
ANÁLISIS DE LOS SISTEMAS BIOCATALÍTICOS DE UN CONSORCIO MICROBIANO NATIVO INVOLUCRADOS EN LA DEGRADACIÓN DEL PERICARPIO DE MAÍZ

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO
PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS EN MANEJO DE
RECURSOS NATURALES TROPICALES**

POR:

**Ingeniero Ambiental
Maritza Anahí García González**

**Directores:
Dra. Mónica Noel Sánchez González
M. en C. Araceli González Burgos**

Mérida, Yuc., México, Noviembre del 2017



POSGRADO INSTITUCIONAL
CIENCIAS AGROPECUARIAS Y MANEJO
DE RECURSOS NATURALES TROPICALES

**POSGRADO INSTITUCIONAL EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y
MANEJO DE RECURSOS NATURALES TROPICALES**

**ALUMNA: INGENIERA AMBIENTAL
MARITZA ANAHÍ GARCÍA GONZÁLEZ**

SÍNODO DEL EXAMEN DE TESIS DE GRADO

**DRA. DIANA CABAÑAS VARGAS
FIQ-UADY**

**DR. ALEJANDRO ZEPEDA PEDREGUERA
FIQ-UADY**

**DR. RAFAEL ROJAS HERRERA
FIQ-UADY**

**DR. ARTURO CASTELLANOS RUELAS
FIQ-UADY**

**DR. ANGEL CAAMAL LEY
CIR-HIDEYO NOGUCHI**

MÉRIDA, YUCATÁN, NOVIEMBRE DEL 2017

Declaratoria de Originalidad

“El presente trabajo no ha sido aceptado o empleado para el otorgamiento de título o grado diferente o adicional al actual. La tesis es resultado de las investigaciones del autor, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas. El autor otorga su consentimiento a la UADY para la reproducción del documento con el fin del intercambio bibliotecario siempre y cuando se indique la fuente”.

Dedicatoria y Agradecimientos

Este trabajo está dedicado a mi familia por ayudarme a superarme cada día y a seguir mis sueños, a mi padre Patricio García Ayala por siempre enseñarme que debo dar lo mejor de mí; a mi madre María Engracia González Sánchez que con su amor, dulzura y paciencia me ha ensañado la humildad, el respeto y la lucha por siempre ser mejor; a mi hermano Patricio por siempre regañarme cuando era necesario y darme lecciones de madurez y fuerza en los momentos que sentía no dar para más.

Mi gratitud a mis asesoras a la Dra. Mónica Noel Sánchez González por su comprensión, sus enseñanzas y por su confianza, es una persona que ha marcado grandemente mi vida y siempre la tendré presente; a la M en C Araceli González Burgos por su paciencia, sus conocimientos y aportaciones que hizo al proyecto y a mi crecimiento académico, mi más sincera gratitud y respeto para ustedes.

Le agradezco a Carlita y a Erick encargados del laboratorio que sin su ayuda no hubiese podido realizar los experimentos que se prolongaban más de lo esperado. A mis compañeros que me apoyaron en cada una de las etapas del proyecto al I.B.Luis, M. en C. Germán, I.B. Martin, Dr. Mukthar y Oswaldo, quienes siempre me ofrecieron su ayuda, conocimientos y momentos muy divertidos, los voy a llevar siempre en mis recuerdos y tendrán mi eterna gratitud.

A los miembros del sínodo que se comprometieron y enriquecieron en gran medida el proyecto

A CONACYT por el apoyo económico prestado a mi persona para poder realizar mis estudios.

Resumen

Los residuos agroindustriales, debido a que están compuestos por lignocelulosa (celulosa, hemicelulosa y lignina), pueden ser utilizados como materia prima para la producción de combustibles. Desafortunadamente, su estructura es compleja y por lo tanto su degradación es particularmente complicada. Aunque los procesos de degradación biológica constituyen una opción para el procesamiento de estos materiales, hasta el momento no se ha logrado incrementar su eficiencia. Entre las razones que originan este problema se encuentra el que se requiere un gran número de enzimas para la hidrólisis de estos residuos y se desconocen los mecanismos utilizados para tal fin. Esta falta de información ocasiona que se empleen altas cargas de enzimas lo cual eleva los costos de producción.

