2	Presente estudio
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> A333	Fuente termal	Coronta de maíz	10	<3000	1.0	48-144	7	70	0.26	(Marcolongo et al., 2015)
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> TSAA1	Compost	Paja de trigo	1	-	1.0	48	7.5	75	~2.75	(Anand, Kumar, & Satyanarayana, 2013)
<i>Geobacillus</i> sp. WSUCF1	Compost	Rastrojo de maíz	1	-	5.0	96	6.5	70	20.9	(Bhalla et al., 2015)
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> X1	Fuente termal	Paja de trigo	1.5	250	1	87	8	50	24	(Verma, Bhalla, & Kumar, 2020)
<i>Bacillus subtilis</i> DCH4	Fuente termal	Bagazo de caña de azúcar	5	75-150	2.0	72	6	55	2	(Tamariz-Angeles et al., 2020)

CONCLUSIONES

- La cepa nativa de *Geobacillus* sp. 10AC presentó enzimas con un mayor potencial celulolítico y xilanolítico para degradar respectivamente la celulosa y el xilano presentes en los residuos lignocelulósicos agrícolas de coronta de maíz y bagazo de caña de azúcar. Mientras que el potencial celulolítico y xilanolítico de la cepa nativa *Geobacillus* sp. 29AC para degradar los mismos residuos lignocelulósicos fue mucho menor.
- El cultivo inicial de *Geobacillus* sp. 10AC y *Geobacillus* sp 29AC empleando sustratos lignocelulósicos como el bagazo de caña de azúcar o la coronta de maíz reveló que estos promovían una mayor actividad enzimática xilanasa y endoglucanasa comparada con los sustratos industriales como el papel filtro, el xilano o la carboximetilcelulosa. Dado que *Geobacillus* sp 10AC presentó la mayor actividad enzimática fue seleccionada para los ensayos posteriores.
- Las condiciones de cultivo de *Geobacillus* sp 10AC que permitieron obtener extractos enzimáticos crudos con la mayor actividad enzimática fueron: caldo Luria peptonado, pH 6, 55 °C, 180 rpm, tamaño de inóculo del 5% v/v, tamaño de partícula del residuo lignocelulósico de 425-600 μm (para coronta) y 75-150 μm (para bagazo), concentración del 2.5% p/v durante 32 horas de incubación. En todos los ensayos la coronta de maíz fue el sustrato lignocelulósico que promovió una mayor actividad xilanasa en *Geobacillus* sp. 10AC comparada con el bagazo; en tanto que la actividad endoglucanasa fue mínima.

- Las condiciones adecuadas para la hidrólisis enzimática fueron a pH 6.5 y 65 °C tanto para el extracto enzimático crudo de bagazo como para el de coronta. La adición de iones metálicos (Ca^{2+} , Mg^{2+} y Mn^{2+}) y tritón 100X inhibió considerablemente la actividad xilanasa, mientras que la actividad endoglucanasa del extracto de bagazo y coronta mejoró hasta 4.7 y 7.5 veces, respectivamente, cuando se adicionó 10 mM de Mn^{2+} .

