



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Purificación y caracterización parcial de enzimas con
actividad xilanolítica obtenidas de cultivos de *Penicillium*
sp. LM-3 crecido en residuos de café y sus alcances
biotecnológicos en el tratamiento del papel**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

SANTIAGO JAVIER CARRETO CASTRO

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JOSÉ EDUARDO RODRÍGUEZ BUSTAMANTE

2019





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Índice

Resumen	3
1. Introducción	4
1.1 Clasificación de las enzimas	5
1.2 Xilanasas.....	10
1.2.1 Clasificación de las xilanasas	12
1.2.2 Mecanismos catalíticos de las xilanasas	14
2. Antecedentes	19
2.1 Investigación en el laboratorio de química de biomacromoléculas en el Instituto de Química, UNAM.....	19
2.2 Género <i>Penicillium</i>	19
2.3 Sistema de fermentación en estado sólido.....	22
2.4 El sustrato de los residuos de café	26
3. Justificación	29
4. Hipótesis	30
5. Objetivos	30
5.1 Objetivos generales.....	30
5.2 Objetivos particulares.....	30
6. Métodos y materiales	31
6.1 Material y equipo.....	31
6.2 Medio SNM	33
6.3 Obtención y conteo de esporas.....	33
6.4 Preparación de biorreactores con bagazo de café.....	34
6.5 Prueba de azúcares reductores König et al., (2002).....	35
6.6 Precipitación por sulfato de amonio (NH ₄) ₂ SO ₄	36
6.7 Crecimiento del hongo <i>P. sp.</i> LM-3 sin medio SNM.....	37
6.8 Curva patrón para la determinación de azúcares reductores.....	37
6.9 Zimogramas de xilanasas.....	38
6.10 Prueba de remoción de tinta de impresora láser con xilanasas	38
7. Resultados	39
8. Discusión	49
9. Conclusión	56
10. Perspectivas	57

11. Literatura citada	57
Anexos	67

Resumen

En el Parque Nacional *Insurgente Miguel Hidalgo y Costilla*, conocido como La Marquesa en el Estado de México, se aisló un hongo del mantillo que fue descrito como *Penicillium* sp. LM-3. En un trabajo previo se realizó el crecimiento del hongo en acículas de pino (propias del mantillo donde fue aislado) e igualmente se sembró en un sustrato de bagazo de café, que era usado en el laboratorio. El bagazo era de café molido y después de la extracción se secó al sol para después esterilizarlo en autoclave. Posteriormente al bagazo se inoculó con una concentración conocida de esporas del hongo previamente aislado, para ello se utilizó el sistema de fermentación en estado sólido y se usó como matriz el bagazo de café. Con este sistema al cabo de diferentes tiempos y usando como solvente agua destilada, se obtuvo un filtrado acuoso, la muestra se filtró con diferentes tipos de membranas para poder remover contaminantes. Se usó la técnica de precipitación por sulfato de amonio para obtener tres fracciones del filtrado acuoso que correspondían a 30, 60 y 100 % de saturación de la sal. Por medio de la prueba de azúcares reductores se determinó que la fracción con 60 % de saturación fue la que tuvo mayor actividad xilanolítica y fue sometida a ultrafiltración con membranas de 10 y 30 kDa de exclusión. Durante el proceso de purificación las muestras fueron evaluadas por medio de la técnica de electroforesis para determinar cantidad y peso molecular de las proteínas y la detección de la actividad por medio de zimogramas. Durante las pruebas de actividad xilanolítica hubo una disminución en la actividad xilanolítica a través del tiempo. Por último, se pudo realizar una prueba para la eliminación de la tinta en hojas de papel impresas y se realizó una tabla de rendimiento para ver la actividad que desempeñó la enzima a lo largo de la purificación parcial.

1. Introducción

Las proteínas juegan un rol importante en la vida ya que desempeñan una gran variedad de funciones que son necesarias en los organismos y van desde procesos estructurales, de transporte y catálisis de reacciones químicas. A este último tipo de proteínas se les denomina como enzimas y controlan casi en su totalidad la gran variedad de reacciones bioquímicas en los organismos (Voet y Voet, 2006).

Las enzimas en su mayoría son grandes proteínas que actúan como catalizadores de reacciones biológicas (McMurry, 1994). En la naturaleza existe una amplia variedad de estas biomoléculas y cada una de las cuales catalizan un tipo de reacción. Aunque se ha comprobado que existen enzimas que actúan sobre un único sustrato, investigaciones recientes demuestran que existen distintos tipos de enzimas que se encuentran en la naturaleza y en las que se ha observado que catalizan más de una reacción (Ferrer, 2006).

El uso de enzimas en la industria se ha desarrollado gracias a las oportunidades tecnológicas que mediaron el conocimiento entre las disciplinas científicas y sus áreas de aplicación (Scragg, 2004). La biotecnología ha ayudado al reconocimiento y a la mediación en las áreas de aplicación dentro del sector industrial, encargándose de la utilización de principios biológicos y el conocimiento de diversos materiales para su explotación en sistemas o procesos biotecnológicos (Higgins, 1988). Esto representa una fuente poderosa y versátil para realizar procesos libres de contaminantes sobre todo con sustancias que se usan como catalizadores que contienen metales. La biotecnología se ha encargado de conocer las propiedades enzimáticas para aprovechar las características y técnicas de la catálisis (Bull *et al.*, 1999). Su utilización para las reacciones deseadas representa ventajas como: ser una técnica muy específica al sustrato, ofrecer un menor costo, y ser fuentes renovables y ofrece un mayor rendimiento (Hall *et al.*, 1988; Scragg, 2004).

Las enzimas catalizan una amplia variedad de reacciones químicas y ayudan a la obtención de productos de valor agregado. Por ello su uso va en aumento y nos acerca al descubrimiento de nuevas enzimas a través de la búsqueda en la biodiversidad, en secuencias genómicas, mediante evolución dirigida y *phage display* (Marrs *et al.*, 1999).

1.1 Clasificación de las enzimas

La forma más sencilla en la que se clasifican las enzimas está basada en las reacciones que catalizan y por ello se ha adoptado por acuerdo internacional un sistema de nomenclatura y clasificación (IUBMB, 2019). Este sistema distribuye las enzimas en seis clases (Tabla 1) que se dividen en subclases según el tipo de catálisis. A cada enzima se le asigna un número de cuatro apartados junto con un nombre que defina la reacción que cataliza: el primer dígito denota el nombre de la clase de la enzima, el segundo refiere la subclase mientras que los siguientes dígitos denotan el tipo de reacción. Esta clasificación se mantiene actualizada por el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB, por sus siglas en inglés), y se indican por números de EC (*Enzyme Commission*, por sus siglas en inglés). El número EC está asociado con un nombre recomendado para cada enzima y aunque el número no especifica el nombre de la enzima si especifica la reacción que catalizan (Withers y Williams, 2018).

Tabla 1. Clasificación internacional de las enzimas. Tomado de Nelson *et al.*, (2005) y actualizado de IUBMB, 2019.

N.º	Clase	Tipo de reacción catalizada
1	Oxidoreductasas	Transferencia de electrones (iones hidruro o átomos de hidrógeno)
2	Transferasas	Reacciones de transferencia de grupos
3	Hidrolasas	Reacciones de hidrólisis (transferencia de grupos funcionales al agua)
4	Liasas	Adición de grupos a dobles enlaces o formación de dobles enlaces por eliminación de grupos
5	Isomerasas	Transferencia de grupos dentro de moléculas dando formas isoméricas
6	Ligasas	Formación de enlaces C-C, C-S, C-O y C-N mediante reacciones de condensación acopladas a la ruptura de ATP
7	Translocasas	Catalizan el movimiento de iones o moléculas a través de una membrana celular

En las últimas décadas, ha estado presente la búsqueda de alternativas para la catálisis de diversas reacciones y se ha buscado la eficiencia de los procesos enzimáticos (Garrity y Hunter-Cevera, 1999). En México la industria nacional ha impulsado el desarrollo de la biotecnología mediante la búsqueda de nuevas herramientas que generen una mayor competitividad; aunque la búsqueda de

nuevas soluciones ha estado presente, la producción de enzimas en el país ha ido disminuyendo hasta convertirse en una actividad menor, respecto al volumen de enzimas que se consumen (López-Munguía, 2004).

Un sitio importante en la exploración de nuevas alternativas enzimáticas son los suelos (en especial donde el material vegetal se acumula y se deteriora), porque existe una gran cantidad de enzimas que son secretadas extracelularmente por consorcios microbianos, en los que están presentes: bacterias, (en especial actinomicetos) levaduras y hongos filamentosos, que se encuentran interaccionando para descomponer la materia vegetal (que es una fuente renovable de polisacáridos) que utilizan como principal fuente de carbono (figura 1); todos los microorganismos participan activamente en el reciclaje natural de este elemento en ecosistemas terrestres (Prade, 1996; Haider y Shäffer, 2009; Kote *et al.*, 2009; Abdeshahian *et al.*, 2010; Bagewadi *et al.*, 2016). Mediante la ecología molecular se desarrollaron estudios enzimáticos y se ha podido evidenciar el escaso conocimiento que se tiene sobre la población microbiana en los ecosistemas, y abre posibilidades para la búsqueda de nuevas actividades enzimáticas en los microorganismos (López-Munguía, 2004).

Los organismos que reciclan el carbono en el suelo son muy importantes al secretar enzimas que reciclan tejidos muertos; dejando los elementos básicos disponibles para su reuso en la siguiente generación de organismos; sin este paso, plantas y animales hubieran muerto de inanición tiempo atrás (Brady y Weil, 2008). La alta estabilidad de estas enzimas en los suelos ha sido estudiada ya que deben permanecer a la intemperie mientras catalizan reacciones químicas. En los últimos años Ha ido en aumento el desarrollo de estudios enzimáticos en los suelos para identificar posibles perturbaciones por contaminantes en el ecosistema (Nannipieri *et al.*, 2003).

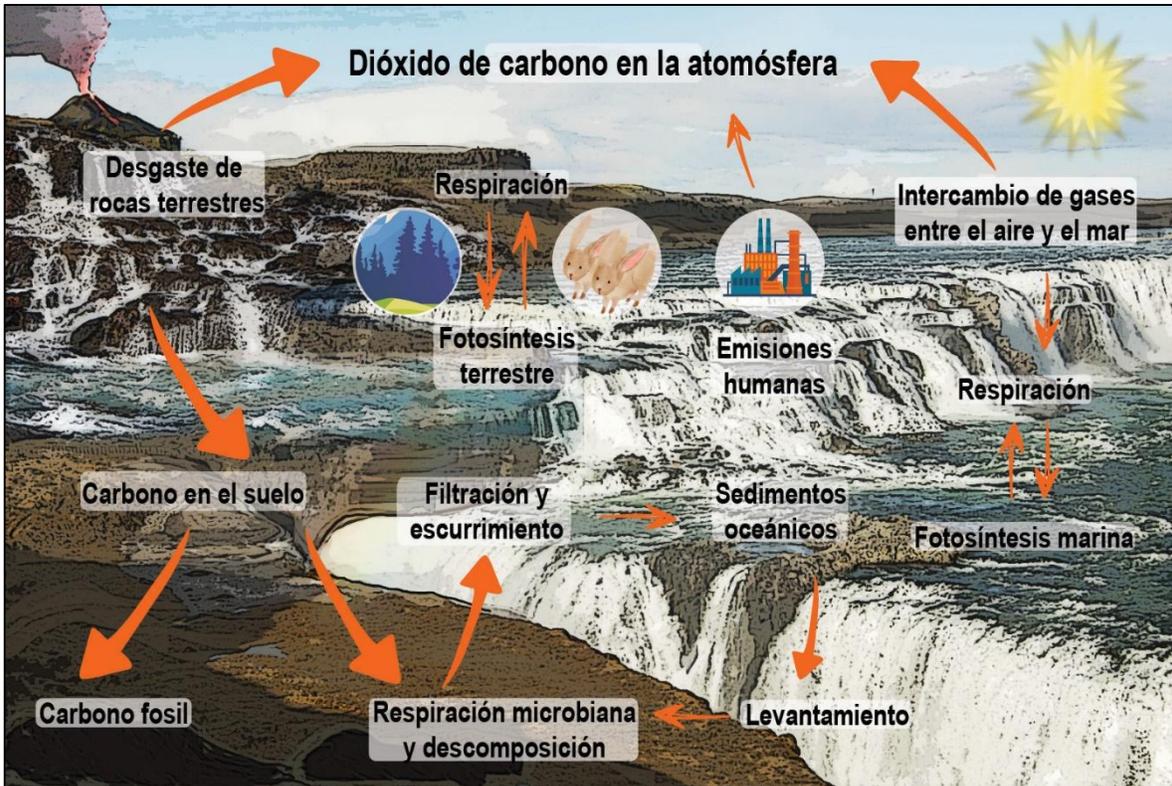


Figura 1. Esquema simplificado del ciclo del carbono

El material vegetal se compone en gran parte por celulosa, hemicelulosa y lignina, y son estos los mayores polímeros constituyentes de las paredes celulares vegetales. Estos componentes se encuentran en proporciones distintas y representan entre 95-98 % del tejido maderable (figura 2). Adicionalmente a estos constituyentes, hay materiales extraíbles y sustancias inorgánicas que representan del 2-5 % de la masa vegetal; ello contribuye a las propiedades físicas como el color, olor, y resistencia a la degradación de la materia vegetal (Akash, 2015).

Las plantas verdes, al igual que otros organismos como las algas y algunas bacterias, pueden realizar fotosíntesis, proceso complicado en el que la luz solar proporciona la energía necesaria para convertir CO_2 y H_2O en glucosa y oxígeno y con ello logran sintetizar los carbohidratos necesarios para la obtención de energía y el anabolismo. Posteriormente cuantiosas moléculas de glucosa se enlazan químicamente en la planta para unirse y formar los polisacáridos que actúan como materiales de soporte; así se almacena la energía del sol que se usa para sostener la vida (McMurry, 1994). La energía es atrapada en la materia orgánica y

almacenada (Hall *et al.*, 1988). Para poder degradar la biomasa vegetal y utilizar esa energía, se requieren de enzimas como las celulasas, hemicelulasas y ligninasas para degradar estos compuestos y son conocidas estas enzimas como lignocelulósicas (Bagewadi *et al.*, 2016).

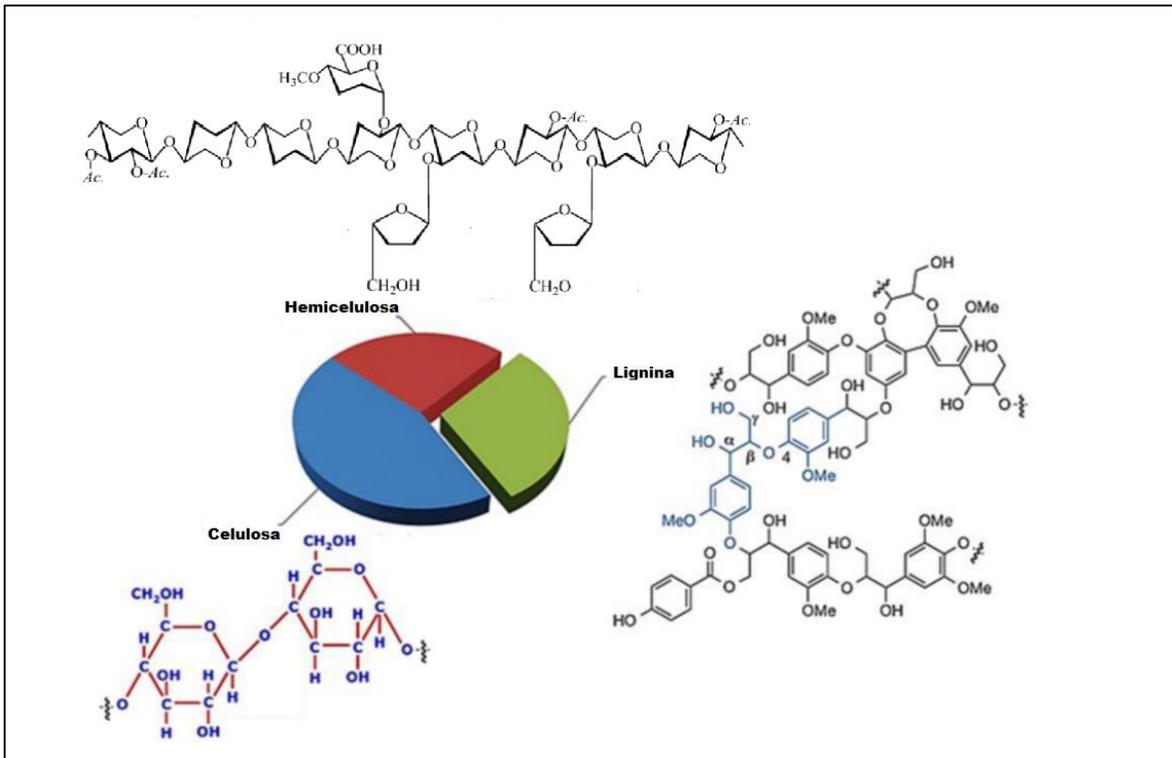


Figura 2. Estructuras de celulosa, hemicelulosa y lignina: componentes mayoritarios de la materia vegetal. Modificado de Akash (2015).

La hemicelulosa es un heteropolisacárido, formado por monómeros heterogéneos como la xilosa, arabinosa, manosa, galactosa, glucosa y ácido glucurónico. Es un componente que se encuentra unido a la celulosa por medio de puentes de hidrógeno y se unen formando una red robusta; también el compuesto se encuentra unido covalentemente a la lignina y junto con los tres mayores constituyentes de la materia vegetal se va a formar una estructura altamente compleja (Shallom y Shoham, 2003).

El xilano es un carbohidrato heterogéneo, y es el mayor constituyente de la hemicelulosa. También es la segunda fuente de material renovable más abundante en la Tierra, después de la celulosa, y por ello tiene múltiples aplicaciones en el sector industrial (Nair *et al.*, 2010). Un punto clave en su utilización se debe a su

abundancia y esto ayuda al desarrollo de nuevos métodos que puedan contribuir a la industria (Kulkarni et al., 1999).

El caso particular que se aborda en el presente trabajo es el estudio y utilización de las xilanasas, enzimas que degradan el xilano. Dentro de los productores de estas enzimas, los hongos filamentosos juegan un papel importante en la industria ya que secretan distintos tipos de enzimas que son necesarias para la hidrólisis de los polímeros, sobre todo celulasas y hemicelulasas que son necesarias para degradar distintos polisacáridos (Haltrich *et al.*, 1996). A los hongos filamentosos se les considera como los organismos más importantes en los suelos por intervenir ampliamente en el ciclo del carbono (Haider y Shäffer, 2009). Las xilanasas son utilizadas ampliamente para aplicaciones biotecnológicas: para mejorar la digestión en la alimentación animal, implementar comidas y bebidas en la repostería, en la clarificación de vinos y jugos de frutas, en el blanqueamiento de la pulpa del papel, en procesos textiles y bioconversión de materiales lignocelulósicos en bioetanol y en la remoción de la tinta en el proceso de reciclaje del papel; estas enzimas exhiben excelentes tiempos de reacción, reemplazan químicos costosos y altas temperaturas (Shah *et al.*, 2006; Nair *et al.*, 2010; Qiu *et al.*, 2010; Battan *et al.*, 2012; Maity *et al.*, 2012; Juodeikiene *et al.*, 2012; Zhang y Sang, 2015).

En el caso de la remoción de tinta en el proceso del reciclaje de papel hay que enfatizar que en México en el 2010 se reciclaron 3.2 millones de toneladas de residuos de cartón y el papel (CNICP, 2018). Este proceso requiere de grandes cantidades de materiales costosos y peligrosos que van a los desperdicios de aguas causando daños ambientales severos debido al uso de peróxido de hidrógeno y algunos compuestos clorados (Bajpai 2008; Lee *et al.*, 2013). A pesar de los compuestos tóxicos requeridos para el proceso de remoción de tinta, en México, para las empresas fabricantes de papel no existe una regulación legal que obligue a presentar un plan de manejo de residuos. Se debe enfatizar que la obtención del papel reciclado es una fuente importante de materia prima para la industria y su utilización se incrementa en todo el mundo por lo cual se necesitan estrategias que no perjudiquen el ambiente debido a la limpieza y remoción de tinta que es uno de

los procesos que tiene mayor peso para su reciclaje (Ibarra *et al.*, 2012; Saxena y Chauhan, 2017).

1.2 Xilanasas

Las xilanasas son enzimas que degradan azúcares complejos de la hemicelulosa, se encuentran dentro del grupo de las hidrolasas y degradan principalmente xilano aunque se ha demostrado que varias xilanasas de diversas familias degradan distintos polisacáridos (Collins *et al.*, 2005). El xilano es uno de los mayores componentes de la hemicelulosa y abarca hasta el 39% en materia seca de las plantas terrestres (Prade, 1996). Cuenta con un esqueleto lineal compuesto por residuos de β -1,4 xilanopiranosos y presenta una cadena homopolimérica que puede ser sustituida con diferentes cadenas laterales en varias posiciones (Deesukon *et al.*, 2011) (figura 3). Las cadenas laterales más comunes en el xilano son los grupos acetilo, arabinosa y residuos glucuronosilo, por lo cual se le reconoce como un heteropolisacárido (Sunna y Antranikian, 1997).