Los consorcios microbianos son comunidades de microorganismos en donde las poblaciones interactúan para lograr un fin común. Generalmente producen un arsenal enzimático por lo que son utilizados para la degradación de sustratos complejos como la lignocelulosa.

En el presente trabajo se evaluó el proceso de degradación realizado por el consorcio nativo MP-06 sobre pericarpio de maíz nixtamalizado. Se evaluó la producción de actividades enzimáticas, el perfil químico de los componentes principales y la determinación de la estructura taxonómica del consorcio MP-06 durante el proceso de degradación. Se determinó la producción en mayor proporción de α -amilasas (847 U/g de residuo), seguido por las endo-xilanasas (484 U/g de residuo), mientras que las endo-glucanasas presentaron una menor actividad (208 U/g de residuo). Por lo que respecta a las xilanasas, además de las endo, se identificaron α -L-arabinofuranosidasas y β -xilosidasas, ambas enzimas producidas en baja proporción. Por lo que respecta a las celulasas, se identificó a enzimas con actividad, endo-glucanasa, exo-glucanasa y β -glucosidasas, estas dos últimas actividades en menor proporción respecto a la endo. Todas las enzimas fueron producidas en las primeras 24 horas, pero los niveles de producción variaron a lo largo del tiempo. En términos generales se encontró que en los días 3-5 se presentó la mayor producción de celulosas, mientras que las xilanasas presentan su mayor producción en los días 4-7 del proceso de degradación. Los perfiles de producción enzimática y de degradación de los componentes del pericarpio, indican que en las primeras 24 las enzimas se encargan de solubilizar y separar una gran porción de celulosa y hemicelulosa. Posteriormente los azúcares solubles son hidrolizados y los productos actúan como señales para la inducción de la síntesis de una mayor diversidad y cantidad de enzimas.

El género más abundante en el consorcio fue *Paenibacillus*.

Los resultados obtenidos en este trabajo abren la posibilidad de realizar nuevas investigaciones para la determinación del mecanismo de acción de las enzimas en

la degradación de lignocelulosa y ofrecer una alternativa viable para el aprovechamiento de estos residuos.

Summary

Agroindustrial residues are composed by lignocellulose (cellulose, hemicellulose and lignin), and can be used as starting material for the production of fuels. Unfortunately, the complex structure of lignocellulose makes difficult the degradation process. Although the biological degradation is an option for the processing of these materials, until now the commercial enzymatic extracts are not as efficient as the chemical methods. This is mainly because in the degradation of lignocellulose a diversity of enzymes is needed and the mechanism used by these enzymes to hydrolyze the substrate is unknown. In order to increase the efficiency, a high load of enzymatic extracts is used; however this strategy also increases the budget.

Microbial consortia are communities where microorganisms interact with each other for common benefits. Generally are used for the degradation of complex substrates, like lignocellulose, because synthesize a great diversity of enzymes. In this study, it was found that the consortium PM-06 achieved the degradation of 61 % of the pericarp produced by the nixtamalization industry. α -Amylase was the highest enzymatic activity synthesized (847 U/g of residue), followed by β -endo-xylanase (484 U/g of residue), while endo-glucanases presented a lower activity (208 U/g of pericarp). Besides endo-xylanases, α -L-arabinofuranosidases and β -xylosidases were detected but in lower proportion. Cellulose degrading enzymes also included, exo and β -glucosidases activities, but these enzymes were present in lower proportion than the endo-glucanases. Although all the enzymes were synthesized during the first 24 h, the production levels were variable during degradation. While the highest production of cellulases was obtained between 3-5 days, the xylanases were obtained between 4-7 days.

The profile for the enzyme production and pericarp components degradation indicated that in 24 h a great amount of cellulose and hemicellulose was separated and solubilized. These soluble components were further hydrolyzed and the products worked as signals for the induction of enzymes in different periods of time during degradation.

Metagenomic analysis indicated that the most abundant bacteria genera in the consortium was *Paenibacillus*.