RECOMENDACIONES

- La metodología de optimización de un paso a la vez empleada para averiguar las condiciones adecuadas que promueven la mayor actividad enzimática constituyó una primera aproximación a la región del óptimo verdadero. Por ello, se sugiere continuar con el análisis y modelado de las diversas variables independientes mediante la metodología de superficie de respuesta, a fin de optimizar la actividad enzimática, principalmente xilanasa.
- Realizar ensayos de amplificación de los genes que codifican la actividad xilanasa y endoglucanasa en *Geobacillus* sp. 10AC a fin de conocer las enzimas involucradas en la degradación de la lignocelulosa y sus respectivas características.
- Considerar la evaluación del efecto de la agitación sobre la síntesis de enzimas endoglucanasas y xilanasas en futuros cultivos bacterianos con residuos lignocelulósicos.
- Evaluar la termoestabilidad enzimática de la actividad endoglucanasa bajo la influencia del manganeso a fin de conocer la evolución hidrolítica a lo largo del tiempo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anand, A., Kumar, V., & Satyanarayana, T. (2013). Characteristics of thermostable endoxylanase and β -xylosidase of the extremely thermophilic bacterium *Geobacillus thermodenitrificans* TSAA1 and its applicability in generating xylooligosaccharides and xylose from agro-residues. *Extremophiles*, 17(3), 357–366. <https://doi.org/10.1007/s00792-013-0524-x>
- Ang, S. K., Shaza, E. M., Adibah, Y., Suraini, A. A., & Madihah, M. S. (2013). Production of cellulases and xylanase by *Aspergillus fumigatus* SK1 using untreated oil palm trunk through solid state fermentation. *Process Biochemistry*, 1, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.06.019>
- Anwar, Z., Gulfraz, M., & Irshad, M. (2014). Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy : A brief review. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 7(2), 163–173. <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2014.02.003>
- Arora, R., Behera, S., & Kumar, S. (2015). Bioprospecting thermophilic/thermotolerant microbes for production of lignocellulosic ethanol: A future perspective. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 51, 699–717. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.06.050>
- Ashour, A., Amer, M., Marzouk, A., Shimizu, K., Kondo, R., & El-Sharkawy, S. (2013). Corncobs as a potential source of functional chemicals. *Molecules*, 18(11), 13823–13830. <https://doi.org/10.3390/molecules181113823>
- Bhalla, A., Bansal, N., Kumar, S., Bischoff, K. M., & Sani, R. K. (2013). Improved lignocellulose conversion to biofuels with thermophilic bacteria and thermostable enzymes. *Bioresource Technology*, 128, 751–759.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.145>

Bhalla, A., Bischoff, K. M., & Sani, R. K. (2014). Highly thermostable GH39 β -xylosidase from a *Geobacillus* sp. strain WSUCF1. *BMC Biotechnology*, 7–11. <https://doi.org/10.1186/s12896-014-0106-8>

Bhalla, A., Bischoff, K. M., & Sani, R. K. (2015). Highly Thermostable Xylanase Production from A Thermophilic *Geobacillus* sp. Strain WSUCF1 Utilizing Lignocellulosic Biomass. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 3(June), 84. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00084>

Bhardwaj, N., Kumar, B., & Verma, P. (2019). A detailed overview of xylanases: an emerging biomolecule for current and future prospective. *Bioresources and Bioprocessing*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/s40643-019-0276-2>

Bharti, A. K., Kumar, A., Kumar, A., & Dutt, D. (2018). Exploitation of *Parthenium hysterophorus* biomass as low-cost substrate for cellulase and xylanase production under solid-state fermentation using *Talaromyces stipitatus* MTCC 12687. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 11(4), 271–280. <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2018.01.003>

Bhatia, L., Johri, S., & Ahmad, R. (2012). An economic and ecological perspective of ethanol production from renewable agro waste : a review. *AMB Express*, 2(1), 1. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-2-65>

Bibi, Z., Ansari, A., Zohra, R. R., Aman, A., Ali, S., & Qader, U. (2014). Production of xylan degrading endo-1, 4- β -xylanase from thermophilic *Geobacillus*. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 7(4), 478–485. <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2014.08.001>

Blumer-Schuette, S. E., Brown, S. D., Sander, K. B., Bayer, E. A., Kataeva, I.,

- Zurawski, J. V., ... Kelly, R. M. (2014). Thermophilic lignocellulose deconstruction. *FEMS Microbiology Reviews*, 38(3), 393–448. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12044>
- Blumer-Schuetz, S. E., Kataeva, I., Westpheling, J., Adams, M. W., & Kelly, R. M. (2008). Extremely thermophilic microorganisms for biomass conversion: status and prospects. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(3), 210–217. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.04.007>
- Boonsombuti, A., Luengnaruemitchai, A., & Wongkasemjit, S. (2013). Enhancement of enzymatic hydrolysis of corncob by microwave-assisted alkali pretreatment and its effect in morphology. *Cellulose*, 20(4), 1957–1966. <https://doi.org/10.1007/s10570-013-9958-7>
- Chacón, C. J. A. (2014). *Propuesta técnica para el incremento de procesamiento de caña de azúcar a 300 t/h del trapiche de un ingenio azucarero en el norte del Perú* (Pontificia Universidad Católica del Perú). Retrieved from <http://tesis.pucp.edu.pe/repositorio/handle/20.500.12404/7975>
- Chadha, B. S., Kaur, B., Basotra, N., Tsang, A., & Pandey, A. (2019). Thermostable xylanases from thermophilic fungi and bacteria: Current perspective. *Bioresource Technology*, 277(January), 195–203. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.044>
- Chen, Q., Li, M., & Wang, X. (2016). Enzymology properties of two different xylanases and their impacts on growth performance and intestinal micro flora of weaned piglets. *Animal Nutrition*, 2(1), 18–23. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2016.02.003>
- Ding, S. Y., Xu, Q., Crowley, M., Zeng, Y., Nimlos, M., Lamed, R., ... Himmel,