Al ser una estructura bastante heterogénea, para que en la naturaleza se lleve a cabo la hidrólisis completa de la estructura del polisacárido se requiere de una acción conjunta de diferentes enzimas xilanolíticas (figura 4), que incluyen las endo-xilanasas, β -xilosidasas (EC 3.2.1.37) y de enzimas accesorias como la α -arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.55), acetil-esterasa y α -glucuronidasa; entre todas ellas la β -1,4-xilanasas (EC 3.2.1.8) es muy importante ya que cataliza la reacción de hidrólisis de cadenas largas de xilano en pequeños polisacáridos (Collins *et al.*, 2005; Chávez *et al.*, 2006; Qiu *et al.*, 2010). El β -1,4 xilano se encuentra principalmente en la pared secundaria de la célula vegetal y es el mayor componente en células de tejido leñoso. Se ha demostrado que en plantas monocotiledóneas este componente se encuentra mayoritariamente en la pared primaria mientras en plantas dicotiledóneas en la pared principal no está presente; generalmente el xilano es el mayor constituyente de hemicelulosa en la madera de angiospermas mientras que en las gimnospermas es menor el porcentaje (Wong *et al.*, 1988).

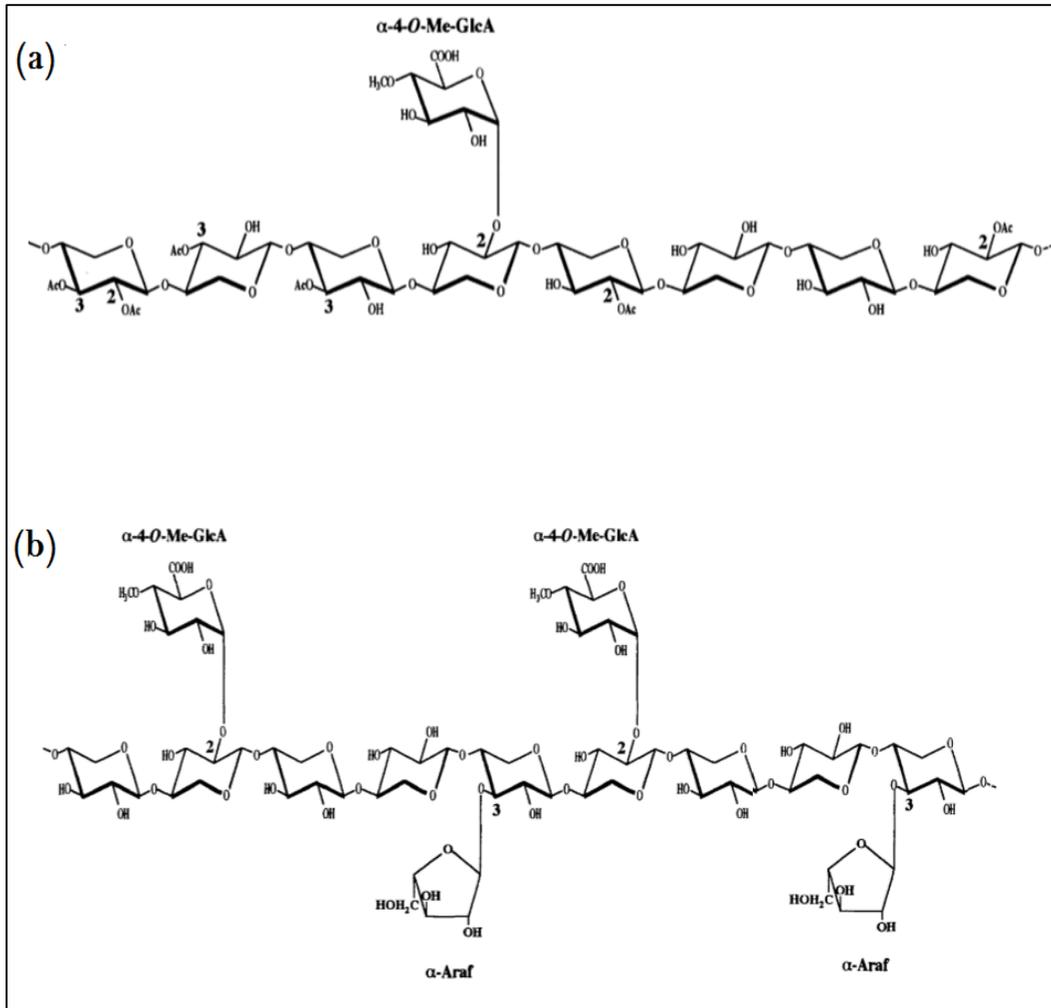


Figura 3. Imagen de dos cadenas recurrentes que presenta el xilano. (a) Cadenas lineales de xilano de tejido duro vegetal con las cadenas laterales más comunes. Con los números se describen las posiciones en las que se encuentran las ramificaciones. A-O-Me-GlcUA: α -O-Metilácido glucurónico Ac: grupo acetilo. (b) Composición de xilano de material suave. α -araf: α -arabinofuranósido. Tomado de Sunna y Antranikian (1997).

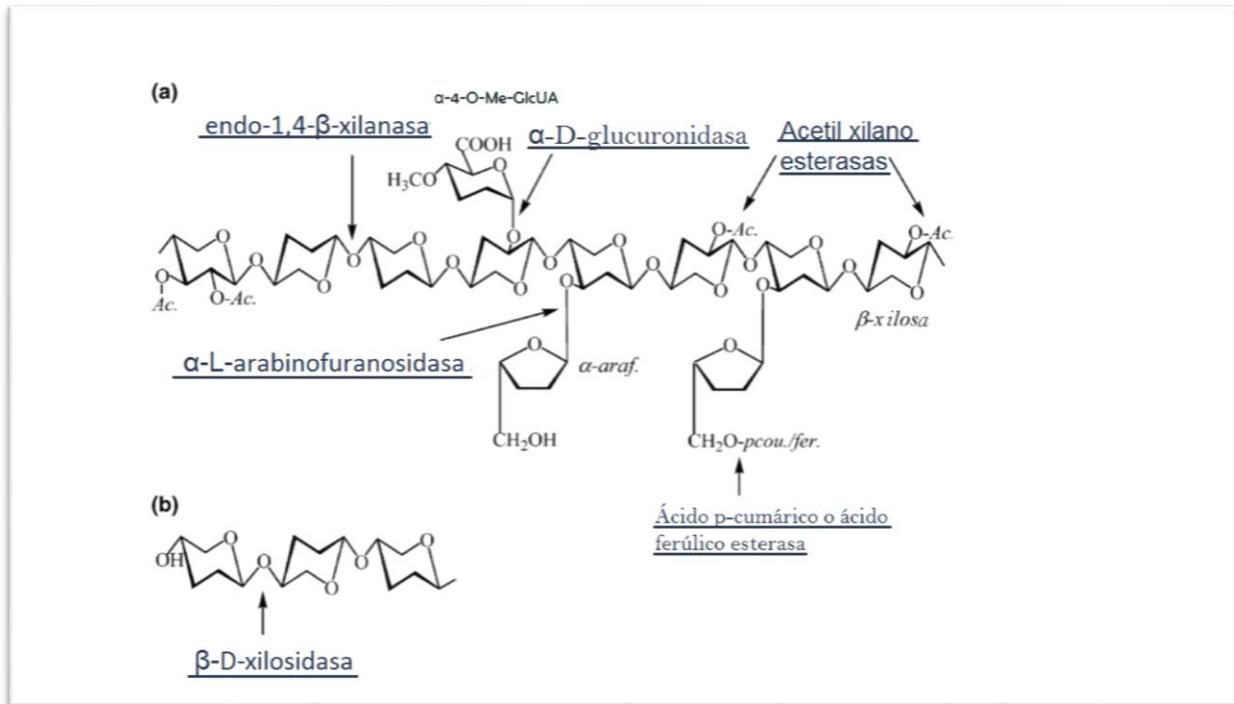


Figura 4. Composición heterogénea del xilano. Con flechas se señalan las enzimas que se necesitan para remover grupos funcionales. pcou: ácido *p*-cumárico, fer: ácido ferúlico. (a) Estructura heterogénea del xilano (b) Hidrólisis de un xilano-oligosacárido por la enzima β-xilosidasa (EC 3.2.1.37). Editado de Sunna y Antranikian (1997) y Collins *et al.*, (2005).

1.2.1 Clasificación de las xilanasas

Las xilanasas se encuentran dentro del grupo de las glicosil hidrolasas; éste es un amplio conjunto de enzimas que hidrolizan el enlace glicosídico que se da entre dos o más carbohidratos, o entre un carbohidrato y un grupo funcional (aunque este no sea un carbohidrato); la nomenclatura que se les designa es EC 3.2.1.x, donde el último dígito representa la especificidad al sustrato y ocasionalmente su mecanismo molecular (Lombard *et al.*, 2014).

La gran variedad y complejidad en la estructura del xilano da como resultado una abundancia en la diversidad de xilanasas. Por ello se intentó una clasificación basada en las propiedades fisicoquímicas y se propuso la formación de dos grupos: el primer grupo estaba compuesto de xilanasas de bajo peso molecular, menor o igual a 30 KDa con punto isoeléctrico básico y un segundo grupo que incluía a las enzimas con más de 30 KDa y punto isoeléctrico ácido; al surgir muchas excepciones y no poder ser clasificadas, el 30 % de las xilanasas, sobre todo las

fúngicas, provocó que el sistema de clasificación fuera sustituido por un sistema de clasificación más completo que permitió la clasificación no sólo de las xilanasas si no de todas las glicosidasas; este sistema ha llegado a ser un modelo de clasificación (Collins *et al.*, 2005), se basa en comparaciones de la estructura primaria de los sitios catalíticos y los agrupa en familias con secuencias relacionadas (Wong *et al.*, 1988; Henrissat *et al.*, 1989).

Para la clasificación de las xilanasas, se utiliza el análisis de conglomerados hidrofóbicos (HCA por sus siglas en inglés *Hydrophobic Cluster Analysis*), mediante el cual se analizan las similitudes de secuencias hidrofóbicas y se detectan similitudes en los plegamientos de las proteínas, aunque la identidad de la secuencia sea baja (Henrissat *et al.*, 1989). Este método es efectivo para encontrar dominios homólogos incluso si se encuentran distanciados por varios segmentos o que posean diferentes tamaños; y sobre todo, es muy específico para predecir estructuras secundarias presentes en proteínas globulares (Henrissat y Coutinho, 2001).

Debido a que hay una relación directa entre las secuencias y los tipos de plegamiento para agrupar en familias, se puede decir que el sistema para clasificar las xilanasas por medio del análisis de conglomerados hidrofóbicos:

- 1) Refleja mejor las características estructurales de las enzimas que si fuera tan solo por medio del sustrato que hidrolizan.
- 2) Ayuda a revelar las relaciones evolutivas entre las glicosidasas
- 3) Proporciona una herramienta conveniente que provee información mecanicista
- 4) Ilustra la dificultad de proponer relaciones entre la pertenencia a la familia y la especificidad del sustrato (Lombard *et al.*, 2014).

La base de datos CAZy (*Carbohydrate-Active Enzymes*, por sus siglas en inglés), proporciona una lista actualizada de la familia de las glicosidasas, y ya que en las proteínas existen plegamientos conservados por las secuencias que comparten, algunas familias pueden clasificarse en clanes solo cuando:

- 1) Las secuencias están relacionadas con más de una familia

- 2) La sensibilidad de los métodos de comparación de secuencia se incrementa
- 3) Las determinaciones estructurales demuestran la semejanza entre miembros de diferentes familias.

Se ha deducido que las familias que se encuentran dentro de un clan pudieron haber tenido un ancestro evolutivo en común (Henrissat y Coutinho, 2001; Lombard *et al.*, 2014; Withers y Williams, 2018).

A su vez, a las xilanasas se les puede asignar el prefijo: exo y endo, que refieren la habilidad de una glicosidasa para hidrolizar el sustrato; esto puede ocurrir en los extremos de la cadena (más frecuente, pero no siempre en el sitio del término no-reductor) o en sitios intermedios de la cadena de xilano, respectivamente (figura 5); con ello se demarca la nomenclatura para subclasificarlas y con esto describir los sitios de unión al sustrato en los sitios catalíticos de las glicosil-hidrolasas (Withers y Williams, 2018).

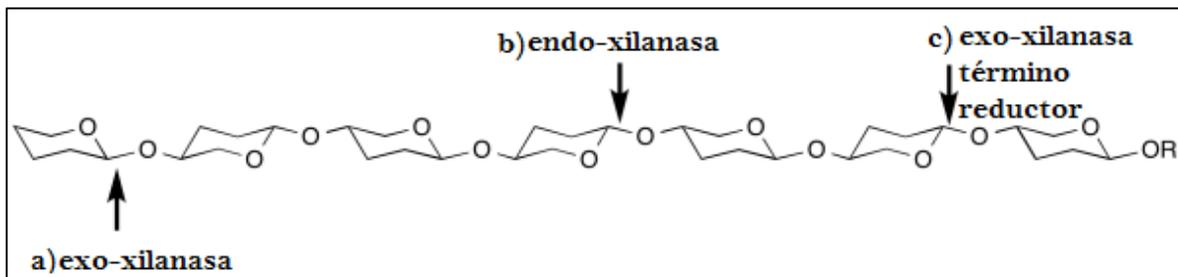


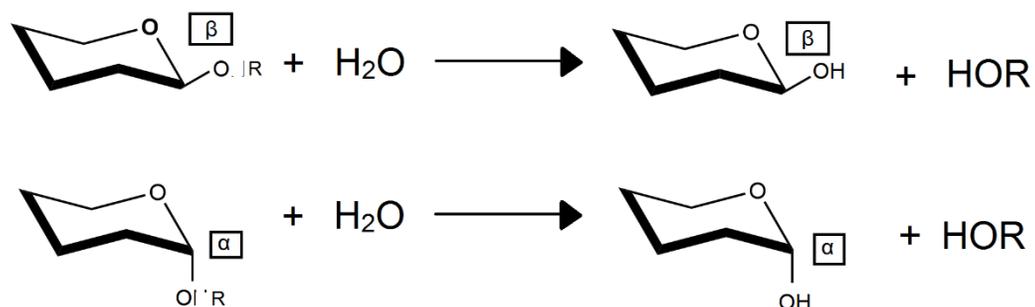
Figura 5. Cadena de azúcares donde se señalan las diferentes enzimas necesarias para la despolimerización del xilano. a) Representación simplificada de la reacción de las exo-xilanasas sobre una cadena lineal del polisacárido. b) la enzima con actividad de endo-xilanasa actúa en las partes internas de la cadena lineal de polisacáridos. c) La exo-xilanasas en el término reductor actúa sobre los extremos reductores de la cadena lineal de xilano. Modificado de Withers y Williams (2018).

1.2.2 Mecanismos catalíticos de las xilanasas

La hidrólisis del enlace glicosídico que realizan las glicosidasas generalmente es catalizada por dos residuos de aminoácido de las enzimas que son clave en este proceso (Withers y Williams, 2018). Es necesario que estos residuos actúen como un donador de protón y un nucleófilo/base; en la mayoría de las glicosil-hidrolasas los aminoácidos aspartato y/o glutamato llevan a cabo la catálisis (Ray y Withers, 2000).

La hidrólisis puede ocurrir por dos mecanismos identificados como una retención o una inversión en la configuración del carbono anomérico (figura 6) (Davies y Henrissat, 1995). En ambos mecanismos de reacción, tanto en retención como en inversión, la posición del residuo que funge como donador del protón es idéntico y está dentro de la distancia de enlace de hidrógeno del oxígeno glicosídico (Davies y Henrissat, 1995). Las enzimas glicosídicas con mecanismos de retención, utilizan un residuo como ácido y base (ya sea donando un protón o aceptándolo) mientras que el otro residuo actúa como nucleófilo, todo esto ocurre mediante un mecanismo en el que se forma un desplazamiento doble y se encuentra de intermediario una enzima-glicosilada. Por otro lado, las glicosidasas que invierten el carbono anomérico operan vía desplazamiento directo del grupo por medio de agua y un aminoácido servirá como ácido general y el otro residuo actuará como base general. A pesar de las diferencias en ambos casos existe una fase de transición de un ión oxocarbenio que tiene una carga positiva sobre un átomo de oxígeno (McCarter y Withers, 1994). La distancia entre los aminoácidos de las enzimas que tienen uno u otro mecanismo varían: en enzimas de inversión están separados por aproximadamente 10 Å, mientras que en las enzimas de retención la distancia aproximada es de 5.5 Å (figura 7; Ray y Withers, 2000).

a) Mecanismo de reacción en la cual se retiene el carbono anomérico



b) Mecanismo de reacción en la cual se invierte el carbono anomérico

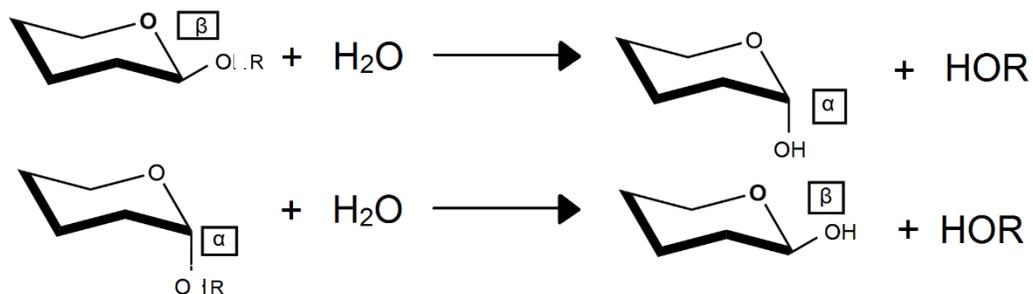


Figura 6. Esquema que simplifica los principales mecanismos de catálisis de las glicosil-hidrolasas. a) Se puede observar la configuración inicial del carbono anomérico β que posee antes de la reacción de hidrólisis el carbohidrato y después de la ruptura permanece con la misma configuración β inicial. Se observa el mismo caso con un carbohidrato α que al ser hidrolizado mantiene la misma configuración anomérica y que después de ser hidrolizado da como resultado un carbohidrato y un sustituyente o grupo químico HOR. b) La diferencia con las enzimas de inversión se puede apreciar en los monosacáridos β y α donde al final de la hidrólisis el carbono anomérico cambia a α y β al final de la reacción al final se observa que se dio una ruptura y se mantiene un extremo terminal. Ambas reacciones son dependientes de una molécula de agua para su hidrólisis. La posición α se le denomina axial y a la posibilidad β ecuatorial que es la forma de designar a ambos enlaces que se observan en la naturaleza. Editado de Withers y Williams (2018).