The results obtained in this work create the possibility of conducting new research to determine the mechanism of action of the enzymes for the degradation of lignocellulose and offer a viable alternative for the use of these residues.

Índice General

| | |
|---|----|
| I. Introducción general | 11 |
| II. Marco Teórico..... | 13 |
| 2.1. Biomasa lignocelulósica..... | 13 |
| 2.2 Nixtamalización | 13 |
| 2.4.2. Efectos de la nixtamalización en la Composición del pericarpio..... | 18 |
| 2.5 Componentes principales de la Biomasa Lignocelulósica | 20 |
| 2.5.1 Lignina | 20 |
| 2.5.2 Hemicelulosa | 21 |
| 2.5.3 Celulosa..... | 22 |
| 2.5. Almidón..... | 23 |
| 2.6 Procesos de degradación de materiales lignocelulósicos..... | 24 |
| 2.6.1 Hidrólisis ácida..... | 24 |
| 2.6.2 Ácido diluido. | 25 |
| 2.6.3 Autohidrólisis | 25 |
| 2.6.4 Tratamiento térmico alcalino..... | 26 |
| 2.6.5 Hidrólisis enzimática | 27 |
| 2.7 Consorcios microbianos..... | 27 |
| 2.7.1 Consorcios microbianos reportados como degradadores de materiales lignocelulósicos..... | 28 |
| 2.8 Proceso Biocatalítico..... | 29 |
| 2.8.1 Ligninasas..... | 30 |
| 2.8.2 Hemicelulasas | 31 |
| 2.8.3 Celulasas | 34 |
| 2.8.4 Amilasas | 35 |

| | |
|---|----|
| 2.9 Relaciones sinérgicas | 37 |
| 2.9.1 Sinergia entre celulasas..... | 37 |
| 2.9.2 Sinergia entre Hemicelulasas | 37 |
| III. Objetivos..... | 39 |
| 3.1 Objetivo General | 39 |
| 3.2 Objetivos específicos | 39 |
| IV Referencias..... | 40 |
| V. Artículo ¹ | 48 |
| Aspectos principales | 48 |
| Resumen..... | 49 |
| Abstract | 50 |
| 1 Introducción..... | 51 |
| 2 Materiales y Métodos..... | 53 |
| 2.1 Obtención y enriquecimiento del consorcio nativo | 53 |
| 2.2 Estabilización del consorcio | 53 |
| 2.4 Cinética de crecimiento, degradación del PMN y producción de enzimas... 55 | |
| 2.4.1 Determinación de azúcares reductores | 55 |
| 2.4.2 Preparación de extractos enzimáticos | 56 |
| 2.4.3 Análisis del crecimiento del consorcio microbiano..... | 58 |
| 2.4.4 Hidrólisis ácida cuantitativa de PMN..... | 59 |
| 2.4.5 Cromatografía de líquidos de alta resolución | 59 |
| 3 Resultados y Discusión | 60 |
| 3.1 Estabilización funcional y estructural del consorcio | 60 |
| 3.2. Análisis del proceso de degradación: cinética de crecimiento, cuantificación de sólidos residuales y producción de enzimas. | 63 |