- M. E. (2008). A biophysical perspective on the cellulosome: new opportunities for biomass conversion. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(3), 218–227. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.04.008>
- Ho, H. L. (2015). Xylanase Production by *Bacillus subtilis* Using Carbon Source of Inexpensive Agricultural Wastes in Two Different Approaches of Submerged Fermentation (SmF) and Solid State Fermentation (SsF). *Journal of Food Processing & Technology*, 06(04). <https://doi.org/10.4172/2157-7110.1000437>
- Instituto Nacional de Estadística e Informática. (2019). *Perú: Anuario de Estadísticas Ambientales 2019*. Retrieved from https://www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/publicaciones_digitales/Est/Lib1704/libro.pdf
- Irfan, M., Gulsher, M., Abbas, S., Syed, Q., & Nadeem, M. (2011). Effect of various pretreatment conditions on enzymatic saccharification. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 33(4), 397–404. Retrieved from <http://rdo.psu.ac.th/sjstweb/journal/33-4/0125-3395-33-4-397-404.pdf>
- Kapoor, M., Panwar, D., & Kaira, G. S. (2016). Bioprocesses for Enzyme Production Using Agro-Industrial Wastes: Technical Challenges and Commercialization Potential. In *Agro-Industrial Wastes as Feedstock for Enzyme Production: Apply and Exploit the Emerging and Valuable Use Options of Waste Biomass*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802392-1.00003-4>
- Karim, A., Nawaz, M. A., Aman, A., & Ul Qader, S. A. (2015). Hyper production of cellulose degrading endo (1,4) β -D-glucanase from *Bacillus licheniformis*

- KIBGE-IB2 . *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 8(2), 160–165. <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2014.06.004>
- Kereh, H., & Mubarik, N. (2018). Optimization of Process Parameters and Scale-up of Xylanase Production Using Corn Cob Raw Biomass by Marine Bacteria *Bacillus subtilis* LBF M8 in Stirred Tank Bioreactor. *Pakistan Journal of Biotechnology*, 15(October), 707–714.
- King, B. C., Donnelly, M. K., Bergstrom, G. C., Walker, L. P., & Gibson, D. M. (2009). An optimized microplate assay system for quantitative evaluation of plant cell wall-degrading enzyme activity of fungal culture extracts. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(4), 1033–1044. <https://doi.org/10.1002/bit.22151>
- Knob, A., Fortkamp, D., Prolo, T., Izidoro, S. C., & Almeida, J. M. (2014). Agro-residues as Alternative for Xylanase Production by Filamentous Fungi. *Agro-Residues as Alternative for Xylanase Production by Filamentous Fungi*, 9(3), 5738–5773. <https://doi.org/10.15376/biores.9.3>
- Kumar, A., Dutt, D., & Gautam, A. (2016). Production of crude enzyme from *Aspergillus nidulans* AKB-25 using black gram residue as the substrate and its industrial applications. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2016.06.004>
- Kumar, A., Gautam, A., & Dutt, D. (2016). Biotechnological Transformation of Lignocellulosic Biomass in to Industrial Products: An Overview. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 7(3), 149–168. <https://doi.org/10.4236/abb.2016.73014>
- Kumar, L., Kumar, D., Nagar, S., Gupta, R., Garg, N., Kuhad, R. C., & Gupta, V.