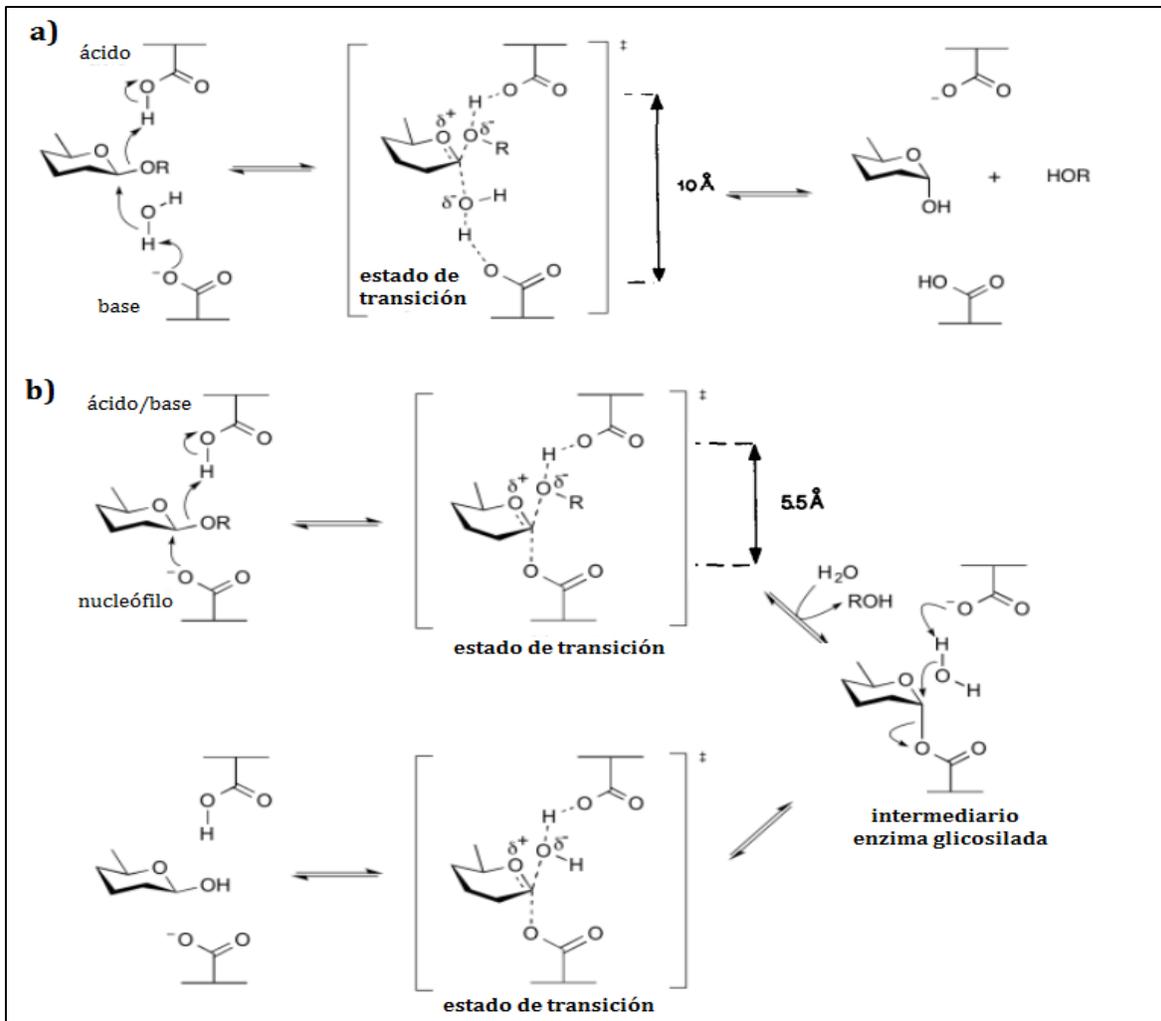


Figura 7. Diagrama de hidrólisis de polisacáridos. a) Diagrama de la ruptura del enlace β por una enzima con mecanismo de inversión del carbono anomérico: se protona la base por medio de una molécula de agua (presente en el medio) y durante la fase de transición el agua forma un enlace covalente con el carbono anomérico en posición α el aminoácido que funciona como ácido hace la ruptura del enlace. Este tipo de enzimas tiene una longitud de 10 \AA por la molécula de agua que participa en la reacción. Al finalizar la reacción se obtiene el monosacárido con distinta configuración del carbono anomérico y la cadena de polisacárido; el reactivo limitante es el agua por lo cual la hidrólisis depende de la presencia de H_2O . b) Mecanismo de retención del carbono anomérico: se forma enlace covalente entre el nucleófilo y el carbono anomérico y el $-OR$ se hidroliza con el ácido (el cual servirá como base), y pasa a un estado intermediario en el cual la enzima se une al monosacárido (enzima glicosilada), en posición α , posteriormente entra agua del medio la cual protona la base (antes ácido) forma un enlace covalente con el carbono anomérico en posición β y el enlace se rompe conservando la posición del carbono anomérico. La distancia entre ambos aminoácidos es de 5.5 \AA . Imagen editada de Davies y Henrissat (1995) y Withers y Williams (2018).

En la base de datos CAZy (Lombard *et al.*, 2014), con el código enzimático: EC 3.2.1.8, se encuentran diferentes familias de enzimas con actividad de xilanasas (tabla 2) donde se describe el mecanismo de catálisis así como los residuos que son mediadores de la reacción. Las diversas familias de glicosidasas difieren en sus propiedades fisicoquímicas, estructura, mecanismo de reacción y especificidad al sustrato, pero cuando se han analizado a las diversas familias, se ha notado que entre las diversas enzimas de diferentes familias conservan el plegamiento y por ello las agrupan en clanes que podrían indicar ancestría en común como es el caso entre las familias 5 y 10 que se encuentran en un mismo clan GH-A que muestra la similitud del plegamiento entre las enzimas de estas familias.

Tabla 2. Actividad xilanolítica en diferentes familias de las glicosil-hidrolasas.

Familia de glicosidasas (GH)	Número de miembros con actividad de xilanasa	Tipo de plegamiento de la enzima	Clan	Mecanismo de catálisis	Residuo general ácido/base	Nucleófilo/base general
5	8	$(\beta/\alpha)_8$	GH-A	Retención	Glutamato	Glutamato
7	1	β -Jelly-roll	GH-B	Retención	Glutamato	Glutamato
8	4	$(\alpha/\alpha)_6$	GH-M	Inversión	Glutamato	Aspartato
10	127	$(\beta/\alpha)_8$	GH-A	Retención	Glutamato	Glutamato
11	173	β -Jelly-roll*	GH-C	Retención	Glutamato	Glutamato
43	1	5 láminas (β -propeller)**	GH-F	Inversión	Glutamato	Aspartato

(*) *Jelly-roll* es un arreglo de estructura secundaria compuesta por ocho láminas β en un arreglo de 2 paquetes de cuatro láminas beta unidas (**) β -*propeller* es una estructura formada por láminas beta dispuestas alrededor de un eje central. Tomado de Collins *et al.*, (2005).

2. Antecedentes

2.1 Investigación en el laboratorio de química de biomacromoléculas en el Instituto de Química, UNAM

El grupo de trabajo encabezado por el Dr. José Eduardo Rodríguez Bustamante desde el 2013 se enfocó en la búsqueda de organismos productores de enzimas con actividad lignocelulósica en sitios donde el material vegetal se acumula para identificar enzimas con actividad de glicosidasa y poder crecer a los organismos productores de enzimas sobre un sustrato lignocelulósico disponible. La colecta se realizó en el Parque Nacional *Insurgente Miguel Hidalgo y Costilla*, en el Estado de México y se tomaron muestras del mantillo ya que es fuente de material vegetal en descomposición y donde se encuentran gran cantidad de consorcios microbianos que ayudan en la degradación de los compuestos lignocelulósicos (Rodríguez-Bustamante *et al.*, 2016).

Posteriormente se aislaron distintos microorganismos, y de entre ellos destacó un hongo filamentoso del género *Penicillium* debido a su potencial de crecimiento en celulosa o hemicelulosa como únicas fuentes de carbono.

Se implementó el sistema de fermentación en estado sólido y se usó como matriz el mantillo, mayoritariamente compuesto de acículas de pino, debido a que el hongo se había encontrado en ese sitio. A su vez se probó con un nuevo sustrato (bagazo de café) para que pudiera crecer y expresar diversas enzimas mediante el sistema de fermentación en estado sólido. Se usó la cepa del hongo filamentoso *Penicillium chrysogenum* para poder tener un comparativo debido a que es una cepa comercial bastante estudiada y con ello poder determinar los resultados de las pruebas.

2.2 Género *Penicillium*

Penicillium es un género de hongos microscópicos muy diverso en el planeta, cosmopolita, porque se encuentra en una gran variedad de hábitats que van desde regiones árticas, en bosques tropicales o subtropicales, suelos con contenido vegetal, en el aire, en interiores o en productos alimenticios (Visagie *et al.*, 2014). Cumple sus funciones más importantes en la naturaleza degradando el material

orgánico, y gracias a sus capacidades degradativas ha sido estudiado para la producción de nuevas enzimas (Zhang *et al.*, 2014).

El género se encuentra dentro de los hongos verdaderos y se considera parte del grupo de los ascomicetos. Una de sus características más importantes es la formación de conidios (esporas asexuales) y que carece de su ciclo sexual, o es muy raro encontrarlo en la naturaleza, o no es conocido, por lo cual se les puede llamar hongos mitospóricos en referencia a las esporas que se producen por divisiones nucleares mitóticas formadas por hifas aéreas especializadas, o conidióforos que crecen siempre por encima del sustrato (Carlile *et al.*, 2001). Se pueden distinguir distintas morfologías claras dentro del género que son identificables por medio de los conidióforos que se presentan como en hifas aéreas (figura 8; Carlile *et al.*, 2001). Estas estructuras producen abundantes conidios de 4 a 40 μm , los cuales son dispersados por el viento, lluvia o los propios animales (Deacon, 2006).

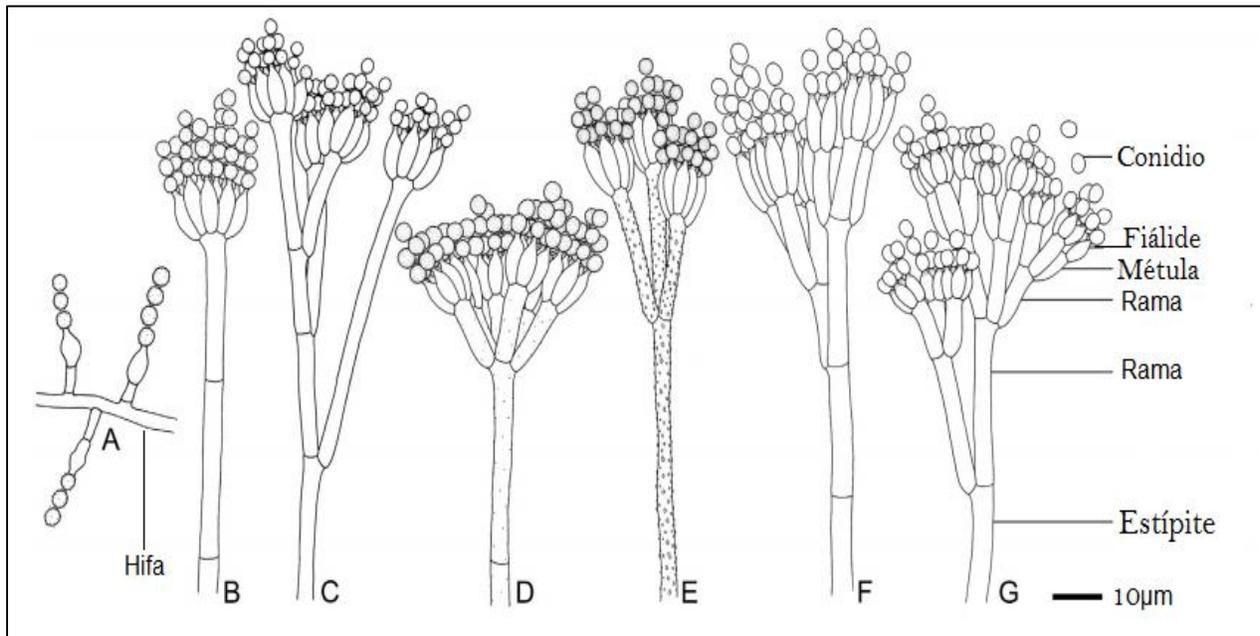


Figura 8. Patrones de ramificación de los conidióforos observados en el género *Penicillium*. A. Conidióforos con fiálides solitarias. B. Morfología de un hongo *Penicillium* monoverticilado, un solo verticilo. C. Divaricado, tiene longitudes desiguales en las ramificaciones. D, E. Morfología biverticilada en los que se diferencian dos verticilos principales. F. *Penicillium* con morfología triverticilada con tres verticilos. G. *Penicillium* tetraverticilado con cuatro verticilos. Editado de Visagie *et al.* 2014.

La gran mayoría de los hongos filamentosos son saprótrofos y cumplen roles importantes en el reciclaje de los nutrientes; son explotados comercialmente por el gran uso de sus metabolitos: antibióticos, inmunosupresores, ácidos orgánicos, etc., así como también importantes hidrolasas extracelulares como pectinasas, lipasas, proteasas, celulasas y xilanasas (Chávez *et al.*, 2006).

Existen distintas especies del género *Penicillium* que se han utilizado para la caracterización y producción de enzimas a nivel industrial debido a la gran liberación extracelular de xilanasas y enzimas necesarias para la despolimerización del xilano. Estos hongos se han encontrado en diferentes tipos de vegetación con diferentes climas y por ello se ha demostrado la gran variedad de enzimas degradadoras en las diferentes especies dentro del género ya que poseen características propias y que exhiben diferentes actividades sobre diferentes estructuras de xilano (Li *et al.*, 2000; Medeiros *et al.*, 2003). Es tan amplio y omnipresente el grupo que incluso se han descrito xilanasas extremófilas, las cuales pueden catalizar sustrato en ambientes árticos o en ambientes alcalinos o ácidos (Kulkarni *et al.*, 1999; Collins *et al.*, 2005; Nair *et al.*, 2010). Se debe entender que cada organismo puede producir diferentes enzimas xilanasas para tener una eficiencia en la despolimerización (Maheshwari, 2005). Esta multiplicidad en las enzimas podría deberse a diferentes procesos, como por ejemplo se han demostrado casos de modificaciones post-traduccionales en la que se generan las iso-enzimas, que son variantes de la enzima que catalizan la misma reacción pero difiere en su carga neta, debido a las diferencias en la composición de aminoácidos; también se han encontrado copias de los genes que codifican para la enzima en genes policistrónicos como no-policistrónicos dentro del genoma y son el resultado de la redundancia genética, gracias a ello se expresan diferentes enzimas con diferentes características (Collins *et al.*, 2005).

El hongo *Penicillium* sp. LM-3 fue aislado del material vegetal que conforma el mantillo en el suelo, la mayoría del material lignocelulósico estaba conformado por acículas de pino identificado como *Pinus pseudostrobus*. Posteriormente se intentó crecer en acículas de pino para utilizarlas como fuente de carbono y poder obtener enzimas extracelulares importantes en la degradación de polímeros de

azúcares que intervienen en procesos industriales. Pero el sustrato necesitaba de distintos procesos mecánicos y químicos para usarlo en el sistema de fermentación en estado sólido.

2.3 Sistema de fermentación en estado sólido

La fermentación en estado sólido es definida como el proceso en el cual los microorganismos crecen en materiales sólidos, sin la presencia de líquido libre y solo está presente la humedad necesaria para su crecimiento. Esta humedad se encuentra adsorbida en el material sólido que es el soporte o sustrato en el que crecen los microorganismos (Krishna, 2005). Comúnmente los sustratos que se utilizan para el sistema de fermentación en estado sólido son productos naturales provenientes de la agricultura, llamados productos o subproductos agroindustriales de desecho, estos sirven como fuente de carbono para procesos que pueden ser utilizados en la producción de compuestos de valor agregado o pueden ser un producto útil, después de la fermentación (Singh nee' Nigam y Pandey, 2009).

Los residuos de actividades agro-industriales son adecuados para utilizarse en este proceso ya que están disponibles en grandes cantidades y y son fáciles de procesar (Pandey, 2003). El sistema de fermentación en estado sólido (por sus siglas en inglés SSF: *Solid State Fermentation*) ha ido ganando la atención en nuevos estudios debido a la posibilidad de usar desechos agro-industriales abundantes y baratos como sustratos. Se muestra como una técnica biotecnológica ideal en distintos sectores industriales ya que puede reducir considerablemente la inversión capital y el costo total del producto, puesto que se trabaja con desechos y se incrementan las ganancias (Krishna, 2005).

Algunos de los beneficios que aporta el SSF para el crecimiento de microorganismos en este sistema están ligados a la cantidad de agua que puedan absorber en la matriz (soporte), esto dependerá del tipo de sustrato que se utilice y también del tamaño de poro en la matriz sólida, y así, si existe una matriz capaz de almacenar agua y con una mayor área de contacto entre la matriz y el aire (buena aireación) se tendrá un buen sistema para la fermentación en estado sólido (Krishna, 2005). Estos procesos de fermentación se han utilizado con beneficio para

el hombre (pan, queso, vino, *Koji*, etc.) y mediante el conocimiento de éstos ha dado un énfasis a la optimización de bioprocesos. Entre ellos se pueden citar distintos procesos como la bio-remediación y bio-degradación de materiales peligrosos, la biodesintoxicación de desechos agroindustriales, la biotransformación de grandes cantidades de residuos vegetales para poder extraer nutrientes y poder suplir a gran escala: metabolitos secundarios como antibióticos, alcaloides, enzimas, ácido cítrico, ácido láctico, ácido oxálico ácido fumárico, ácido gálico, biopesticidas, biosurfactantes, biofarmacéuticos, biocombustibles y compuestos aromáticos (Krishna, 2005).

En todas las aplicaciones, el primer requisito es la hidrólisis del material lignocelulósico en azúcares fermentables, con esto comienza la modificación en la estructura de los azúcares que se producen cuando el organismo secreta los complejos enzimáticos como las hemicelulasas, pectinasas y ligninasas. Estas enzimas se acumulan en el sistema de fermentación en estado sólido y por ello es posible su aislamiento (figura 9) (Singh y Nigam, 2009). La humedad juega un papel importante, ya que conforme menor sea, la difusión de nutrientes disminuirá, así como el crecimiento microbiano, mientras que la estabilidad enzimática solo se dará en ciertas regiones; por otro lado, altas cantidades de humedad conducirán a la aglomeración de las partículas del sustrato, limitación en el intercambio de gases y mayor competencia bacteriana; en general se controlan valores de humedad en el sustrato entre el 30 y 85% (Krishna, 2005).

Las mayores dificultades del sistema de fermentación en estado sólido son: problemas con la agitación dentro del sustrato; una distribución heterogénea fisiológica, física y química del ambiente en la cama de sustrato; dificultad en el control de la fermentación principalmente en el control de la temperatura; control de la humedad y control de la aireación; a su vez es difícil medir la tasa de crecimiento microbiano o la relación que pueda existir entre algunos parámetros fermentativos y también existen muy pocos microorganismos conocidos que puedan crecer con bajas cantidades de agua; el sistema por ello, debe tener un buen sustrato, donde crecerán los organismos, que posea características que permitan el crecimiento en

el fermentador para que exista el intercambio gaseoso necesario y se pueda recuperar el producto al final de proceso (Krishna, 2005).

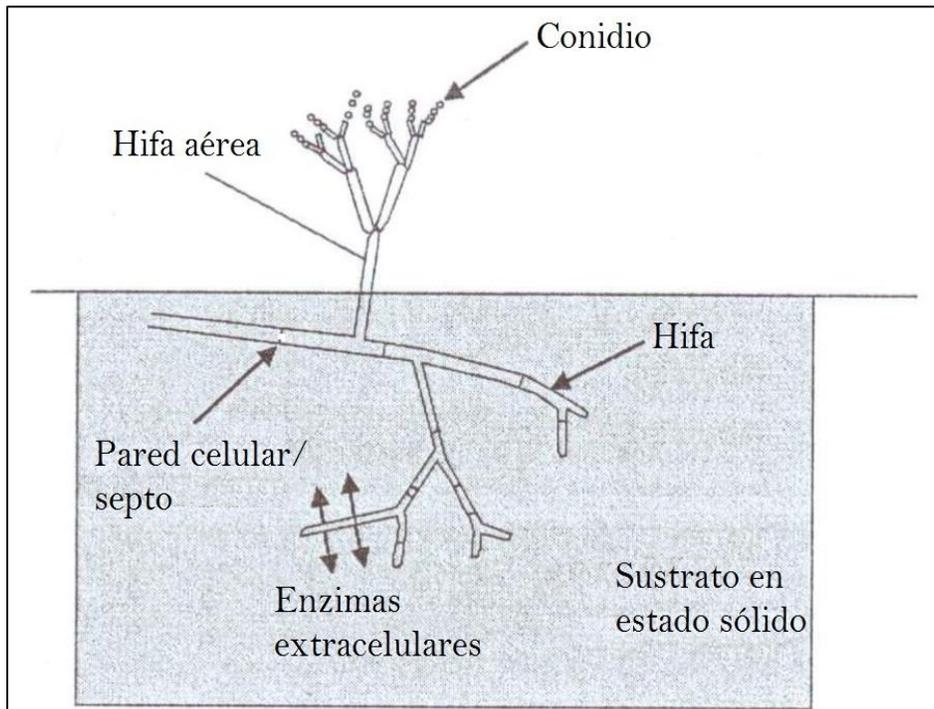


Figura 9. Representación del crecimiento de un hongo mitospórico sobre un sistema de fermentación en estado sólido. La hifa es la estructura de crecimiento en el sustrato, liberando enzimas al medio para degradar el material lignocelulósico (lignina, hemicelulosa y celulosa), y por medio de las hifas aéreas y mitoesporas podrá colonizar nuevos sustratos. Editado de Scragg (2004).

Entre diversos organismos, los hongos filamentosos son ideales para la aplicación de la fermentación en sustrato sólido debido a que están mejor adaptados debido al tipo modular de crecimiento de la hifa, la buena tolerancia a la escasez de agua (A_w) y la alta presión osmótica que soportan; todo eso les confiere mayores ventajas sobre los organismos unicelulares en la colonización de sustratos sólidos y la utilización de nutrientes disponibles por su eficiencia en la producción de enzimas y antibióticos (figura 10; Krishna, 2005).