| | |
|---|----|
| 3.2.1 Cinética de crecimiento y degradación de los sólidos del PMN | 63 |
| 3.2.2 Producción de α -amilasas durante el proceso de degradación | 65 |
| 3.3.3 Producción de xilanasas por el consorcio PM-06 | 66 |
| 3.3.4 Producción de celulosas por el consorcio PM-06 | 67 |
| 3.3.5 Análisis del perfil químico del PMN durante el proceso de degradación | 68 |
| 3.3.6 Producción de azúcares reductores..... | 70 |
| 3.3.2 Descripción de la diversidad microbiana..... | 71 |
| 3.3.3 Modelo biocatalítico propuesto de la degradación de lignocelulosa | 74 |
| 4. Conclusión | 76 |
| 5. Referencias..... | 77 |
| 6. Agradecimientos..... | 82 |
| Índice de figuras | |
| Fig. 1. Unidades básicas constituyentes de la lignina | 20 |
| Fig. 2. Estructura de la hemicelulosa (Restrepo, 2004)..... | 21 |
| Fig. 3. Estructura química de la celulosa (Melo, 2007)..... | 22 |
| Fig. 4. Proceso esquemático de la degradación enzimática de lignina (Hofrichter, 2000)..... | 31 |
| Fig. 5. Proceso esquemático de la degradación enzimática de hemicelulosa (De,S y Lucque, 2015)..... | 34 |
| Fig. 6. Proceso esquemático de la degradación enzimática de celulosa (Nidetzky et al., 1994) | 35 |
| Fig. 7. Proceso esquemático de la degradación enzimática del almidón. (Maarel et al. 2002) | 36 |
| Fig. 8 Análisis por DGGE del 16S ADN amplificado del ADN metagenómico de las resiembras 1, 2 y 3. A. Gel de gradiente desnaturante de 30% a 70% en gel de acrilamida al 6%. B. 16S ADN amplificado..... | 62 |
| Fig. 9. Degradación de sólidos del PMN durante el crecimiento del consorcio microbiano PM-06 | 64 |

Fig. 10. Producción de α -amilasas por el consorcio PM-06 durante la degradación del PMN..... 65

Fig. 11 Perfil de producción de Xilanasas durante el proceso de degradación 67

Fig. 12. Perfil de producción de celulasas durante el proceso de degradación del PMN 68

Fig 13. Perfil químico del pericarpio residual durante el proceso de degradación. 69

Fig. 14. Azúcares reductores presentes en el sobrenadante 71

Fig. 15. Patrones de banda correspondiente a la cinética de degradación del PMN 72

Fig. 16. Análisis de las poblaciones presentes en el consorcio MP-06 73

Fig. 17. Modelo hipotético del proceso de degradación del PMN..... 75

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Composición del pericarpio. Fuente: adaptado de watson, 1998 16

Cuadro 2. Composición química del pericarpio. (Yoshida et al., 2010) 17

Cuadro 3. Composición del Pericarpio de maíz nixtamalizado (PMN) (Rostro et al., 2014) 19

Tabla 4. Estabilidad funcional del consorcio PM-06 determinada como la capacidad de degradación de sólidos del pericarpio de maíz. 61

Índice de Abreviaturas

PMN: Pericarpio de maíz nixtamalizado

DGGE: Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante

HAC: Hidrólisis ácida cuantitativa

PM-06: Nombre del consorcio (Pericarpio de maíz y mes en el que se realizó el cultivo)

U/g de residuo: actividad catalítica responsable de la transformación de un μ mol de sustrato por minuto por gramo de pericarpio

I. Introducción general

En México el maíz es el principal cereal cultivado, participa con el 18% del valor de producción del sector agrícola y concentra el 33% de la superficie sembrada en el territorio nacional (7.5 millones de hectáreas) (SHCP, 2014). El maíz es utilizado como alimento humano, ya sea a través de un procesamiento doméstico o industrial (FAO, 2001). En México el maíz es consumido principalmente en forma de tortillas las cuales son producidas a través del proceso de nixtamalización que es el cocimiento alcalino de los granos de maíz, de este proceso se obtienen dos diferentes efluentes: el nixtamal y el nejayote. El nejayote, considerado como un residuo agroindustrial, contiene de 1-3% (p/v) de sólidos entre los que se encuentran el pericarpio y el endospermo (Sánchez, 2010) . En México las principales industrias que se dedican a la producción de harina de maíz nixtamalizada están concentradas en un pequeño sector, dentro de las que destacan, por orden de importancia, el Grupo Industrial MASECA que participa con 71.2% del mercado, MINSA con un 23.54%, Harimasa 1.4%, Cargil de México 1.3 %, Molinos Anáhuac 1.1% y Productos Manuel José 0.2%.

Los procesos industriales que se llevan a cabo en la obtención de los productos de valor comercial generan residuos agroindustriales, materiales en estado sólido o líquido, que se generan a partir del consumo directo de productos primarios o de su industrialización, que ya no son de utilidad para el proceso que los generó, pero que son susceptibles de aprovechamiento o transformación, para generar otro producto con valor económico de interés comercial y/o social (Saval, 2012).