- K. (2014). Modulation of xylanase production from alkaliphilic *Bacillus pumilus* VLK-1 through process optimization and temperature shift operation. *3 Biotech*, *4*(4), 345–356. <https://doi.org/10.1007/s13205-013-0160-2>
- Kumar, V., Dhall, P., Kumar, R., & Kumar, A. (2014). Bioconversion of lignocellulosic biomass for bioethanol production. In *Biofuels Production* (pp. 85–118). <https://doi.org/10.1002/9781118835913.ch4>
- Lloyd, J. A., Murton, K. D., Newman, R. H., Suckling, L. D., & Vaidya, A. A. (2016). Careful selection of steaming and attrition conditions during thermo-mechanical pretreatment can increase enzymatic conversion of softwood. *Journal of Chemical Technology Biotechnology - Research Article - Society of Chemical Industry*, (January), 1–7. <https://doi.org/10.1002/jctb.4975>
- Marcolongo, L., La Cara, F., Morana, A., Di Salle, A., del Monaco, G., Paixão, S. M., ... Ionata, E. (2015). Properties of an alkali-thermo stable xylanase from *Geobacillus thermodenitrificans* A333 and applicability in xylooligosaccharides generation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *31*(4), 633–648. <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1818-1>
- Martínez-Pacheco, M. M., Flores-García, A., Zamudio-Jaramillo, M. A., Chávez-Parga, M. C., & Alvarez-Navarrete, M. (2020). Optimization of production of xylanases with low cellulases in *Fusarium solani* by means of a solid state fermentation using statistical experimental design. *Revista Argentina de Microbiología*, (xx). <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.12.003>
- Meryandini, A., Hendarwin, T., Saprudin, D., & Lestari, Y. (2006). Characterization of Xylanase *Streptomyces* spp. SKK1-8. *Hayati Journal of Biosciences*, *13*(4), 151–155. <https://doi.org/10.4308/hjb.13.4.151>

- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Ministerio de Agricultura, M. (2009). *Propuesta Plan Nacional de Agroenergía 2009 - 2020*. Retrieved from <http://minagri.gob.pe/portal/download/pdf/novedades/propuesta-plan-nacional-agroenergia-plan.pdf>
- Ministerio de Agricultura y Riego, M. (2014). *La industria azucarera 2006-2013* (MINAGRI, Ed.). Retrieved from <http://siea.minagri.gob.pe/siea/?q=publicaciones/la-industria-azucarera>
- Ministerio de Agricultura y Riego, M. (2020). Sistema Integrado de Estadística Agraria. Retrieved September 30, 2020, from Anuario Estadístico de Producción Agraria website: <http://siea.minagri.gob.pe/siea/?q=publicaciones/anuario-de-produccion-agricola>
- Ministerio del Ambiente. (2021). *Decreto Supremo N° 023-2021-MINAM, Decreto Supremo que aprueba la Política Nacional del Ambiente al 2030* (pp. 43–63). pp. 43–63. Lima-Perú: Diario Oficial El Peruano.
- Ng, I. S., Li, C. W., Yeh, Y. F., Hen, P. T., Chir, J. L., Ma, C. H., ... Tong, C. G. (2009). A novel endo-glucanase from the thermophilic bacterium *Geobacillus* sp. 70PC53 with high activity and stability over a broad range of temperatures. *Extremophiles*, 13(3), 425–435. <https://doi.org/10.1007/s00792-009-0228-4>
- Odeniyi, O. A. ., Onilude, A. A. ., & Ayodele, M. A. (2012). Characteristics of A ??-1,4-D endoglucanase from *trichoderma virens* wholly applied in a palm-