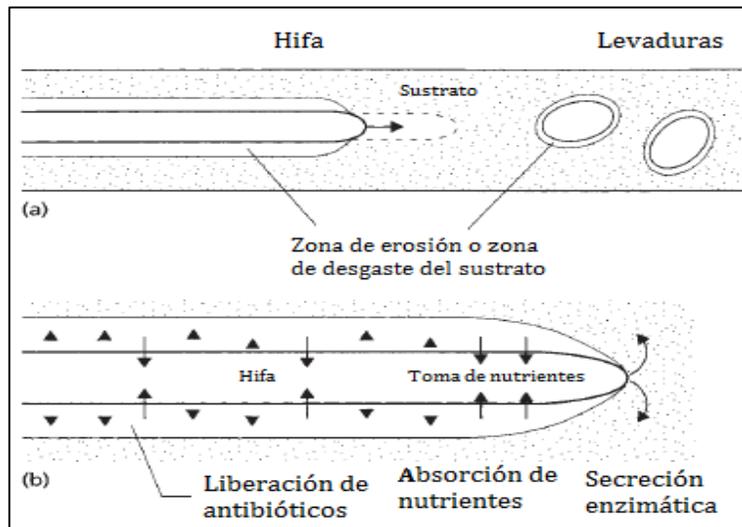


Figura 10. Diferencia de crecimiento entre levaduras y organismos hifales. (a) Se ven las amplias diferencias en el crecimiento por hifa y el crecimiento de la levadura lo cual se ve evidenciado en la zona de erosión, donde la hifa va penetrando gracias a la secreción enzimática. (b) La secreción enzimática se da en la punta de la hifa para su avance por el sustrato mientras se van tomando los nutrientes de la descomposición de azúcares, hay una liberación paulatina de antibióticos para competir por las moléculas más simples de carbono. Editado de Deacon, 2006.

El crecimiento del hongo desde la inoculación hasta que ocupa completamente el sustrato dentro del biorreactor va cambiando gradualmente en función del tiempo; si se pudiera graficar, se observaría una curva típica con diversas fases que experimenta un organismo en un cultivo que se encuentre en un sistema cerrado, como en un matraz (figura 11). En dicho sistema se encuentran todos los nutrientes necesarios, pero al inocular al organismo comienza con un crecimiento mermado, que se le denomina fase lag porque se tiene que adecuar y posteriormente colonizar el sustrato, después que se ha habituado al medio puede alcanzar una fase exponencial. En hongos filamentosos, debido al crecimiento micelial es difícil mantener el crecimiento exponencial debido a que la hifa no se encuentra dispersa libremente por el medio, pero se ha demostrado que un medio adecuado le permite lograr una fase similar de expansión en el medio. Posteriormente la fase de desaceleración se da al momento en que los nutrientes

se agotan y de ahí vendrá una fase que permanecerá estacionaria, en la cual habrá una máxima esporulación (Deacon, 2006).

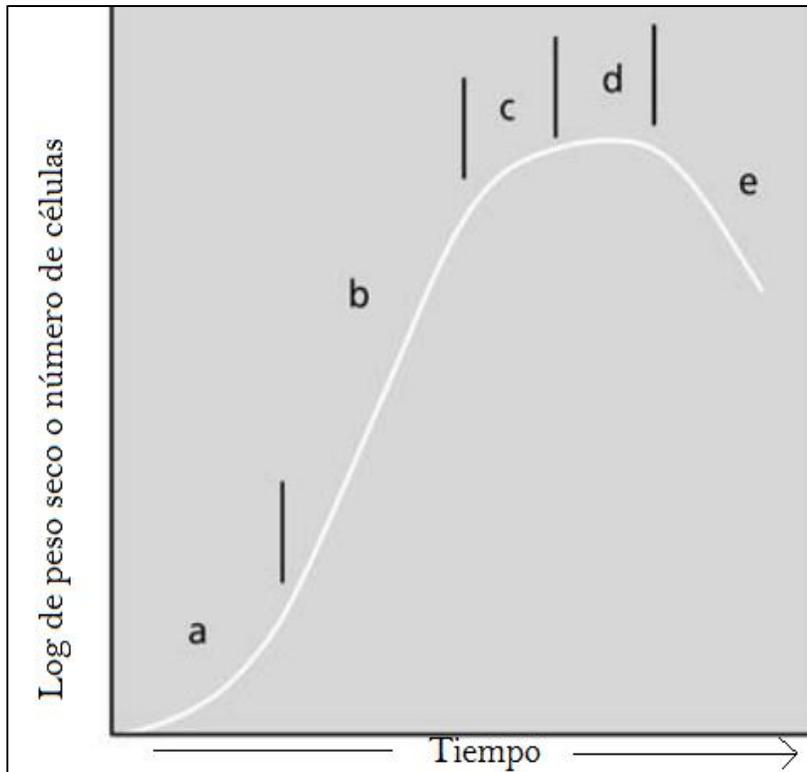


Figura 11. Imagen típica de un curva de crecimiento en un medio aislado (con nutrientes y espacio finito).a: la fase lag donde reconoce el medio y se sintetizan enzimas. b: fase exponencial o logarítmica. c: fase de desaceleración, d: fase estacionaria y e: fase de autólisis. El modelo representa el crecimiento de una levadura en medio líquido. Los hongos filamentosos con crecimiento micelial también pueden crecer exponencialmente debido a su ciclo de duplicación celular. Tomado de Deacon, 2006.

2.4 El sustrato de los residuos de café

El café es de los principales productos agrícolas en el mundo y sus desechos representan una gran cantidad de residuos agroindustriales y contienen cafeína, taninos y polifenoles, los cuales producen gran una cantidad de compuestos y por ello, problemas en el ambiente (Padmapriya *et al.*, 2013). Estos compuestos presentan una naturaleza tóxica y manejo inadecuado ha llevado a un problema de contaminación ambiental; por ello es importante el estudio de estos residuos en

procesos como el sistema de fermentación en estado sólido para la utilización de estos recursos y generar aplicaciones útiles (Pandey *et al.*, 2000).

El café posee más de 1500 sustancias de las cuales 850 son volátiles y 700 son hidrosolubles, y después de que la cafeína ha sido extraída con agua caliente la mayoría de los compuestos hidrofóbicos como aceites, lípidos, triglicéridos, y ácidos grasos, permanecen en el sólido, al igual que carbohidratos insolubles como la celulosa, hemicelulosa, lignina y compuestos fenólicos (Padmapriya *et al.*, 2013).

En el periodo de 2015-2016 el consumo de café en todo el mundo fue de 148 millones de costales de 60kg y una producción de 151.3 millones a nivel mundial (costales de 60kg), cifras reportadas por la ICO, *International Coffee Organization* 2018 (tabla 3).

Los desechos agroindustriales que se generan por la producción de café y su consumo son muy grandes. Se ha reportado que todos los desechos que se producen desde el procesamiento hasta su consumo son de más de 2 millones de toneladas generadas anualmente a nivel mundial y sus compuestos tóxicos no son reutilizados (Leifa *et al.*, 2001). Los daños generados por este tipo de productos son mayores en los alrededores de cuerpos de agua donde se desechan debido a la alta concentración de los contaminantes (Padmapriya *et al.*, 2013) o son producto de lixiviados que interactúan con los desechos orgánicos del café. Se han presentado muchas iniciativas a partir de nuevos sustratos como los desechos de café para producir nuevos productos de valor agregado y poder reducir la liberación de contaminantes al ambiente.

Tabla 1 Producción y consumo en los principales países exportadores de café en el mundo.

País	Producción (millones de costales de 60kg)	Consumo (millones de costales de 60kg)
Brasil ¹	55	20
Colombia ¹	14	1.6
Indonesia ²	11	4.5
India ²	5	2.2
Etiopia ²	3.7	3.7
México ²	3	2.3

Datos obtenidos de en el periodo 2015-2016 de: International Coffee Organization 2018.

¹ *Coffea arabica*

² *Coffea robusta*

La composición del café obtenida por Pandey *et al.*, (2000) en café sin extracción indica que por porcentaje de materia seca en carbohidratos es 57.8 %, proteínas 9.2 %, grasas 2 %, cafeína 1.3 %, taninos 4.5 % y pectinas 12.4 %. La composición química del bagazo de café utilizado en este trabajo se muestra en la tabla 2.

Tabla 2 Composición química del bagazo de café

Componente*	Mezcla de café (%)
Celulosa	12.9
Xilano	33.9
Lignina	45.2
Extraíbles	-
Contenido mineral	2.8

(*)Cuantificación realizada por extracción con detergentes (Rodríguez- Bustamante, sin publicar).

3. Justificación

Las enzimas extracelulares de los hongos filamentosos son de gran importancia porque son biomoléculas que degradan el material vegetal y lo transforman en productos con potencial biotecnológico. Debido a la existencia de problemas de contaminación con productos agroindustriales y problemas con la disposición de los materiales, sumado a los tratamientos costosos de los desechos y una necesidad creciente para salvaguardar los recursos sustentables, se ha reconocido la necesidad de desarrollar procesos biotecnológicos para utilización y fermentación de estos desechos para generar productos útiles con valor agregado (Chapla *et al.*, 2010). Es esencialmente ecológico convertir biomasa contaminante de fácil acceso para producir compuestos de valor agregado por medio de estrategias biotecnológicas (Deesukon *et al.*, 2011). Así mismo, la demanda de enzimas industriales particularmente de origen microbiano se ha incrementado para suplir nuevas aplicaciones en una amplia variedad de procesos (Chapla *et al.*, 2010).

El hongo *Penicillium* sp. LM-3 sintetiza una amplia variedad de enzimas entre las que destacan las xilanasas por su importancia en el sector industrial como catalizadores específicos, y por ello nos interesa hacer su caracterización bioquímica y molecular de estas enzimas.

Un factor importante para obtener cantidades elevadas en la producción de xilanasas es seleccionar un sustrato, para el crecimiento, apropiado para promover la inducción y así optimizar la purificación de la enzima (Haltrich *et al.*, 1996). Los esfuerzos para reducir costos de los sustratos necesarios para el crecimiento de organismos han sido direccionados a incrementar la producción enzimática para desarrollar mejores cepas microbianas que sean eficientes en procesos de fermentación y sistemas de reciclado. Puesto que el xilano es el tercer mayor compuesto de todo el carbono orgánico renovable en la Tierra (Prade, 1996) es importante desarrollar tecnologías de bajo costo utilizando sustratos renovables. Una metodología que actualmente se utiliza con desechos y que se ha comprobado que es redituable en cuanto a sus bajos costos, disponibilidad y variedad de sustratos es el sistema de fermentación en estado sólido el cual permite crecer a los microorganismos en sustratos húmedos sin la presencia de agua libre (Xu *et al.*, 2005). Esta técnica permite la utilización de materiales orgánicos (principalmente

biomasa vegetal) que son contaminantes principales en los sólidos urbanos (SEMARNAT, 2008); uno de estos son los desechos del café de los cuales se generan muchas toneladas de residuos. Estos residuos pueden ser utilizados por el sistema de fermentación en estado sólido utilizando un hongo de importancia ecológica que pueda degradar los compuestos lignocelulósicos como lo es el *Penicillium* sp. LM3 (Rodríguez-Bustamante *et al.*, 2015).

4. Hipótesis

El bagazo de café, debido a su contenido de compuestos lignocelulósicos, usado como sustrato para el sistema de fermentación en estado sólido será una buena alternativa para el cultivo de hongos filamentosos, particularmente *Penicillium* sp. LM-3 y permitirá la obtención de xilanasas que pueden ser empleadas en procesos biotecnológicos como la remoción de tinta del papel.

5. Objetivos

5.1 Objetivos generales

- Obtención de diferentes enzimas del hongo *Penicillium* sp. LM3 con la técnica de fermentación en estado sólido, usando como matriz los residuos de café.
- Determinar los alcances biotecnológicos para la remoción de tinta en el papel con estas enzimas.

5.2 Objetivos particulares

- a) Purificar parcialmente por técnicas cromatográficas clásicas las enzimas xilanolíticas del hongo filamentoso *Penicillium* sp. LM3 crecido en residuos de café.
- b) Caracterizar parcialmente mediante diferentes técnicas cromatográficas las enzimas xilanolíticas de hongo filamentoso *Penicillium* sp. LM-3 crecido en residuos de café.

- c) Comparar el crecimiento de *Penicillium* sp. LM-3 con un hongo comercial conocido *Penicillium chrysogenum* en residuos de café.
- d) Cuantificar la actividad de las xilanasas y celulasas por gramo de materia seca en las muestras obtenidas.
- e) Determinar la eficiencia de las enzimas extracelulares del hongo utilizándolas para tratar la pulpa de papel para blanquearla y la remoción de la tinta en hojas recicladas.

6. Métodos y materiales

6.1 Material y equipo

Soluciones	Solución de Tween 80 al 0.01% v/v
	Medio SNM sólido (<i>Standard Nutrient Medium</i>)
	Amortiguador (acetato 100 mmol L ⁻¹ a pH 5.0 con 20 mmol L ⁻¹ cloruro de calcio)
	DNS Ácido Dinitril-salicílico al 1 %
	Rojo congo 1% p/v

Equipo	Ultracongelador
	Incubadora para cultivos
	Matraces Erlenmeyer de 250 mL
	Cámara de Neubauer (<i>improved</i>) profundidad 0.1 mm

Membrana millipore® hidrofilica de 0.45µm (HVLP)
Membrana millipore® hidrofilica 10 kDa
Membrana millipore® hidrofilica 30 kDa
Impresora láser HP 1020
Membranas de diálisis millipore® de 500 Da de exclusión
Papel filtro
Filtro de cerámica

Sustratos	Bagazo de café (Coatepec, Veracruz)
	Carboximetilcelulosa CMC Sigma-Aldrich®
	Xilano de abedul CMC Sigma-Aldrich®

Microorganismos	<i>Penicillium</i> sp. LM-3 (laboratorio de química de biomacromoléculas en el Instituto de Química, UNAM)
	<i>Penicillium chrysogenum</i> (cepa comercial)

6.2 Medio SNM

Se preparó medio SNM sólido (*Standard Nutrient Medium*) el cual ha sido reportado para el cultivo de hongos (Zorn *et al.*, 2003; tabla 5) y se le ajustó el pH a 5.0 con NaOH 1N para sembrar esporas del hongo *Penicillium* sp. LM3 que se habían aislado previamente del mantillo del Parque Nacional *Insurgente Miguel Hidalgo y Costilla*, conocido como *La Marquesa* en el Estado de México, trabajo previo de Rodríguez-Bustamante *et al.*, 2016.

Tabla 3 Medio sólido* SNM

Sustancia	Cantidad
Glucosa	30g/L
Asparagina	4.5g/L
KH ₂ PO ₄	1.5g/L
MgSO ₄	0.5g/L
Extracto de levadura	3g/L
Elementos traza	100mL/L

Elementos traza	
Compuesto	Cantidad
FeCl ₃	0.08g/L
ZnSO ₄	0.09g/L
MnSO ₄	0.03g/L
CuSO ₄	0.005g/L
Titriplex III / EDTA	0.4g/L

(*)Para poder realizar el cultivo sólido se le adicionó agar 15g/L

Se utilizaron como biorreactores 6 matraces Erlenmeyer de 250 mL, cada uno con 50 mL de medio sólido. Se emplearon tapones de algodón en los biorreactores para un buen intercambio de gases y evitar la contaminación.

6.3 Obtención y conteo de esporas

Se sembraron 20 µL de solución de esporas aisladas previamente en matraces con capacidad de 50 mL conteniendo 20 mL de medio SNM sólido. Se dejó crecer al hongo por 96 horas a una temperatura de 29°C. Al término de este tiempo los conidios liberaron las esporas que se recuperaron con 10 mL de Tween 80 al 0.01% v/v y un agitador magnético, todo bajo condiciones de esterilidad. Posteriormente se determinó la concentración de los conidios (recuento celular) usando una cámara

de Neubauer para estimar el número de esporas por volumen de la suspensión, mediante la fórmula:

$$\text{partículas por } \mu\text{L} = \frac{\text{partículas contadas en los cuadrantes}}{\text{superficie (mm}^2\text{)} \times \text{profundidad de la cámara (mm)} * D}$$

Las partículas contadas son el número de esporas que se contaron en total mientras que la superficie contada serán los cuadros graduados que se tomaron en cuenta la profundidad de la cámara que en este caso fue de 0.1mm y D es el factor de dilución (Arredondo-Vega y Voltolina, 2007).

6.4 Preparación de biorreactores con bagazo de café

Se pesaron y se esterilizaron 20 g de bagazo de café previamente secado al sol, en matraces Erlenmeyer de 250 mL (figura 12) conformando así el sistema de fermentación en estado sólido (SSF).

Para realizar una medición de las enzimas con actividad de xilanasas o celulasas se realizó una curva de crecimiento mediante el monitoreo de las enzimas a través de distintos tiempos, por lo cual utilizaron 6 réplicas para cada organismo: *P. chrysogenum* y *P. sp. LM-3*. Se agregó a cada sistema de fermentación 1×10^6 esporas por gramo de materia seca y 20 mL de medio SNM y 10 mL de agua destilada estéril. Los matraces se colocaron a temperatura constante de 29° C utilizando una incubadora sin agitación por 8 días y se tomaron diferentes tiempos 0, 2, 4, 6, 8 y 10, los días de crecimiento en los cuales eran retirados y puestos en el ultracongelador para que no siguiera ocurriendo ninguna reacción hasta que se realizara la extracción. Con esto se realizó la comparación de las enzimas secretadas a través del tiempo entre los dos microorganismos *P. sp. LM-3* y *P. chrysogenum*.

La obtención de enzimas se realizó a partir de 50 mL de agua bidestilada que se introdujo al medio y se agitó con la ayuda de una espátula toda la muestra de esta forma el agua pudo permear completamente el sustrato y así poder separar las enzimas y tenerlas en suspensión. Después con ayuda de un filtro buchner y papel filtro cualitativo se separó la muestra y posteriormente se usó una membrana millipore® de 0.45 μm para eliminar esporas que pudieran estar presentes en la solución obtenida.

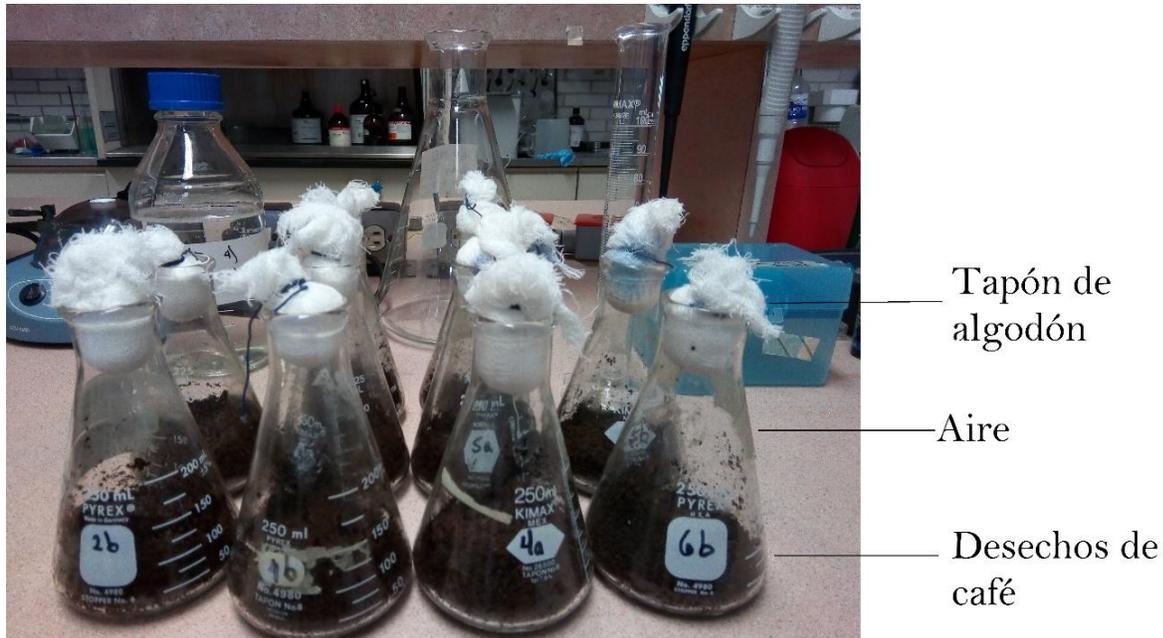


Figura 12. Biorreactores utilizados para la producción de diferentes enzimas y metabolitos secundarios que quedarán inmersos en la matriz (bagazo de café) al terminar la fermentación. El tapón de algodón es útil para que pueda oxigenarse el sustrato dentro del reactor y servir de barrera contra otros microorganismos. La matriz contiene humedad al 60 % para que el hongo pueda crecer de los azúcares que pueda degradar, y liberar enzimas necesarias para la obtención de energía del sustrato. Sistema SSF.

Con el filtrado total se realizaron pruebas de actividad de xilanas y celulasas. En la primera prueba se llevó a cabo con CMC (carboxi-metil-celulosa) y xilano de abedul ambas de marca Sigma, como se describe en la siguiente sección.