El pericarpio es un residuo lignocelulósico debido a que está constituido principalmente de lignina, celulosa y hemicelulosa, polímeros que en conjunto se denominan biomasa lignocelulósica.

En la actualidad el aprovechamiento de los residuos lignocelulósicos o biomasa lignocelulósica tiene como finalidad obtener azúcares para la producción de biocombustibles; sin embargo, a pesar de la alta disponibilidad de estos residuos la complejidad de su estructura obstaculiza su hidrólisis. A este respecto en la

actualidad los métodos más eficientes de hidrólisis son los químicos y fisicoquímicos, que generan subproductos contaminantes, demandan gastos elevados de energía e inversiones económicas elevadas. Además de ser procesos que hidrolizan parcialmente los residuos y necesitan adecuaciones para ser procesos óptimos (Cuervo et al., 2001; Hendriks and Zeeman, 2009; Martínez and Valverde, 2009; Tu, 2014).

Por diversas desventajas que presentan los procesos mencionados anteriormente se ha optado por el uso de los métodos biológicos que son más específicos, disminuyen gastos de energía y de recursos para la obtención de productos y son procesos amigables con el ambiente. Diversos sistemas enzimáticos, principalmente fungales, se han utilizado para el aprovechamiento de residuos lignocelulósicos. En el mercado existe una gama de preparaciones enzimáticas dirigidas a la hidrólisis de los componentes de la lignina, hemicelulosa y celulosa; sin embargo, la proporción de esta composición depende de la naturaleza del residuo, lo que origina que la demanda de ciertas enzimas sea en diferente proporción para el tratamiento de cada residuo. En la industria las preparaciones enzimáticas son utilizadas como cajas negras obteniendo solamente la hidrólisis parcial de los residuos, es por esto, que en este trabajo se pretende analizar el proceso de degradación y los sistemas enzimáticos producidos por un consorcio microbiano que tiene capacidad de degradar pericarpio de maíz nixtamalizado. El análisis de la relación entre el proceso de degradación y la producción de enzimas respecto al tiempo ayudará a entender el proceso de hidrólisis biológico de los materiales lignocelulósicos para poder lograr en un futuro la manipulación y obtención de cócteles enzimáticos eficientes para uso comercial así como la obtención de productos derivados de valor agregado.

II. Marco Teórico

2.1. Biomasa lignocelulósica

Todo aquel conjunto de residuos de procesos agrícolas, forestales o incluso industriales generados en grandes cantidades se le denomina biomasa lignocelulósica. Los principales componentes de esta biomasa son celulosa, hemicelulosa y lignina componentes que posee la biomasa en mayor porcentaje en peso y en menor proporción se encuentran pectinas, proteínas, extractivos y cenizas (Martinez, 2015; Ferrer, 2000; Velilla, 2005)

Aproximadamente el 40% de la biomasa producida por la fotosíntesis es considerada como productos ricos en fibras de lignocelulosa, como la paja, el bagazo, tallos, madera y aserrín, etc. (Salmones, 1996). La generación de esta biomasa es principalmente de la agricultura y de las agroindustrias. Valdez et al. (2010) publicaron datos oficiales de 2006 que establecen que en México se produjeron 75.73 millones de toneladas de materia seca (Savala, 2012). A nivel internacional China genera 200 millones de toneladas de rastrojo de maíz cada año (Feng, 2011), trayendo consigo problemas de contaminación ambiental y desperdicios de recursos, que son causantes de preocupación a nivel mundial, México se encuentra en una etapa en la que se deben tomar medidas en la remediación de los problemas que el sector agroindustrial genera con la producción de residuos lignocelulósicos.

Uno de los procesos que se realizan a nivel industrial en el país es la producción de harina de maíz que incluye en su elaboración el proceso de nixtamalización.

2.2 Nixtamalización

En México, el maíz forma parte de la alimentación diaria de la población, es el cultivo de mayor presencia en el país, constituye un insumo para la ganadería y para la obtención de numerosos productos industriales por lo que desde el punto

de vista alimentario, económico, político y social, es el cultivo agrícola más importante (Polanco y Flores 2008, SIAP 2008).