- fruit husk-based diet for poultry layers. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(4), 1467–1475. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000400031>
- Parachin, N. S., Siqueira, S., de Faria, F. P., Torres, F. A. G., & de Moraes, L. M. P. (2009). Xylanases from *Cryptococcus flavus* isolate I-11: Enzymatic profile, isolation and heterologous expression of CfXYN1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 59(1–3), 52–57. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2008.12.018>
- Patel, S., & Shukla, S. (2017). Fermentation of Food Wastes for Generation of Nutraceuticals and Supplements. In *Fermented Foods in Health and Disease Prevention*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802309-9.00030-3>
- Pratap, D., & Kumar, R. (2014). Biofuel from wastes an economic and environmentally feasible resource. *Energy Procedia*, 54, 634–641. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2014.07.305>
- Quintero, D., Velasco, Z., Hurtado, G. E., Neira, J. L., & Contreras, L. M. (2007). Isolation and characterization of a thermostable β -xylosidase in the thermophilic bacterium *Geobacillus pallidus*. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1774(4), 510–518. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2007.02.002>
- Quiroz-Castañeda, R. E., & Folch-Mallol, J. L. (2013). Hydrolysis of biomass mediated by cellulases for the production of sugars. *Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization*, 118–155. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/53719>
- 155
- Raj, A., Kumar, S., & Singh, S. K. (2013). A highly thermostable xylanase from

- Stenotrophomonas maltophilia: Purification and partial characterization. *Enzyme Research*, 2013, 1–8. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1155/2013/429305>
- Real Academia Española, D. (2017). Diccionario de la lengua española - Edición del Tricentenario. Retrieved February 1, 2017, from Diccionario versión en línea website: <http://dle.rae.es/?id=4mJusJO>
- Sahare, P., Singh, R., Laxman, R. S., & Rao, M. (2012). Effect of Alkali Pretreatment on the Structural Properties and Enzymatic Hydrolysis of Corn Cob. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 168(7), 1806–1819. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9898-y>
- Sánchez, C. (2009). Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*, 27(2), 185–194. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.11.001>
- Santos, C. R., Paiva, J. H., Sforça, M. L., Neves, J. L., Navarro, R. Z., Cota, J., ... Murakami, M. T. (2012). Dissecting structure-function-stability relationships of a thermostable GH5-CBM3 cellulase from *Bacillus subtilis* 168. *Biochemical Journal*, 441(1), 95–104. <https://doi.org/10.1042/BJ20110869>
- Shanthi, V., & Roymon, M. G. (2018). *Isolation , Identification and Partial Optimization of Novel Xylanolytic Bacterial Isolates from Bhilai-Durg Region , Chhattisgarh , India*. 16(3).
- Singh, R., Shukla, A., Tiwari, S., & Srivastava, M. (2014). A review on delignification of lignocellulosic biomass for enhancement of ethanol production potential. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 32, 713–728. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.01.051>

- Singhania, R. R. ., Sukumaran, R. K., Patel, K. A. ., Larroche, C., & Pandey, A. (2010). Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme and Microbial Technology*, 46(7), 541–549. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.03.010>
- Suvarna, L. G., Lakshmi, B. P., & Prakasham, R. S. (2011). Sustainable Bioprocess Evaluation for Xylanase Production by Isolated *Aspergillus terreus* and *Aspergillus fumigatus* Under Solid - State Fermentation Using Oil Palm Empty Fruit Bunch Fiber. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 5(4), 1434–1444. Retrieved from http://abap.co.in/sites/default/files/Paper-7_6.pdf
- Tamariz-Angeles, C., Lázaro-Palomino, J., Olivera-Gonzáles, P., Castañeda-Barreto, A., & Villena, G. K. (2020). Isolation of thermotolerant *Bacillus subtilis* DCH4 from Chancos hot spring (Carhuaz, Peru) with potential to degrade lignocellulosic agriculture wastes. *Revista Peruana de Biología*, 27(1), 67–78. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v27i1.17582>
- Tamariz-Angeles, C., Olivera-Gonzales, P., Villena, G. K., & Gutiérrez-Correa, M. (2014). Isolation and identification of cellulolytic and xylanolytic bacteria from Huancarhuaz hot spring. *Annual Research & Review in Biology*, 4(19), 2920–2930.
- Vasconcellos, V. M., Tardioli, P. W., Giordano, R. L. C., & Farinas, C. S. (2016). Addition of metal ions to a (hemi)cellulolytic enzymatic cocktail produced in-house improves its activity, thermostability, and efficiency in the saccharification of pretreated sugarcane bagasse. *New Biotechnology*, 33(3),