6.5 Prueba de azúcares reductores König et al., (2002)

Es una determinación de azúcares reductores, basada en la reportada por Miller en 1959, pero ajustada para que sea un ensayo uniforme y así disminuir la desviación estándar en los resultados. Cada experimento se realizó por duplicado y se generó un promedio.

Se preparó el ensayo en tubos de polipropileno cónicos de 15 mL. El tubo experimental se preparó con 500 μ L de sustrato a probar (celulosa o xilano), 400 μ L de amortiguador de acetatos y 100 μ L del filtrado enzimático. La mezcla se agitó y se incubó a 50° C por 15 minutos, al término se agregó 1 mL de DNSA Ácido Dinitril-

salicílico al 1 % que es la solución para detener la reacción. A su vez el tubo control se preparó con 500 µL de sustrato a probar (celulosa o xilano), 400 µL de amortiguador de acetatos y se incubó a 50° C por 15 minutos y al término se agregó 1 mL de DNSA y posteriormente los 100 µL de la enzima para que los dos tubos estuvieran en igualdad de condiciones pero la diferencia contrastaba la reacción enzimática de xilanasas o celulasas que se daba en los tubos experimentales. Las muestras con sus respectivos tubos control se agitaban por medio del vórtex y se colocaban en agua en ebullición y alcanzar temperaturas arriba de los 80° C para que el DNSA pudiera interactuar con los azúcares reductores. Posteriormente los tubos se enfriaron con hielo (si la temperatura es alta, los valores varían). A los tubos (experimentales y control) se le adicionaba 7 mL de agua destilada para diluir y no tener valores altos de absorbancia ya que son poco confiables y se determinaron entre 0.1 y 1 de absorbancia. Cada determinación se realizó por duplicado con su respectivo control y con los datos obtenidos evaluar el promedio y la desviación estándar. Cada muestra era leída por medio de una celda de cuarzo en el espectrofotómetro y se usó una longitud de onda (λ) a 540 nm. La fórmula que se utilizó para obtener la actividad específica (IU) por gramos de materia seca (gms), fue obtenida de König *et al.*, (2002): $[IUg^{-1}] = \frac{\Delta OD_{540} * D * V}{m * W * t}$

Dónde D es el factor de dilución, W es el peso en gramos del bagazo que se usó en cada matraz (biorreactor) y con esto se determinó la actividad específica por gramos de materia seca usados en cada sistema de fermentación (20g), V es el volumen de agua que se adicionó para la extracción (50mL), m es la pendiente de la curva de la curva estándar (ver anexo 1), t es el tiempo de incubación y ΔOD_{540} es la diferencia de la absorbancia a 540nm entre el blanco y la muestra.

6.6 Precipitación por sulfato de amonio $(NH_4)_2 SO_4$

Del filtrado total, se conservaron 10 mL para futuros análisis y el volumen restante fue tratado para separar diversas proteínas por la técnica de precipitación por sulfato de amonio (Dawson *et al.*, 1979), bajo 3 diferentes concentraciones de sal. La primera se utilizó a un 30 % de saturación y las siguientes fueron de 60 y 100 % de saturación, respectivamente. Se centrifugaron las muestras a 14,000 rpm a 4° C por

40 minutos, y con esto se obtuvo el precipitado de las fracciones que fueron resuspendidas en agua destilada. Posteriormente las muestras fueron desaladas usando membranas de diálisis de 500 Da, y se realizaron varios cambios de agua destilada para que removiera la concentración de sales, y así fueron obtenidos los diferentes lotes de proteínas con diferentes grados de hidrofobicidad. Se realizó la prueba de actividad en cada muestra para probar la actividad de xilanasa y celulasa, para continuar con el proceso de purificación siguiendo la reacción de hidrólisis.

6.7 Crecimiento del hongo *P. sp. LM-3* sin medio SNM

Se realizó la prueba de azúcares reductores para monitorear la expresión de xilanasas a través del tiempo, se usó únicamente al organismo aislado *P. sp. LM-3* con una concentración de esporas de 1×10^6 por gramo de materia seca y se adicionaba 30 mL de agua destilada y estéril, no se usó medio de cultivo, presentaba una humedad de 60% con ello el hongo filamentoso crecería con un mínimo de agua evitando posibles crecimientos bacterianos (Deacon, 2006). Se analizaron dos réplicas para cada tiempo: 0, 2, 5, 7, 9 y 13 los días de exposición del hongo en el bagazo de café con el hongo. Cada tiempo eran sacados 2 matraces y eran puestos en el ultracongelador; posteriormente con 50 mL de agua bidestilada y papel filtro se realizaba la filtración y posteriormente con membrana milipore® de 45 μm .

Durante los procesos de purificación, se determinaron las proteínas presentes en los biorreactores utilizando geles desnaturizantes de poliacrilamida a diferentes concentraciones (10 y 12%), de acuerdo al protocolo de Walter (2002).

A un volumen de 30mL se filtró por membranas Millipore® hidrofílicas de 10 KDa y de 30 KDa para obtener un corte de la fracción de las enzimas y determinar el peso molecular de la fracción con actividad de xilanasa.

6.8 Curva patrón para la determinación de azúcares reductores

Se realizó la curva patrón con concentraciones de azúcares conocidos entre 0.1 mg/mL a 1 mg/mL. Se adicionó 1 mL de DNSA para la cuantificación de los azúcares reductores por medio de la absorbancia a una longitud de onda (λ) de 540 nm. Cada punto se analizó por duplicado y se graficó el promedio. Las muestras con concentraciones de azúcares conocidos fueron tratadas con el mismo método de

azúcares reductores tratado en el 6.5 y fue determinada su absorbancia a 540 nm. Anexos.

6.9 Zimogramas de xilanasas

Los zimogramas realizados para la identificación en gel de las proteínas con actividad xilanólítica fueron SDS-PAGE (Walter, 2002) semi desnaturalizante al 7.5 % de acrilamida preparados con xilano al 0.2 %, con amortiguador de carga sin SDS ni β -mercaptoetanol (Laemmli, 1970). El amortiguador de corrida se usó con SDS al 0.05 %. Al terminar el proceso de electroforesis el gel fue lavado por 30 minutos en un amortiguador de acetato de sodio 50 mM y 25 % de isopropanol. Posteriormente el gel fue inmerso por dos ocasiones en un amortiguador de acetato de sodio 50 mM la primera durante 15 minutos y 30 minutos en la segunda ocasión para que las enzimas recobraran su actividad. Se incubaron las muestras por 15 minutos a 55° C. Para realizar la tinción negativa se utilizó una solución al 0.1 % de rojo congo permeando el gel durante 30 minutos. Posteriormente se enjuagó con agua destilada y se destiñó con una solución de NaCl (1 M) a temperatura ambiente hasta que el exceso de colorante fuese removido. Para finalizar se viró el color rojo a azul con una solución 5 % con ácido acético (Lee *et al.*, 1993; Tovar-Herrera, 2013).

6.10 Prueba de remoción de tinta de impresora láser con xilanasas

En matraces Erlenmeyer de 250 mL se adicionaron muestras del filtrado total después de crecer durante 7, 9 y 13 días de crecimiento en el sistema de fermentación en estado sólido y se agregaron 25 recuadros de 1 cm² x 1 cm² todos con color negro uniforme por un solo lado de la hoja, impresos con impresora láser. Posteriormente se agregó amortiguador de acetatos 20 mL y 5 mL de extracto con actividad enzimática y se dejaron los cuadros de papel en agitación constante por 60 minutos. Los resultados fueron analizados cualitativamente en función a la remoción de tinta en el papel.

7. Resultados

Se analizó el crecimiento en el bagazo de café de los dos organismos utilizados: *Penicillium chrysogenum* y *Penicillium* sp. LM-3. El crecimiento se monitoreó mediante el método de determinación de azúcares reductores para estimar el aumento de enzimas presentes. La prueba duró 10 días y todos los biorreactores fueron inoculados con 1×10^6 esporas por gramo de materia seca (gms) y en diferentes tiempos se determinó la presencia de enzimas con actividad glicolítica. Se usaron los polímeros xilano y celulosa. En la determinación de enzimas con actividad de celulasa (figura 13) se observa que no hay expresión significativa en la actividad de celulasa por los valores pequeños de actividad específica y la desviación estándar es muy amplia. En ninguno de los microorganismos se detectó la expresión de celulasas. Esto indica que el sustrato de bagazo de café no es un buen inductor de la producción de celulasas cuyo valor máximo fue de 0.144 IU/gramo de materia de seca (20 gms de bagazo de café).

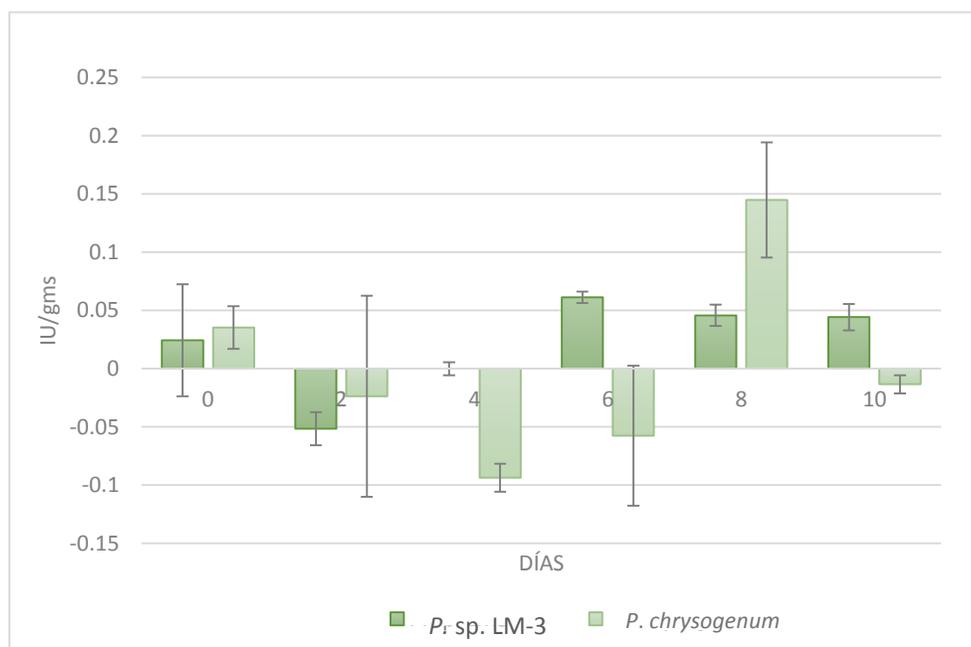


Figura 13. Prueba de actividad de celulasa con la técnica de azúcares reductores. No hubo actividad significativa en la prueba

En la prueba de actividad que se realizó para determinar xilanasas (figura 14) se puede observar un aumento de las enzimas a lo largo de la exposición del hongo al sustrato del bagazo. *P. sp. LM-3* durante los primeros 8 días sintetizó una mayor

cantidad de enzimas con actividad xilanolítica pero posteriormente el organismo *P. chrysogenum* obtuvo una mayor expresión de xilanasas. El valor máximo que obtuvo se obtuvo fue de *P. chrysogenum* fue de 12.653 IU/gms mientras que para *P. sp. LM-3* llegó a un máximo de 10.44 IU/gms. Para la realización de estas pruebas se añadió medio líquido SNM.

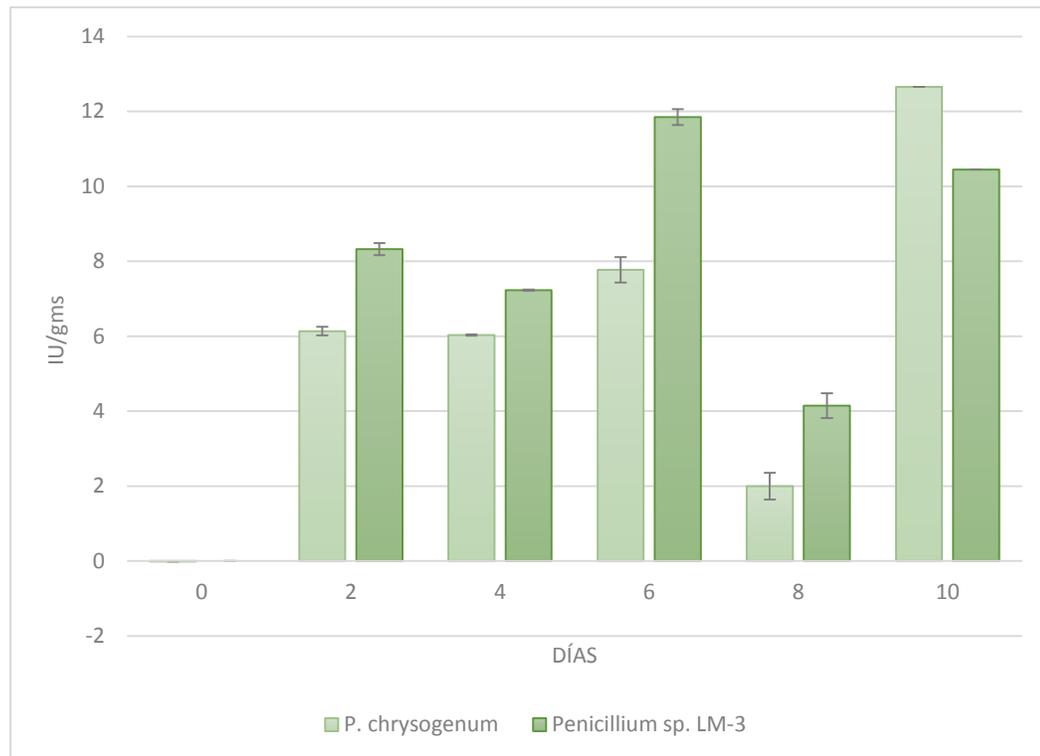


Figura 14. Prueba de actividad de xilanasas por medio de la técnica de azúcares reductores.

Se tomaron fotografías con el microscopio estereoscópico a los 8 días haber sido inoculado y el hongo filamentoso *P. sp. LM-3* colonizó por completo el sustrato de café y se pueden apreciar las hifas aéreas con las cuales dispersan los conidios (figura 15). El sustrato se encuentra compacto debido a que las hifas al crecer apelmazan el bagazo. Se utilizó medio SNM para que los dos microorganismos que crecieron en el sistema de fermentación en estado sólido tuvieran los nutrientes necesarios para crecer y secretar enzimas.



Figura 15 Fotografías tomadas con microscopio estereoscópico, al bagazo de café colonizado por el hongo *P. sp. LM-3*. Se puede observar el micelio y las estructuras aéreas. El café se observa muy apelmazado por las ramificaciones de las hifas dentro del sustrato como si fueran raíces que compactan la matriz.

En la figura 16 se observa como con mayor detalle una fotografía realizada con microscopio óptico de un corte del sistema de fermentación, donde se observa el sustrato de bagazo de café y también se observan hifas aéreas (conidióforos) que son las estructuras encargadas de generar y dispersar los conidios, en este punto se encuentra la esporulación máxima y aún presentan estas estructuras algunos conidios.

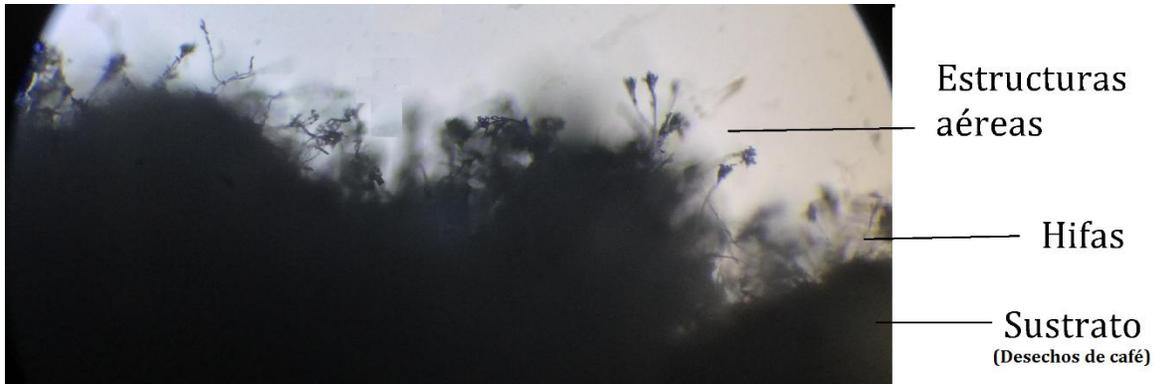


Figura 16. Imagen con microscopio óptico de un corte de la muestra. Objetivo 40X (ocular 10X). En la imagen se aprecian los conidios para la dispersión de esporas, hifas como parte del corte al sustrato que se realizó; las hifas se encuentran penetrando todo el sustrato.

Posteriormente con el filtrado de enzimas se realizó el proceso de precipitación por sulfato de amonio para purificar parcialmente la enzima por sus características hidrosolubles y se precipitaron las proteínas a 30, 60 y 100 % de saturación de sal y con éstas fracciones junto con el filtrado se realizó la prueba de azúcares reductores (figura 17) y se realizó un gel de poliacrilamida para ver las proteínas que eran purificadas parcialmente y saber los pesos moleculares de las proteínas de cada lote (figura 18).

La fracción con 60% de saturación de la sal fue la que demostró tener actividad. Por ello los siguientes procesos de purificación solo se enfocaron a esta fracción. Los resultados del filtrado total 5.71073 IU/gms mientras que después de la precipitación la fracción con 60% de saturación tuvo mayor actividad: 46.67 IU/gms. Mientras más pura se tenga la proteína va a reportar mayor actividad específica.

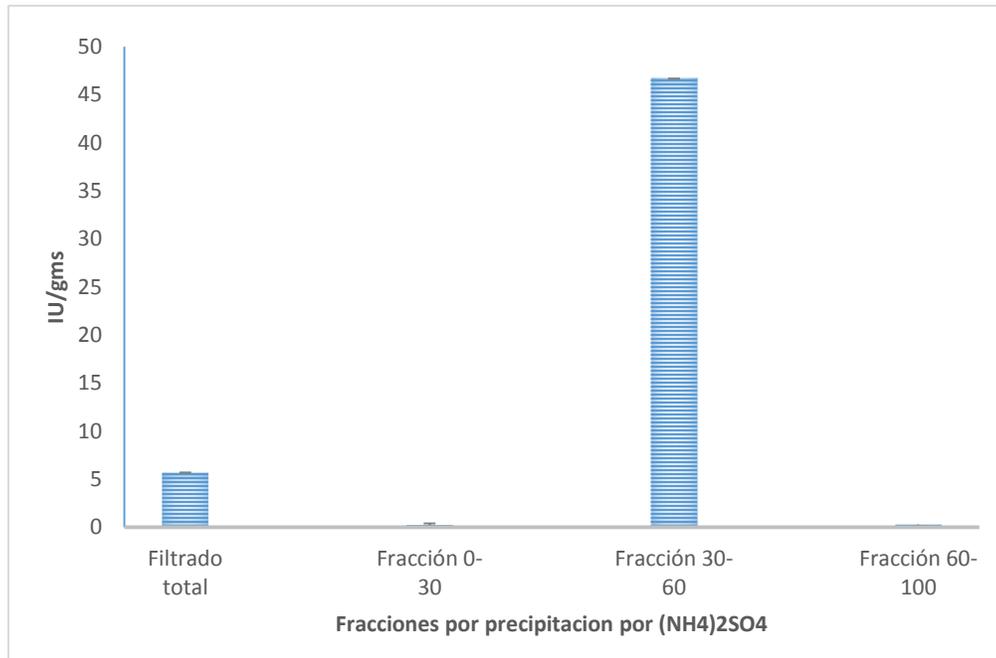


Figura 17. Prueba de azúcares reductores DNSA. Filtrado inicial y fracciones a diferentes saturaciones de sulfato de amonio previamente dializadas. Las muestras fueron obtenidas con tiempos de 8 días.