El consumo de maíz en México es principalmente en forma de tortillas, que son producidas a través del proceso de nixtamalización. La palabra nixtamalización se refiere al proceso alcalino de cocción del maíz para convertirlo en masa, y de ahí a una amplia cantidad de diferentes productos, entre las cuales la tortilla es posiblemente la más importante (Boucher et al., 1995).

La etapa esencial de este proceso es la cocción de los granos de maíz en cal, seguido por la remoción del pericarpio y su posterior molienda para hacer una masa. La cocción en cal tiene varias ventajas: facilita la remoción del pericarpio, controla la actividad microbiana, mejora la absorción de agua, hidroliza proteínas y mejora el valor nutricional (Paliwal et al., 2001).

El proceso de nixtamalización induce cambios estructurales, químicos, funcionales y nutricionales en el maíz. La penetración del agua caliente que acarrea iones de calcio, afecta la pared celular, la lamela media, e induce gelatinización parcial del almidón y un aumento significativo en la insolubilidad de las proteínas. Mucho del calcio se queda en el pericarpio, pero cantidades altas penetran en la estructura del endospermo. El proceso reduce la fibra dietética insoluble y aumenta la fibra dietética soluble; favorece la disponibilidad de la niacina, que no es biodisponible en el maíz, con lo que se evita el desarrollo de pelagra (Boucher et al., 1995).

Las operaciones unitarias a escala industrial son las mismas que en los molinos de nixtamalización (cocimiento del maíz con agua y cal y su posterior lavado), la diferencia consiste en que en la fabricación de harina el proceso de cocimiento alcalino está automatizado integrando sistemáticamente el proceso desde el abastecimiento de materia prima hasta el envasado. El proceso de producción de la harina de maíz nixtamalizada, consta de dos etapas. La primera consiste en el cocimiento alcalino del maíz, la segunda etapa está integrada por las operaciones posteriores a la molienda y consiste en secado, tamizado, envasado y almacenamiento (Arroyo, 1989).

El proceso de nixtamalización genera dos productos: el nixtamal (sólido) que es la prioridad comercial y el nejayote (líquido).

El nejayote es un residuo que contiene gran cantidad de materia orgánica y que posee un pH alcalino cercano al máximo debido al uso de hidróxido de calcio en el proceso de nixtamalización y son desechados a temperaturas elevadas provocando daños al ambiente debido a que las plantas de tratamiento no cuentan con la capacidad de tratar estos efluentes pudiendo provocar eutrofización en cuerpos de agua, contaminar suelos y provocar problemas de olor (Espinosa, 2002).

En México han surgido diversos estudios en los que se busca aprovechar los residuos generados por la industria productora de harina de maíz; en Nuevo León se ha desarrollado estudios en la caracterización e identificación de esterasa del ácido ferúlico así como la producción de ácido ferúlico con el uso de aislados microbianos (Allan and Gámez, 2012; Rostro et al., 2014) del nejayote y pericarpio de maíz , en el estado de Querétaro también se ha realizado estudios para la producción de arabinoxilanos empleando procesos químicos, físicos y enzimáticos considerando las relaciones sinérgicas que pudieran darse para la producción de arabinoxilanos (García, 2016). En Yucatán la Universidad autónoma de Yucatán se ha enfocado al aprovechamiento del nejayote en la producción de amilasas y procesos de fermentación (Gonzalez Barrera Herbert Rafael, 2005; Medina, 1996). En la actualidad son pocos los estudios que se han realizado en el país, enfocados al aprovechamiento del pericarpio de maíz nixtamalizado empleando consorcios microbianos para su degradación.

La separación de los sólidos presentes en el nejayote es una alternativa para disminuir la DBO del efluente de la nixtamalización. El residuo sólido es el pericarpio aprovechado actualmente como alimento para ganado, pero que puede tener ser aún más redituable ya que es un material lignocelulósico que puede ser aprovechado para la producción de biocombustibles o la obtención de enzimas u otros productos de valor agregado.