331–337. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2015.12.002>

- Vassilev, S. V., Baxter, D., Andersen, L. K., Vassileva, C. G., & Morgan, T. J. (2012). An overview of the organic and inorganic phase composition of biomass. *Fuel*, *94*, 1–33. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2011.09.030>
- Verma, R., Bhalla, A., & Kumar, S. (2020). Valorization of Lignocellulosic Residues for Cost-Effective Production of Thermo-Alkali-Stable Xylanase by *Geobacillus thermodenitrificans* X1 of Indian Himalayan Hot Spring. *Waste and Biomass Valorization*, *11*(3), 1205–1215. <https://doi.org/10.1007/s12649-018-0402-y>
- Visser, E. M., Ferreira, L. T., Nicolau, D. A. M., & Guimarães, V. M. (2015). Increased enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse from enzyme recycling. *Biotechnology for Biofuels*, *8*(5), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13068-014-0185-8>
- Wu, S., Liu, B., & Zhang, X. (2006). Characterization of a recombinant thermostable xylanase from deep-sea thermophilic *Geobacillus* sp. MT-1 in East Pacific. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *72*(6), 1210–1216. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0416-4>
- Xin, F., & Geng, A. (2010). Horticultural waste as the substrate for cellulase and hemicellulase production by *trichoderma reesei* under solid-state fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *162*(1), 295–306. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8745-2>
- Yun, K., Yopi, K., & Meryandini, A. (2015). Characterization of xylanase activity produced by *Paenibacillus* sp . XJ18 from TNBD Jambi , Indonesia. *Hayati Journal of Biosciences*, *22*(1), 20–26. <https://doi.org/10.4308/hjb.22.1.20>

Zhao, C., Lu, X., Deng, Y., Huang, Y., & Liu, B. (2015). Purification and characterization of thermostable cellulase from consortium XM70 in terrestrial hot spring with sugarcane bagasse. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 14(4), 591–598. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v14i4.5>

ANEXOS
PANEL FOTOGRÁFICO



Inoculación de *Geobacillus* sp. 10AC en medios de cultivo enriquecidos con coronta de maíz y bagazo de caña de azúcar.



Micropipetas, tips y microplaca luego de la reacción de coloración con DNS posterior a la hidrólisis enzimática.



Cultivo de *Geobacillus* sp. 10AC en baño María a 55 °C y 180 rpm.

MATRIZ DE CONSISTENCIA

PROBLEMA	OBJETIVO	HIPÓTESIS	VARIABLES	INDICADORES	INSTRUMENTOS	METODOLOGÍA
General	General	General				
¿Cuál es potencial celulolítico y xilanolítico de <i>Geobacillus</i> sp. nativos empleando residuos lignocelulósicos y bajo ciertas condiciones de cultivo?	Evaluar el potencial celulolítico y xilanolítico de las cepas nativas de <i>Geobacillus</i> sp. empleando residuos lignocelulósicos teniendo en cuenta diferentes condiciones de cultivo.	Al menos una cepa de <i>Geobacillus</i> sp. nativo presenta potencial para hidrolizar la celulosa y el xilano presentes en los residuos lignocelulósicos bajo diferentes condiciones de cultivo.	Independientes: Cepas nativas de <i>Geobacillus</i> sp. Condiciones de cultivo.	Cepa de <i>Geobacillus</i> sp. Tipo de residuo lignocelulósico. Concentración de inóculo (%v/v). Tamaño de partícula del sustrato (ASTM). Concentración del sustrato (%p/v). Tiempo de incubación (h). Temperatura y pH de hidrólisis enzimática. Concentración de sales y sustancias químicas (mM).	Espectrofotómetro para lecturas de absorbancia. Tamices ASTM. Balanzas digitales. Cronómetro digital. Micropipetas de precisión. pHmetro. Incubadoras térmicas digitales. Softwares estadísticos.	Cultivo en fermentación sumergida (LSF). Tamizado con mallas ASTM. Calibración/Ajustes de pH Medición de tiempos de incubación. Cultivos con grupos de control y diferentes tratamientos.
			Dependiente: Potencial celulolítico y xilanolítico.	Actividad celulolítica y xilanolítica de <i>Geobacillus</i> sp. (UI/ml).	Microplacas para hidrólisis enzimática. Microplacas de lectura.	Hidrólisis enzimática sobre sustratos estándar (CMC y xilano de Beechwood). Reacción de coloración con DNS.