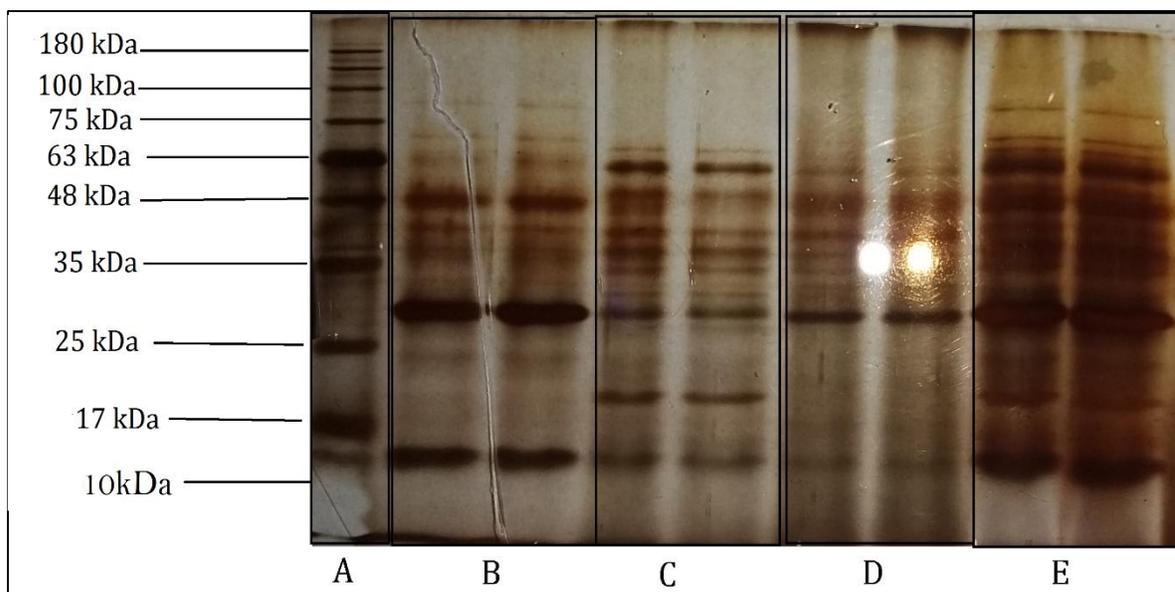


Figura 18 Gel de acrilamida al 10%. SDS-PAGE. A, marcador con diferentes pesos moleculares. B, Fracción del extracto acuoso por medio de precipitación por sulfato de amonio de 30% de saturación de la sal por duplicado. C, Fracción 60% de saturación de sulfato de amonio del extracto total por duplicado. D, fracción 100% por duplicado. E, extracto acuoso de biorreactor después de 8 días de inoculación, duplicado. Fracción 30-60 (C) de saturación es la fracción que presentó gran actividad. Se pueden observar la purificación a partir del filtrado total.

Al tener resultados positivos con actividad de xilanasa se realizó un nuevo crecimiento con la misma cepa de *P. sp.* LM-3 con una inoculación inicial de 1×10^6 esporas por gramo de materia seca (gms) pero sin medio de cultivo SNM y con esto poder determinar si el sustrato del bagazo de café sin ningún nutriente añadido era suficiente para inducir la expresión de enzimas con actividad xilanolítica y que dependiera del bagazo de café como única fuente de carbono.

Para tener datos fiables en cuanto a la expresión de las enzimas con actividad xilanolítica se analizaron 2 biorreactores por muestra de cada tiempo muestreado (figura 19). Al final se obtuvieron 5.42 y 5.61 IU/gms al final de los 13 días respectivamente. Se nota una disminución de actividad al noveno día en una réplica

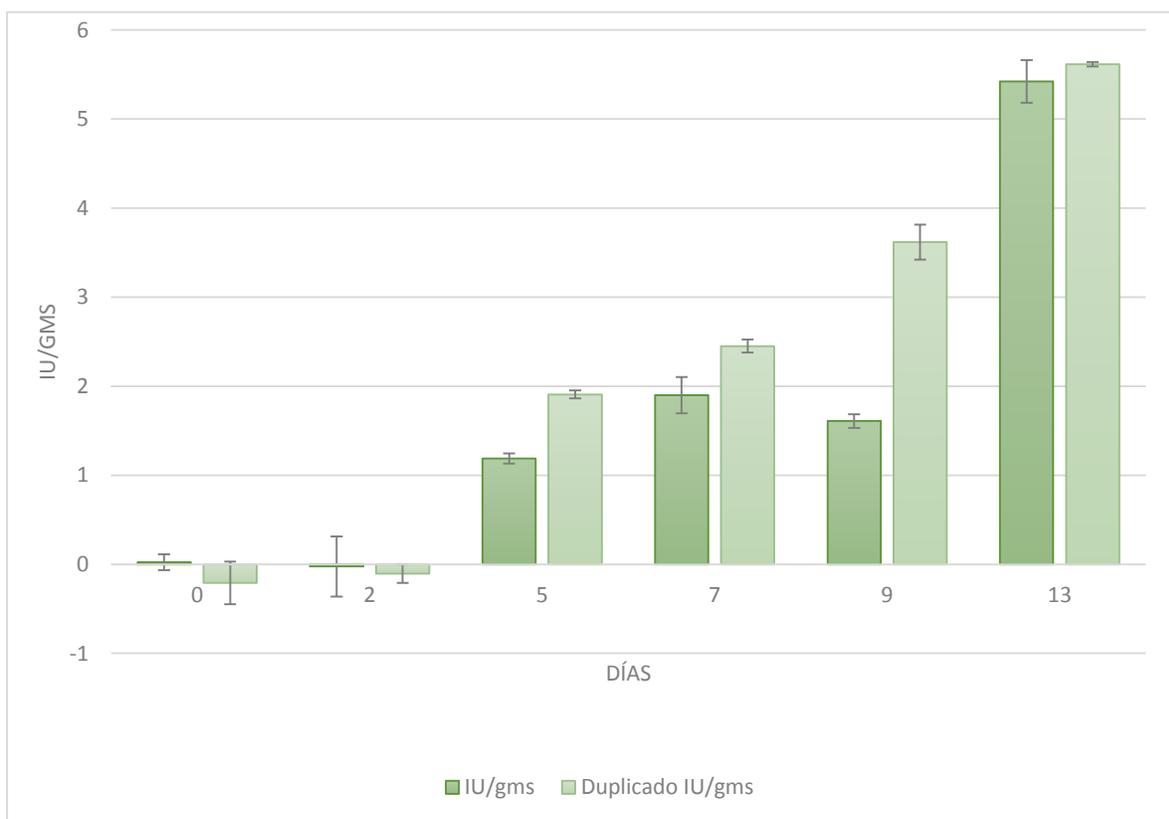


Figura 19. Actividad de enzimas xilanolíticas obtenidas de los biorreactores durante 13 días. Se realizó la prueba por duplicado en un segundo biorreactor igualando las condiciones por el mismo lapso de tiempo.

Mediante la técnica de electroforesis se realizó un gel de poliacrilamida y se tiñó con plata y con ello se determinó por medio de la aparición de bandas la presencia y peso molecular de proteínas a través de los días muestreados (figura 20). En el tiempo 0 no se observa ninguna banda lo cual indica que en el café con esporas no se encuentra ninguna proteína, pero se observa el aumento de proteínas extracelulares a través del tiempo.

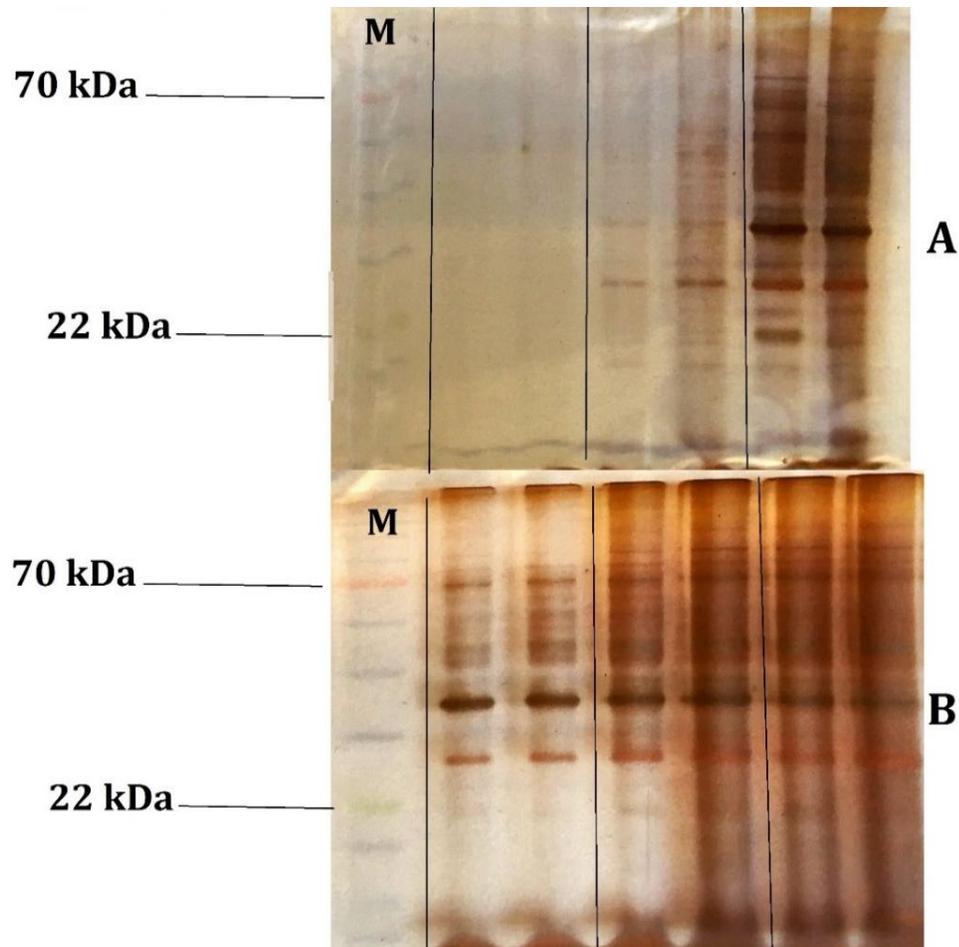


Figura 20. A) gel al 12% de poliacrilamida SDS-PAGE; M marcador de proteínas preteñido Bio-rad®. Sigüientes 2 carriles 0 días de exposición al hongo con el café en el biorreactor con su copia; sigüientes dos carriles, 2 días de crecimiento; últimos dos carriles 5 días. B) gel de electroforesis al 12 % de acrilamida SDS-PAGE. M) marcador. Sigüientes dos carriles 7 días de crecimiento; sigüientes 2 carriles, 9 días y últimos dos carriles 13 días.

Posteriormente se utilizaron membranas de 10 y 30 KDa para realizar filtraciones en el lote con actividad de xilanasas al 60 % saturación de sal y con ello determinar mediante la purificación parcial la masa de las proteínas. y con las muestras se realizaron pruebas de actividad xilanólítica en el 05/04/2016 y algunas muestras fueron sometidas a una siguiente prueba 4 años después determinando que la actividad de xilanasas disminuyó a través del tiempo (figura 21). Las muestras fueron conservadas a 0° C. El filtrado total registró 3.34 IU/gms y después de 4 años la actividad se redujo a menos de la mitad: 1.35 IU/gms mientras que la fracción entre 10 y 30 kDa su primera actividad registrada fue de 7.97 IU/gms y después del mismo tiempo disminuyó drásticamente a 2.56 y la fracción que más actividad tuvo fue de 26.75 y después de 4 años fue de 7.62. Se puede deducir que mientras más pasos de purificación la enzima pierde mayor actividad en el paso del tiempo.

Con las mismas fracciones se realizó un zimograma para detectar actividad de xilanasas (figura 22), para ver las bandas con actividad de xilanasas. Aparecen distintas bandas alrededor de los 20 y 50 kDa, lo que indica la complejidad de la muestra al poseer distintas enzimas con actividad de xilanasas.

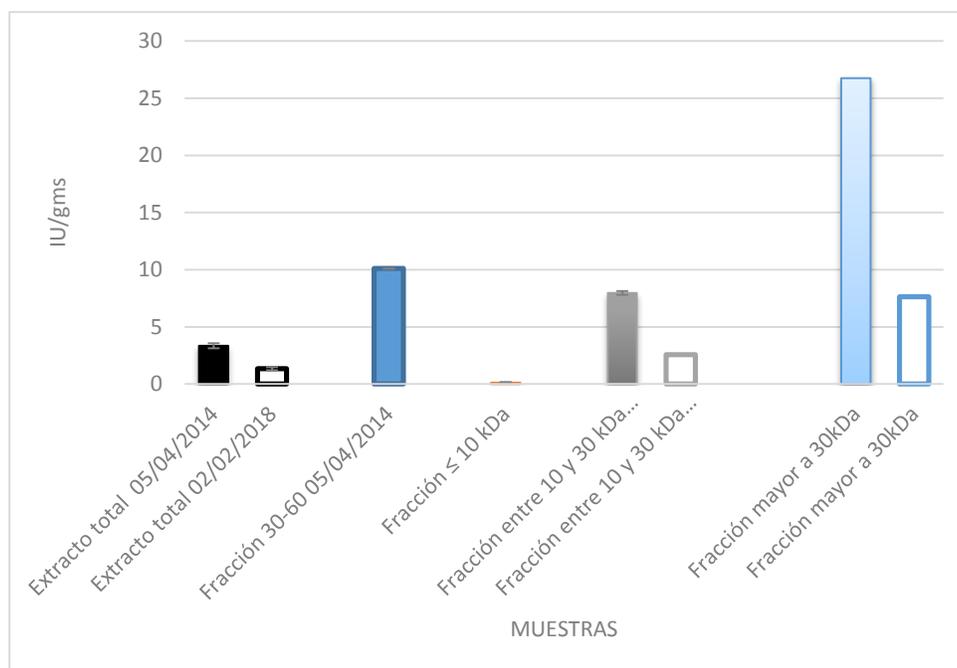


Figura 21. Proceso de purificación seguido de la prueba de azúcares reductores. Se puede ver en las pruebas que se hacen con la misma muestra (mismo color) al paso de dos años disminuye considerablemente la actividad demostrada con anterioridad.

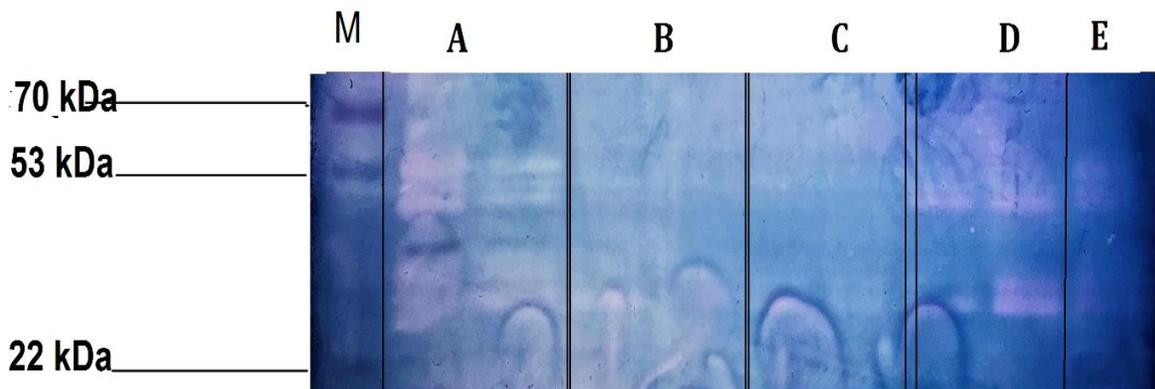


Figura 22. Zimograma para la determinación de enzimas con actividad xilanolítica. M: marcador proteico. A: muestras con extracto total con su repetición. B. Fracción ≤ 10 kDa C Fracción 30-60 con su repetición. D: fracción ≥ 30 kDa E: fracción > 10 kDa y < 30 kDa. Las bandas disminuyen en el proceso de purificación

La prueba de remoción de tinta en las hojas se realizó en matraces que contenían 20 mL de amortiguador de acetatos y 5 mL de la muestra a probar y se dejó en agitación constante en agitación durante 60 minutos. El experimento se diseñó para poder determinar cualitativamente la remoción de tinta en el papel impreso y se observó que conforme aumentan los días de crecimiento en el sistema de fermentación, la actividad de la xilanasa aumenta (figura 23). En el control se usó agua y se observa la diferencia en el papel que fue tratado con los filtrados enzimáticos.

Los rendimientos obtenidos se midieron con IU totales (por los 20 g de café que se usaron) y se observó que con medio nutritivo, que de 114 IU totales con la fracción se eleva a 933 IU (tabla 6). En el rendimiento sin medio de cultivo (tabla 7) fue menor comenzando el filtrado total en 66 IU, en la fracción de 60% fue de 202 IU totales obtenidos y cuando se usó la membrana la actividad se incrementó 271 IU totales. Lo cual indica que la complejidad proteica se encuentra por arriba de los 30 kDa. A lo largo de los procesos de purificación se ve un aumento en la actividad específica.

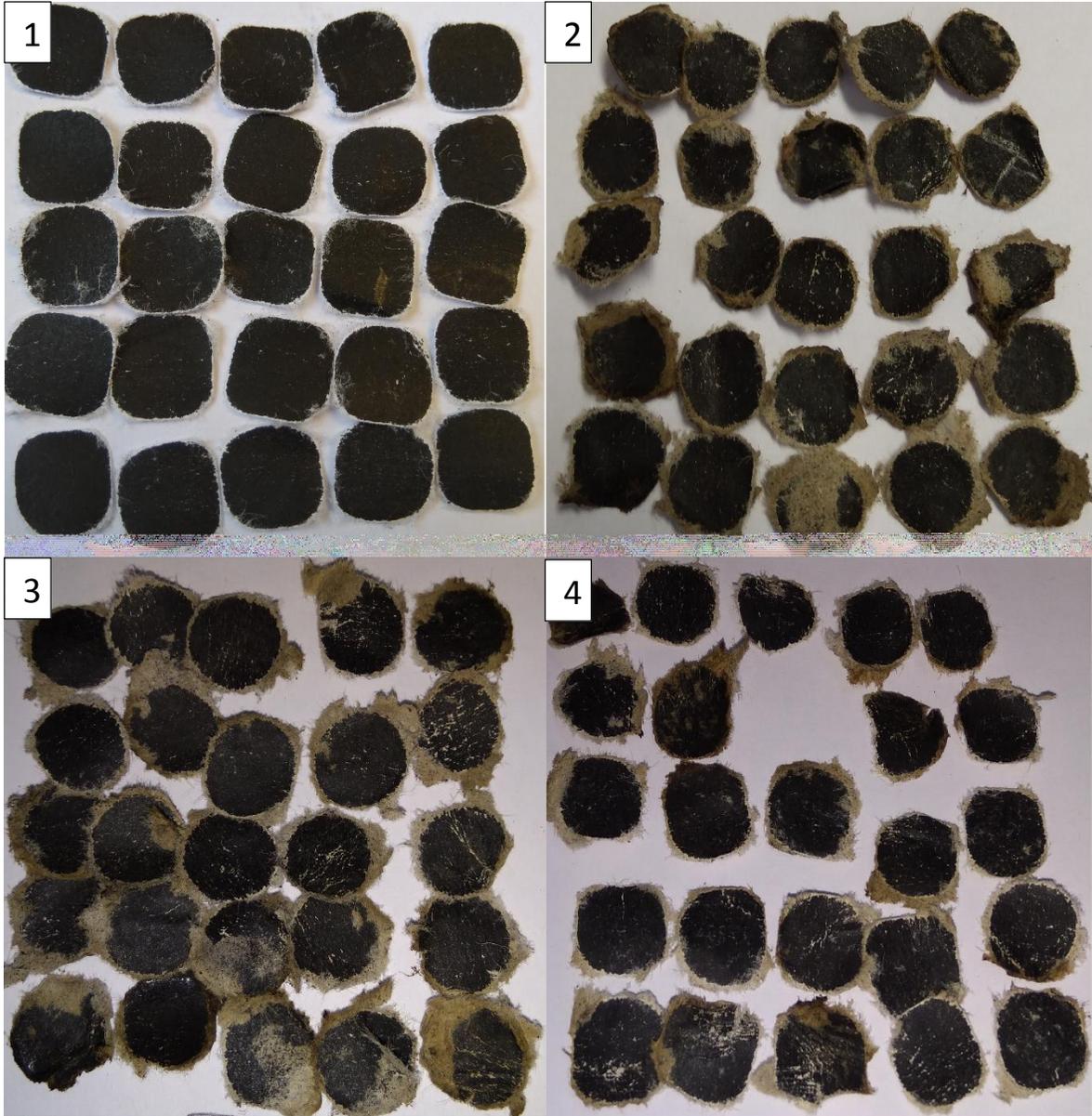


Figura 23. Prueba para la remoción de tinta de impresora láser. 1: Control negativo: agua. 2. Muestra que contenía extracto total del sistema de fermentación después de crecer durante 7 días. 3. Muestra con extracto total con 9 días de crecimiento. 4. Muestra con 13 días de crecimiento.

Tabla 6. Rendimiento con medio a través de los pasos de purificación

Rendimiento con medio	IU/gms	IU totales	Nivel de purificación
Filtrado total	5.71	114.21	1
Fracción 30-60	46.67	933.40	2



Tabla 7 Rendimiento con medio a través de los pasos de purificación

Rendimiento sin medio	IU/gms	IU totales	Nivel de purificación
Filtrado total	3.34	66.98	1
Fracción 60% sulfato de amonio	10.10	202.02	2
Fracción entre 10 y 30 kDa	7.97	159.46	3
Fracción mayor a 30kDa	13.59	271.98	3



8. Discusión

La caracterización bioquímica de las enzimas xilanasas permite ser usada para realizar proyecciones en la industria. De esta forma la búsqueda de enzimas que optimicen las reacciones y entren de manera activa en actividades de interés comercial ayuda al uso de fuentes eficientes dentro de los procesos industriales y elimina compuestos tóxicos que se usan comúnmente para la catálisis de grandes volúmenes de sustrato. La selección de un sustrato de crecimiento para que funcione como matriz del sistema de fermentación en estado sólido tiene que ser el adecuado para que permita la expresión de xilanasas y depende de distintos factores que van íntimamente relacionados al costo y la disponibilidad, y por ello los residuos de materiales lignocelulósicos que se generan en grandes cantidades son

una fuente importante para poder reutilizarlos (Rodríguez-Bustamante *et al.*, 2015). Por lo anterior, se seleccionó al café como sustrato que permitió el crecimiento del hongo *Penicillium* sp. LM-3. Por otra parte debido a que el sustrato (matriz) no necesita un posterior procesamiento y se encuentra en gran abundancia y disponibilidad su utilización es posible producir enzimas con valor agregado de éste productos de desecho.

En cuanto a las pruebas para determinar la actividad de xilanas, Bailey y colaboradores (1992) describieron una prueba que se realizó en 20 laboratorios distintos para determinar y montar una prueba de actividad de xilanasas. Al comparar los diferentes métodos y los diferentes sustratos, observaron que existía en los resultados una desviación estándar de 108 %, pero al estandarizar el método fue posible disminuir la desviación estándar a 17 % y gracias a esto Köning *et al.*, (2002) pudieron realizar la estandarización del método que es el seguido en esta tesis para disminuir lo más posible el sesgo en las diversas pruebas que se realizaron. Los datos obtenidos indican desviaciones estándar pequeñas que van desde 0.04 hasta 0.24 de desviación.

En la prueba de actividad de celulasa no se detectó presencia de enzimas con actividad de celulasa, en la literatura tampoco existe evidencia que exista secreción de enzimas con actividad de celulasa por parte del hongo *Penicillium* sp. LM-3, y en los valores obtenidos durante la realización de esta tesis, los valores en la expresión de celulasas fueron exiguos a comparación de la presencia de actividad de xilanasas lo cual indica un aumento de la cantidad de enzimas en el sistema de fermentación en estado sólido a través del tiempo. En una primera instancia al comparar el crecimiento de los microorganismos: *P.* sp. LM-3 y *P. chrysogenum*, se utilizó medio para que ambos cubrieran sus requerimientos para poder crecer. Posteriormente se comprobó que el hongo *P.* sp. LM-3 creció sin medio y en 13 días colonizó el sustrato de bagazo lo cual indica que el principal alimento del hongo filamentoso son los azúcares complejos que degrada por medio de las enzimas extracelulares que secreta en el sistema de fermentación.

La expresión de enzimas con actividad de xilanasas se monitoreó a través del paso del tiempo en los biorreactores y se analizó la diferencia en la expresión de las enzimas con actividad de xilanasas. En las dos pruebas de crecimiento se puede observar un aumento gradual en la expresión de las enzimas pero en el día 8 (en la prueba con medio) hay una disminución bastante significativa en los dos hongos utilizados, por parte del hongo *P. sp.* LM-3 fue de 67 % y del hongo *P. chrysogenum* del 75 % lo cual podría indicar represión catabólica (figura 24), que puede ser definida como una disminución en la expresión de una enzima específica debido a la presencia de una fuente de carbono asimilable (Wang *et al.*, 1979). También en una réplica de los biorreactores en el día 9 se ve una disminución de casi el 50 % en actividad específica. Se ha documentado que existen diferentes enzimas que se expresan en diferentes organismos, durante diferentes etapas para hidrolizar diferentes azúcares asimilables. Se ha demostrado que los oligosacáridos y monosacáridos son macromoléculas que reprimen la expresión de algunas enzimas (Prade, 1996), y aunque existen enzimas que catalizan la misma reacción su regulación es controlada por un oligosacárido diferente (Wang *et al.*, 1979).

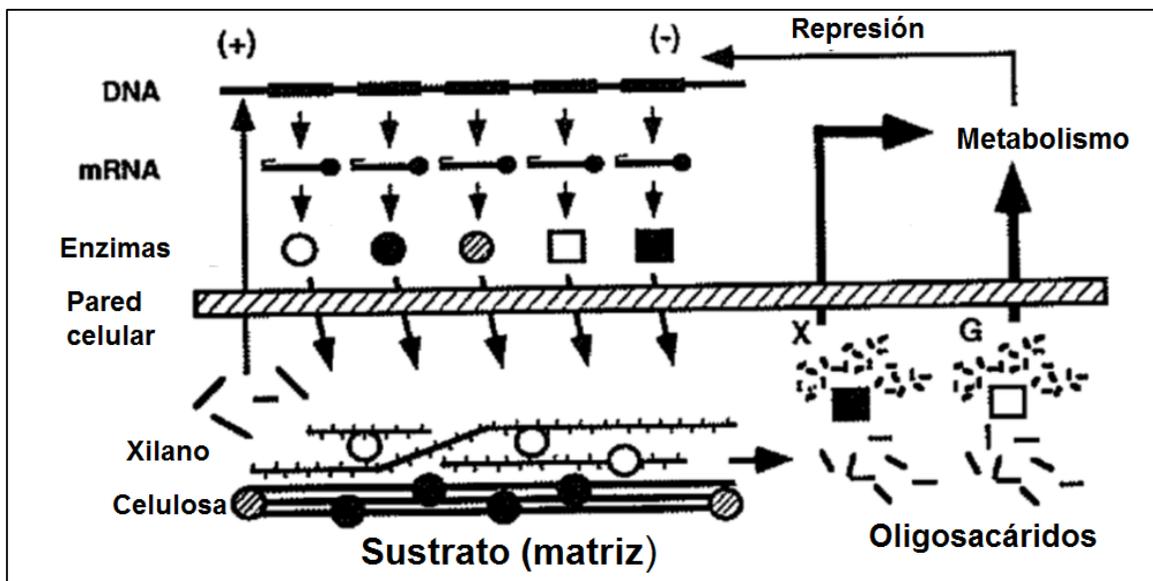


Figura 24. Modelo de expresión de celulasas y xilanasas en microorganismos. La inducción de la transcripción (+) por moléculas específicas presentes en el sustrato de crecimiento y la represión (-) por el exceso intracelular de los sustratos degradados (glucosa o xilosa). Imagen editada de Prade, 1996.

Las enzimas que fueron extraídas del sistema de fermentación tienen propiedades únicas ya que hidrolizan el xilano y posiblemente otro sustrato porque se ha comprobado que existen distintos tipos de xilanasas que tienen la capacidad de hidrolizar otros azúcares complejos (Ferrer, 2006). En las pruebas realizadas no se detectó actividad de celulasa. Esto representa una ventaja ya que las enzimas obtenidas solo hidrolizan un sustrato en específico.

El sustrato que se utilizó tiene compuestos de cafeína y polifenoles que representan un porcentaje muy pequeño, logran tener un impacto en la contaminación de los suelos y terminan muchas veces en afluentes a cuerpos de agua. Después de realizar la extracción de cafeína, el desecho del café aún contiene muchos taninos pero en menor cantidad. Por ello, utilizar el café como sustrato provee ventajas porque es un desecho que está disponible en grandes cantidades y sobre todo porque en el sistema de fermentación se requiere mayoritariamente un pretratamiento para que el sustrato pueda ser digerido fácilmente. Muchas veces se utiliza agua caliente o se muele el sustrato para provocar una mejor digestión, y la ventaja con el desecho del café es que se ahorran estos pretratamientos porque la semilla del café pasa por diversos procesos para tener una mejor extracción de la cafeína. Ello facilita el proceso de digestión en el sistema de fermentación en estado sólido y da una mejora en su utilización de estos residuos (Haltrich *et al.*, 1996; Rodríguez-Bustamante *et al.*, 2015). Cuando han utilizado en la investigación el sustrato de café, al término del proceso de fermentación y degradación enzimática, el bagazo posee menor cantidad de cafeína y taninos, reduciéndolos 10.2 y 20.4% respectivamente, logrando disminuir su impacto en la naturaleza (Leifa *et al.*, 2001).

En las ciudades se han originado recientemente importantes problemas como la contaminación de los suelos. Un método potencial para la bioremediación es la utilización del sistema de fermentación en estado sólido ya que es una tecnología que provee nuevas aplicaciones para el uso de los desechos agroindustriales y que pueden ser enfocados a la producción de: antibióticos y otros metabolitos secundarios, enzimas industriales, alimentos enriquecidos, biocombustibles, ácidos orgánicos, y compuestos aromáticos (Krishna, 2005).

Krishna en 2005 ha mencionado muchas ventajas al utilizar esporas como inóculos pero también indica que las esporas al estar metabólicamente latentes, su fase lag es prolongada y por ello se requieren de grandes cantidades de sustrato para su crecimiento o proveer de un sustrato que de inmediato induzca los sistemas enzimáticos apropiados. Los resultados expresados en IU indican que el café como un sustrato para matriz de crecimiento en el sistema de fermentación en estado sólido es apropiado para el crecimiento de hongos filamentosos.

Los organismos toman ventaja de la diversidad de azúcares que existen en la naturaleza usando oligosacáridos y polisacáridos para una multitud de funciones biológicas que van desde almacenamiento, para formar estructuras o señalización celular especializada. La hidrólisis selectiva de enlaces glicosídicos es crucial para la toma y reutilización de la energía, para la degradación y expansión de paredes celulares y la renovación de moléculas de señalización (Davies y Henrissat, 1995). Por ello se deben producir distintas xilanasas en menor proporción y que no son requeridas por el hongo en grandes cantidades y que son utilizadas para la hidrólisis de residuos que no se encuentran frecuentemente (Wong *et al.*, 1988). Incluso se ha estudiado la regulación de las isoenzimas ya que catalizan la misma reacción pero hay un control represivo por un diferente producto terminal (Wang *et al.*, 1996), y eso puede dar explicación de las distintas proteínas que se van sintetizando y son observadas en el zimograma y en el gel de poliacrilamida a través de los días del crecimiento y se ve una cantidad muy significativa de estas enzimas que tienen diferentes pesos moleculares.

El sustrato de bagazo de café se eligió por su disponibilidad y bajo costo ya que diversos trabajos que han demostrado la productividad de los desechos agroindustriales como por ejemplo el salvado de trigo o de arroz, y así también se ha estudiado su optimización y su enriquecimiento para sintetizar alguna enzima de interés comercial (Ellaiah *et al.*, 2002; Kote *et al.*, 2009; Chapla *et al.*, 2010). Sandhya y colaboradores en el 2005 contrastaron la producción de una enzima con actividad de proteasa entre el sistema de fermentación en estado sólido y en el sistema de fermentación sumergido, en el que se encuentra la matriz completamente embebida en líquido y encontraron que la producción de un hongo

filamentoso fue mayor en el sistema de fermentación sólido lo que corrobora la utilización de este sistema para hongos con crecimiento micelial.

Algo importante dentro del proceso de fermentación y obtención de enzimas es la facilidad que proporciona la extracción de enzimas con agua destilada y hace más eficiente y económico el proceso. Esto pudo ser demostrado por Zhang y Sang (2015) ya que probaron diversas fases móviles para la extracción de enzimas en un sistema de fermentación en estado sólido y usaron *Tween* 80 al 0.1% v/v, amortiguador (Tris-Cl 50mM, pH 8), solución de cloruro de sodio (1% w/w), etanol, una solución de glicerol y agua destilada, siendo esta última la que extraía una mayor concentración de enzimas: xilanasas y β -mananasas de *Penicillium chrysogenum*.

Con varios de los trabajos consultados se elaboró un cuadro comparativo que contiene los diversos materiales utilizados para la producción mayoritariamente de enzimas u otros productos finales como hongos comestibles utilizando el sistema de fermentación en estado sólido con residuos de café. Se compararon las actividades máximas que se reportan en los artículos (tabla 8). Lo que me gustaría resaltar es el tiempo en que se obtuvieron los registros de la mayor actividad, ya que varían de 24 a 168 horas para la producción de enzimas o hasta 20 días para la producción de hongos comestibles. Las actividades máximas reportadas también son bastante heterogéneas y algunos autores reportan en IU por gramo del residuo que se usó y otros solamente indican las IU totales. Todo esto muestra el problema para medir la actividad de las enzimas que hidrolizan grandes cadenas de azúcares. Tabla 8. Tipos de productos obtenidos mediante la fermentación con diferentes organismos.

Las enzimas con propiedades de glicosil-hidrolasas son las piezas necesarias para el proceso de limpieza de grandes y útiles recursos renovables (Henrissat *et al.*, 2004). Por ejemplo, en el proceso químico del tratamiento del papel, las fibras de celulosa son separadas de otras fibras al solubilizar y modificar la lignina, por ello se requiere de un blanqueado para remover la lignina condensada y así el papel pueda tener el brillo requerido (Onysko, 1993).

El uso de las xilanasas en el papel ha aumentado debido a que no poseen

Producto	Organismo	Sustrato usado en el crecimiento	Tipo de fermentación	Tiempo obtención de máx. U/g	Máxima actividad	Referencia
α -amilasa	<i>Bacillus coagulans</i>	trigo	sólido	96 h	6700 U	Babu y Satyanarayana, 1995
xilanasas	<i>Aspergillus foetidus</i> MTCC	agroresiduos	sólido	7 días	8450 U/g	Chapla <i>et al.</i> , 2010
xilanasas	Bacillus sp. CKBx1D	cáscara de trigo	sumergido	36h	473U/mL	Maity <i>et al.</i> , 2012
xilanasas	<i>Bacillus licheniforme</i> 799	cáscara de trigo	sólido	72 h	17.1 U/g	Achana y Satyanarayana, 1997
xilanasas y mananasas	<i>Penicillium chrysogenum</i> QML-2	Rastrojo de maíz y cáscara de trigo	sólido	144 horas	19613 U/g xilanasas 928 U/g mananasas	Zhan y Sang, 2015
endoglucanasa	<i>Trichoderma harzianum</i> HZN11	medio enriquecido	sólido	7 días	662.5 U/g	Bagewadi <i>et al.</i> , 2016
glucoamilasa	<i>Aspergillus</i> sp.	agroresiduos	sólido	120h	247 U/g	Ellaiah y Srinivasulu, 2002
pectinasas	<i>Aspergillus niger</i>	cáscara de trigo	sólido	22h	*	Castilho <i>et al.</i> , 2000
proteasas	<i>Aspergillus oryzae</i>	agroresiduos	sumergido/sólido	72 h	31.2 U/g	Sandhya <i>et al.</i> , 2005
mananasas	<i>Aspergillus niger</i> gr y <i>Aspergillus flavus</i>	torta de copra	sumergido	5 días	40U/mL y 33U/mL	Kote <i>et al.</i> , 2009
mananasas	<i>Aspergillus niger</i> FTCC 5003	agroresiduos de la extracción del aceite de palma	sólido	7 días	2231 U/g	Abdeshahian <i>et al.</i> , 2010
lipasas	<i>Penicillium restrictum</i>	agroresiduos de palma babasu	sumergido	24 horas	30.3 U/g	Gombert <i>et al.</i> , 1999
setas	<i>Flammulina</i>	Cascarilla de café	sólido	20 días	*	Leifa <i>et al.</i> , 2001

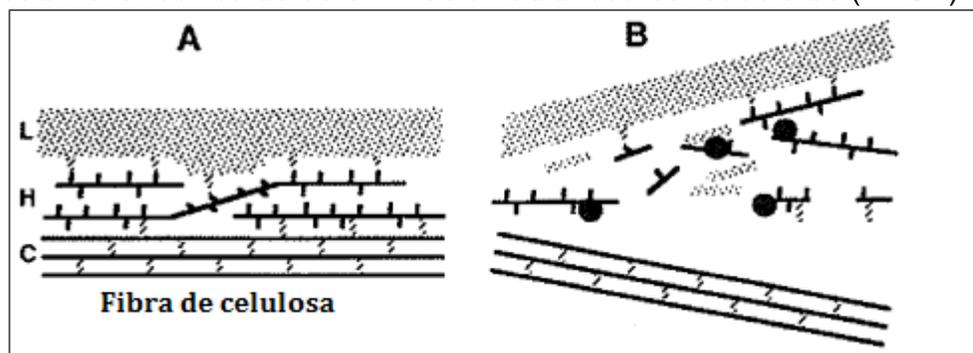
actividad de celulasa, lo que permite mantener las fibras de celulosa y desprender la hemicelulosa que está atada covalentemente con la lignina (Fig. 25). Aunque las xilanasas son enzimas importantes gracias a las múltiples aplicaciones en las que son utilizadas, están limitadas por la baja cantidad que se obtiene de ellas y altos costos para su producción (Zhang *et al.*, 2014). El sistema de fermentación en estado sólido con residuos del café demostró ser una buena herramienta para la transformación de residuos agroindustriales, por medio del hongo *Penicillium* sp. LM-3 en productos de valor agregado. En la tabla de rendimientos (tabla 6) se puede

apreciar el incremento de la actividad conforme se fue purificando ya que con medio de cultivo nutritivo se tuvo un incremento de 114 IU totales por 933 obtenidos después de la precipitación con sulfato de amonio y representan más de 8 veces el nivel producido, mientras que el cultivo sin medio (tabla 7) al finalizar la purificación parcial fue de 66 IU totales a 271 lo cual indica un rendimiento de más de 4 veces de la actividad obtenida.

Figura 25. A Diagrama de fibras del material vegetal. C celulosa, H, hemicelulosa. L, lignina. B imagen representando la separación de la celulosa de la hemicelulosa con la lignina. Editada de Prade (1996).

9. Conclusión

Se logró cultivar el hongo *Penicillium* sp. LM-3 en café por medio del sistema de fermentación en estado sólido con 60 % de humedad y al finalizar los diferentes tiempos fueron extraídas enzimas en diversos lotes que contenían actividad xilanólica, con H₂O destilada como solvente. Se comprobó la actividad de estos lotes mediante la técnica de determinación de azúcares reductores (DNSA). Con el



sustrato del bagazo de café, se puede concluir que no es buen medio para la generación de enzimas con actividad de celulasa, pero es fuente primaria para la generación de enzimas con actividad xilanólica, lo que tiene potencial biotecnológico. A su vez el bagazo de café se convierte en un sustrato aprovechable que se encuentra disponible en grandes cantidades, es económico al ser un desecho agroindustrial y permite generar diversas enzimas extracelulares que son importantes en distintas industrias.

Al comparar las gráficas donde se muestra la presencia de las enzimas xilanolíticas durante el crecimiento del hongo a través del tiempo, resulta importante

señalar que la mayor actividad xilanolítica fue obtenida sin medio SNM lo cual facilita que sea un proceso económico y posible para su producción.

Las muestras fueron precipitadas con sulfato de amonio en 3 fracciones pero la que tuvo mayor actividad se encontró en la fracción con 60 % de saturación de la sal. La actividad más alta se registra en el lote que tiene > 30 KDa. Aunque entre 10 y 30 KDa la actividad también es elevada pero no comparable. Después de dos años a 0° C las actividades disminuyeron a la mitad, esto indica una degradación de las enzimas a través del tiempo.

Se determinó que la masa molecular de las enzimas se encuentra entre 50 y 20 KDa.

Las pruebas que se realizaron con el papel impreso demostraron cualitativamente su potencial biotecnológico en la limpieza del papel con tinta láser y resulta una opción que puede ayudar a disminuir químicos peligrosos para el ambiente.

10. Perspectivas

Un tema importante para el estudio de la utilización de la enzima a nivel industrial es útil pero mayores pruebas se tendrán que realizar para poder influir con la enzima en los procesos que lleva a cabo el papel para su reciclaje o limpieza de la pulpa. Otro importante y valioso estudio sería determinar los metabolitos que secretan los hongos filamentosos en el sistema de fermentación en estado sólido para determinar su posible potencial en el área médica.

11. Literatura citada

Abdeshahian P., N. Samat, A. A. Hamid, W. M. W. Yusoff. 2010. Utilization of palm kernel cake for production of β -mannanase by *Aspergillus niger* FTCC 5003 in solid substrate fermentation using an aerated column bioreactor. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 37: 103-109.

Achana A., y T. Satyanarayana. 1997. Xylanase production by thermophilic *Bacillus licheniformis* 799 in solid state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 1: 12-17.

- Akash B. 2015. Thermochemical depolymerization of biomass. *Procedia Computer Science*, 52: 827-834.
- Arredondo-Vega B. O., y D. Voltolina. 2007. Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento. Pp: 21-29, en: Arredondo-Vega B. O., y D. Voltolina (eds.). Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste, La Paz, B. C. S., México.
- Babu K. R., y T. Satyanarayana. 1995. α -Amylase production by thermophilic *Bacillus coagulans* in solid state fermentation. *Process Biochemistry*, 30: 305-309.
- Bagewadi Z. K., S. I. Mulla y H. Z. Ninnekar. 2016. Purification and characterization of endo β -1, 4-D-Glucanase from *Trichoderma harzianum* strain HZN11 and its application in production of bioethanol from sweet sorghum bagasse. *Journal of Biotechnology*, 101.
- Bailey M. J., P. Biely y K. Poutanen. 1992. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *Journal of Biotechnology*, 3: 257-270.
- Bajpai P. 2008. Application of enzymes in the pulp and paper industry. *Biotechnology Progress*, 2.
- Battan B., S. S. Dhiman, S. Ahlawat, R. Mahajan y J. Sharma. 2012. Application of thermostable xylanase of *Bacillus pumilus* in textile processing. *Indian Journal of Microbiology*, 52: 222-229.
- Bott R. 2004. Analyzing three-dimensional structures of variant enzymes. Pp. 35-57, en: Svendsen A. (ed.). Enzyme Functionality: Design, Engineering, and Analysis. *Marcel Dekker*, Nueva York.
- Brady N. C., y R. R. Weil. 2008. The nature and properties of soils. *Pearson*. Nueva Jersey. 14^a edición.
- Bull A. T., A. W. Bunch y G. K. Robinson. 1999. Biocatalysts for clean industrial products and processes. *Current Opinion in Microbiology*, 2: 246-251.

- Carlile M. J., S. C. Watkinson y G. W. Gooday. 2001. The fungi. *Academic Press*. Londres. 2ª edición.
- Castilho L., R. A. Medronho, T. V. Moitinho-Alves. 2000. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, 71: 45-50.
- Chapla D., J. Divecha, D. Madamwar y A. Shah. 2010. Utilization of agro-industrial waste for xylanase production by *Aspergillus foetidus* MTCC 4898 under solid state fermentation and its application in saccharification. *Biochemical Engineering Journal*, 49: 361-369.
- Chávez R., P. Bull y J. Eyzaguirre. 2006. The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium*. *Journal of Biotechnology*, 123: 413-433.
- CNICP, Cámara Nacional de la Industria de la Celulosa y el Papel. 2018. Plan de manejo para los residuos de papel y cartón en México. En: <www.camaradelpapel.mx/plan-de-manejo-para-los-residuos-de-papel-y-carton-en-mexico>. Consultado el 9 de enero de 2018.
- Collins T., C. Gerday y G. Feller. 2005. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanase. *Microbiology Reviews*, 29: 3-23.
- Copeland R. A. 1996. Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis. *Wiley-VCH*. Nueva York.
- Creighton T. E. 1993. Proteins: structures and molecular properties. *W. H. Freeman and Company*, Nueva York. 2ª edición.
- Davies G. y B. Henrissat. 1995. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, 3: 853-859.
- Dawson R. M. C., D. C. Elliott, W. H. Elliot y K. M. Jones (eds.). 1979. Data for biochemical research. *Oxford University Press*, Oxford. 2ª edición.
- Deacon J. W. 2006. Fungal biology. *Blackwell Publishing*. Edinburgh. 4ª edición.

- Deesukon W., Y. Nishimura, N. Harada, T. Sakamoto y W. Sukhumsirichart. 2011. Purification, characterization and gene cloning of two forms of a thermostable endo-xylanase from *Streptomyces* sp. SWU10. *Process Biochemistry*, 46: 2255-2262.
- Devlyn T. 2006. Bioquímica: libro de texto con aplicaciones clínicas. *Reverté*. Barcelona, 109-130.
- Eda S., A. Ohnishi y K. Kato. 1976. Xylan isolated from the stalk of *Nicotiana tabacum*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 40: 359-364.
- Ellaiah P., y B. Srinivasulu. 2002. Optimization of process parameters for glucoamylase production under solid state fermentation by a newly isolated *Aspergillus* species. *Process Biochemistry*, 4: 615-620.
- Ferrer S. 2006. Estudio teórico de mecanismos de reacciones enzimáticas con transferencia de hidrógeno: Lactato deshidrogenasa. Tesis de doctorado. Instituto de Ciencia Molecular. Universidad de Valencia.
- Garrity G. M., y J. Hunter-Cevera. 1999. Bioprospecting in the developing world. *Current Opinion in Microbiology*, 2: 236-240.
- Gombert A. K., A. L. Pinto, L. R. Castilho y D. M. G. Freire. 1999. Lipase production by *penicillium restrictum* in solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate. *Process Biochemistry*, 35: 85-90.
- Haider K., y A. Schäffer. 2009. Soil Biochemistry. *CRC Press*. Nueva York.
- Hall D. O., J. Coombs y I. J. Higgins. 1988. Energy and biotechnology. Pp. 24-72, en: Higgins I. J., D. J. Best y J. Jones (eds.). *Biotechnology. Blackwell Scientific Publications*. Oxford. 2ª edición.
- Haltrich D., B. Nidetzky, K. D. Kulbe, W. Steiner y S. Zupancic. 1996. Production of fungal xylanases. *Bioresource Technology*, 58: 137-161.
- Henrissat B., M. Claeysens, P. Tomme, L. Lemesle y J. -P. Mornon. 1989. Cellulase families revealed by hydrophobic cluster analysis. *Gene*, 81: 83-95.

- Henrissat B., y P. M. Coutinho. 2001. Classification of glycoside hydrolases and glycosyltransferases from hyperthermophiles. *Methods in Enzymology*, 330: 183-201.
- Henrissat B., E. Deleury, P. M. Coutinho y G. J. Davies. 2004. Sequence families and modular organization of carbohydrate-active enzymes. Pp. 15-31, en: Svendsen A. (ed.) *Enzyme Functionality: Design, Engineering, and Analysis*. *Marcel Dekker*, Nueva York.
- Higgins I. J. 1988. What is biotechnology? Pp. 1-23, en: Higgins I. J., D. J. Best y J. Jones (eds.). *Biotechnology*. *Blackwell Scientific Publications*. Oxford. 2ª edición.
- ICO, International Coffee Organization. 2018. Datos de la producción y consumo a nivel mundial. En: <www.ico.org/new_historical.asp?section=Statistics>. Consultado el 28 de noviembre de 2018.
- IUBMB, International Union of Biochemistry and Molecular Biology. 2019. Comisión internacional de nomenclatura. En: <<https://iubmb.org>>. Consultado el 09/06/2019.
- Ibarra D., M. C. Monte, A. Blanco, A. T. Martínez y M. J. Martínez. 2012. Enzymatic deinking of secondary fibers. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 39: 1-9.
- Juodeikiene G., L. Basinkiene, D. Vidmantiene, T. Makaravicius y E. Bartkiene 2012. Benefits of β -xylanase for wheat biomass conversion to bioethanol. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92: 84-91.
- König J., R. Grasser, H. Pikor y K. Vogel. 2002. Determination of xylanase, β -glucanase, and cellulose activity. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 374: 80-87.
- Kote N. V., A. G. G. Patil, V. H. Mulimani. 2009. Optimization of the production of thermostable endo- β -1, 4 mannanases from newly isolated *Aspergillus niger*

- gr* and *Aspergillus flavus* *gr*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 152: 213-223.
- Krishna C. 2005. Solid-state fermentation system: an overview. *Critical Reviews in Biotechnology*, 25: 1-30.
- Kulkarni N., A. Shendye y M. Rao. 1999. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiology reviews*, 23: 411-456.
- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 5259: 680-685.
- Lee C. K., D. Ibrahim y I. C. Omar. 2013. Enzymatic deinking of various types of waste paper: Efficiency and characteristics. *Process Biochemistry*, 48: 299-305.
- Lee Y., S. E. Lowe y G. Zeikus. 1993. Regulation and characterization of xylanolytic enzymes of *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* B6A-RI. *Applied and Environmental Microbiology*, 3: 763-771.
- Leifa F., A. Pandey y C. R. Soccol. 2001. Production of *Flammulina velutipes* on coffee husk and coffee spent-ground. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **44** (2).
- Li K., P. Azadi, R. Collins, J. Tolan, J. S. Kim y K. L. Eriksson. 2000. Relationships between activities of xylanases and xylan structures. *Enzyme and Microbial Technology*, 27: 89-94.
- Lombard V., H. Golaconda Ramulu, E. Drula, P. M. Coutinho y B. Henrissat. 2014. The Carbohydrate Active Enzymes database. En: <<http://www.cazy.org/>>. Consultado el 02 de diciembre de 2018.
- López-Munguía C. A. 2004. Casos exitosos de la tecnología enzimática y la biocatálisis en México. Pp. 429-450, en: Bolívar-Zapata F. G. (Comp., ed.). Fundamentos y casos exitosos en la biotecnología moderna. *El Colegio Nacional*, México.

- Maheshwari R. 2005. Fungi: experimental methods in biology. *CRC Press*. Nueva York. Pp 3-61.
- Maity C., K. Ghosh, S. K. Halder, A. Jana, A. Adak, P. K. Mohapatra, B. R. Pati y K. C. Mondal. 2012. Xylanase isozymes from the newly isolated *Bacillus* sp. CKBx1D and optimization of its deinking potentiality. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167: 1208-1219.
- Marrs B., S. Delagrave y D. Murphy. 1999. Novel approaches for discovering industrial enzymes. *Current Opinion in Microbiology*, 2: 241-245.
- Martínez-Correa A. D. 2016. Purificación y caracterización parcial de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) de músculo esquelético de *Gallus gallus domesticus*. Tesis profesional de licenciatura, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- McCarter J. D., y S. G. Withers. 1994. Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Current Opinion in Structural Biology*, 4: 885-892.
- McMurry J. 1994. Química orgánica. *Grupo Editorial Iberoamérica*. 3ª edición. Pp. 1011-1049.
- Medeiros R. G., R. Hanada y E. X. F. Filho. 2003. Production of xylan-degrading enzymes from Amazon forest fungal species. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 52: 97-100.
- Miller G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31: 426-428.
- Murray R. K., P. A. Mayes, D. K. Granner y V. W. Rodwell. 2001. Bioquímica de Harper. *El Manual Moderno*. 15ª edición. Pp. 55-70.
- Nair S. G., R. Sindhu y S. Shashidhar. 2010. Enzymatic bleaching of kraft pulp by xylanase from *Aspergillus sydowii* SBS 45. *Indian Journal of Microbiology*, 50: 332-338.

- Nannipieri P., J. Asher, L. Landi, G. Pietramellara y G. Renella. 2003. Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science*, 54: 655-670.
- Nelson D. L., M. M. Cox y C. M. Cuchillo. 2005. Principios de bioquímica. *Omega*. 4ª edición. Pp.45-205.
- Onysko K. A. 1993. Biological bleaching of chemical pulps: a review. *Biotechnology Advances*, 11: 179-198.
- Pacheco D. 2004. Bioquímica médica. *Limusa*. México. Pp. 90-98.
- Padmapriya R., J. A. Tharian y T. Thirunalasundari. 2013. Coffee waste management: an overview. *International Journal of Current Science*, 9:83-91.
- Pandey A., C. R. Soccol, P. Nigam, D. Brand, R. Mohan, S. Roussos. 2000. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal*, 6: 153-162.
- Pandey A. 2003. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13: 81-84.
- Pell G., E. J. Taylor, T. M. Gloster, J. P. Turkenburg, C. M. G. A. Fontes, L. M. A. Ferreira, T. Nagy, S. J. Clark, G. J. Davies y H. J. Gilbert. 2004. The mechanisms by which family 10 glycoside hydrolases bind decorated substrates. *The Journal of Biological Chemistry*, 279; 9597-9605.
- Prade R. A. 1996. Xylanases: from Biology to Biotechnology. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 13: 101-132.
- Qiu Z., P. Shi, H. Luo, Y. Yuan, P. Yang, S. Liu y B. Yao. 2010. A xylanase with broad pH and temperature adaptability from *Streptomyces megasporus* DSM 41476, and its potential application in brewing industry. *Enzyme and Microbial Technology*, 46: 506-512.
- Ray C. S., y S. G. Withers. 2000. Glycoside mechanisms. *Current Opinion in Chemical Biology*, 4: 573-580.

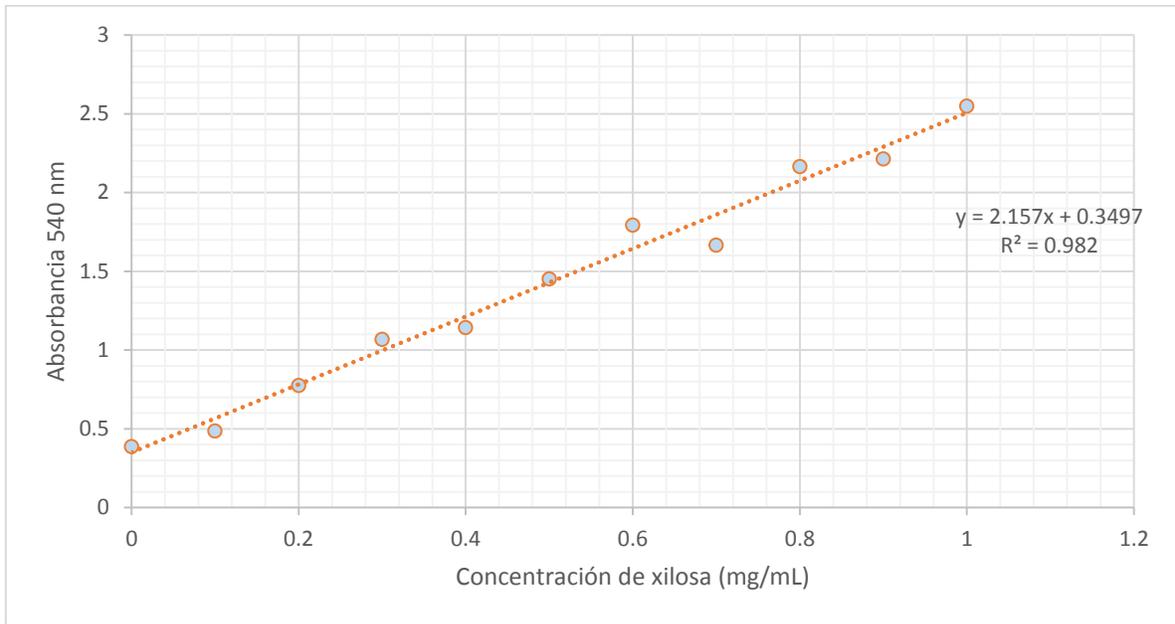
- Rodríguez-Bustamante E., G. A. Juárez-Zúñiga, S. J. Carreto-Castro y R. Arreguín-Espinosa. 2015. Uso de un residuo agroindustrial, obtenido del bagazo de café, para la producción de enzimas hidrolíticas, en: Memorias del sexto seminario internacional de ex-becarios de Alemania. Ingeniería Verde. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Rodríguez-Bustamante E., E. Rodríguez-Flores, F. Rojas-García, A. S. Callejas-Iberri, L. M. Gallardo-Roldán, S. Gómez-Manzo, J. Marcial-Quino, M. L. Macías-Rubalcava, F. Lazcano-Pérez y R. Arreguín-Espinosa. 2016. Pool of biological resources for potential applications in solid state fermentation obtained from a forest plantation of *Pinus pseudostrobus* Lindl, Mexico. *Advances in Microbiology*, 6: 1021-1039.
- Sandhya C., A. Sumantha, G. Szakacs y A. Pandey. 2005. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, 8: 2689-2694.
- Saxena A., y P. S. Chauhan. 2017. Role of various enzymes for deinking paper: a review, *Critical Reviews in Biotechnology*, 37: 598-612.
- Scragg A. 2004. Environmental Biotechnology. *Oxford University Press*. Londres.
- SEMARNAT, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. 2008. Compendio de Estadísticas Ambientales. México. En: <www.semarnat.gob.mx>. Consultado el 28 de noviembre de 2018.
- Shah A. R., R. K. Shah y D. Madamwar. 2006. Improvement of the quality of whole wheat bread by supplementation of xylanase from *Aspergillus foetidus*. *Bioresource Technology*, 97: 2047-2053.
- Shallom D., y Y. Shoham. 2003. Microbial hemicellulases. *Current Opinion in Microbiology*, 6: 219-228.
- Singh nee' Nigam P., y A. Pandey. 2009. Solid state fermentation technology for bioconversion of biomass and agricultural residues. *Springer Science*. Pp. 197-220.

- Sunna A., y G. Antranikian. 1997. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*, 17: 39-67.
- Teijón J. M. 2006. Fundamentos de química estructural. *Tebar*. Madrid. 2ª edición. Pp. 60-75.
- Timell T. E. 1964. Wood hemicelluloses: part I. *Advances in Carbohydrate Chemistry*, 19: 247-302.
- Tovar-Herrera O. E. 2013. Evaluación de un material lignocelulósico para la producción de celulasas, xilanasas y lacasas por basidiomicetos del noreste de México. Tesis de maestría en ciencias, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Visagie C. M., J. Houbraken, J. C. Frisvad, S. B. Hong, C. H. W. Klaassen, G. Perrone, K. A. Seifert, J. Varga, T. Yaguchi y R. A. Samson. 2014. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Mycology*, 78: 343-371.
- Voet D., y J. G. Voet. 2006. Bioquímica. *Médica Panamericana*. Buenos Aires. 3ª edición.
- Walter J. M. 2002. SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. Pp. 61-68, en: Walter J. M. (ed.). The protein protocols handbook. *Humana Press*. Nueva Jersey. 2ª edición.
- Wang D. I. C., C. L. Cooney, A. L. Demain, P. Dunill, A. E. Humphrey y M. D. Lilly. 1979. Coordination of microbial metabolism. Pp. 1-13, en: Fermentation end enzyme technology. *John Wiley & Sons*. N.Y.
- Wang G., X. Huang, T. B. Ng, J. Lin y X. Y. Ye. 2014. High phylogenetic diversity of glycosyl hydrolase family 10 and 11. Xylanases in the sediment of lake Dabusu in China. *Plos One*, 11.
- Webster J., y R. W. S. Weber. 2007. Introduction of fungi. *Cambridge University Press*. Nueva York. 3ª edición.

- Withers S., y S. Williams. 2018. Glycoside hydrolases. En: <http://www.cazypedia.org/index.php/Glycoside_hydrolases>. Consultado el 2 de diciembre de 2018.
- Wong K. K. Y., L. U. L. Tan y J. N. Saddler. 1988. Multiplicity of β -1, 4-xylanase in microorganisms: functions and applications. *Microbiological Reviews*, 52: 305-317.
- Xu Z. H., Y. L. Bail, X. Xu, J. S. Shi y W. I. Tao. 2005. Production of alkali-tolerant cellulase-free xylanase by *Pseudomonas* sp. UN024 with wheat bran as the main substrate. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21: 233-243.
- Zhang H., y Q. Sang. 2015. Production and extraction optimization of xylanase and β -mannanase by *Penicillium chrysogenum* QML-2 and primary application in saccharification of corn cob. *Biochemical Engineering Journal*, 97: 101-110.
- Zhang Z., J-L. Liu, J-Y. Lan, C-J. Duan, Q-S. Ma y J-X. Feng. 2014. Predominance of *Trichoderma* and *Penicillium* in cellulolytic aerobic filamentous fungi from subtropical and tropical forest in China, and their use in finding highly efficient β -glucosidase. *Biotechnology for Biofuels*, 7.
- Zorn H., S. Langhoff, M. Scheibner, y R. G. Berger. 2003. Cleavage of carotene by fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62: 331-336.

Anexos

Tabla. Curva patrón promedio (azúcares reductores)



Concentración	Absorbancia a 540 nm	Concentración	Absorbancia
0	0.387	0.5	1.392
0	0.389	0.6	1.839
0.1	0.492	0.6	1.75
0.1	0.483	0.7	1.696
0.2	0.777	0.7	1.638
0.2	0.776	0.8	1.998
0.3	1.098	0.8	2.333
0.3	1.041	0.9	2.114
0.4	1.039	0.9	2.315
0.4	1.25	1	2.528
0.5	1.515	1	2.571

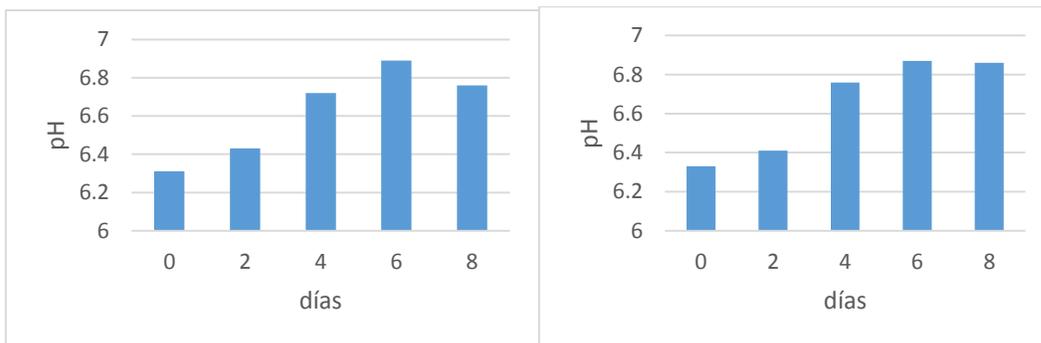


Figura Valores de pH en los sistemas de fermentación en estado sólido con medio durante los primeros 8 días.