2.4 Pericarpio de maíz

Los granos de maíz son cariósides desnudas, cuyas partes fundamentales son el pericarpio, el endospermo, el germen y el funículo. El principal parámetro de clasificación es el color externo del grano (Machado, 2001).

El pericarpio es el constituyente de la parte externa del grano y representa entre el 5-6% del total de su peso, tiene como función la protección contra el ataque de insectos y de las condiciones ambientales adversas.

El pericarpio de maíz está formado por un tejido denso y correoso, compuesto por almidón, grasas, proteínas, cenizas y azúcares (Cuadro 1).

Cuadro 1. Composición del pericarpio. Fuente: adaptado de watson, 1998

| Composición (%) | Endospermo | Embrión | Pericarpio | Escutelo |
|------------------------|-------------------|----------------|-------------------|-----------------|
| Almidón | 87.6 | 8.3 | 7.3 | 5.3 |
| Grasas | 0.8 | 33.2 | 1.0 | 3.8 |
| Proteínas | 8.0 | 18.4 | 3.7 | 9.1 |
| Cenizas | 0.3 | 10.5 | 0.8 | 1.6 |
| Azúcar | 0.6 | 10.8 | 0.3 | 1.6 |
| Resto | 2.7 | 18.8 | 86.9 | 78.6 |
| % materia seca | 83 | 11 | 5.2 | 0.8 |

Mediante análisis de los componentes Yoshida et al. (2010) determinaron la composición química (p/p%) y la composición relativa de monosacáridos (p/p%) en muestras de pericarpio de maíz, dichos valores se muestran en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Composición química del pericarpio. (Yoshida et al., 2010)

| Componentes (%) | |
|---|-----------------|
| Composición química | |
| Humedad^a | 8.0 ± 0.1 |
| Carbohidrato^a | 83.2 ± 3.2 |
| Holocelulosa^a | 78.6 ± 0.5 |
| α-celulosa^a | 25.1 ± 0.8 |
| Lignina insoluble en ácido^a | 4.0 ± 0.3 |
| Proteína^b | 9.5 ± 0 |
| Lípidos^a | 6.6 ± 2 |
| Ácido urónico^a | 0.6 ± 0.1 |
| Cenizas^a | 0.6 ± 0 |
| Composición relativa de Monosacáridos | |
| Manosa^b | 4.1 ± 1.3 |
| Xilosa^b | 33.4 ± 0.5 |
| Glucosa^b | 36.8 ± 0.4 |
| Galactosa^b | 5.9 ± 0.6 |
| Arabinosa^b | 20.0 ± 0.4 |
| Rhamnosa^b | tr ^c |

a. Valores expresados como media ± SD (n=3),

b. Valores expresados como medias ± SD (n=2),

trc. Trazas

La composición química del pericarpio de maíz está constituida por un 80 a 83% de carbohidratos. La fracción de holocelulosa comprende a la α celulosa y a la hemicelulosa, siendo esta última la que se encuentra presente en mayor proporción con un 53.1%, teniendo como monosacáridos mayoritarios la xilosa, glucosa y arabinosa (Cuadro 2).

2.4.2. Efectos de la nixtamalización en la Composición del pericarpio

La cocción alcalina y el remojo provocan la disolución e hinchamiento de las capas del pericarpio, esto hace que las paredes celulares y los componentes de la fibra dietética de esta parte del grano se vuelvan frágiles, facilitando su remoción, lo cual disminuye el contenido de fibra dietética insoluble (López et al. 2009). La cal mantiene el pH alcalino necesario para hidrolizar la hemicelulosa del pericarpio convirtiéndola en gomas solubles y provoca alteraciones estructurales (Bartolo, 1999).

El calcio se incorpora principalmente en el pericarpio y se ha reportado que se encuentra presente en forma de sales de ácidos poliurónicos y/o enlazados por grupos fenólicos derivados de la degradación de la lignina (Mondragon, 2004)

(Caballero Briones et al., 2000), determinó por análisis semicuantitativo de difracción de rayos x, los cambios que sufre el pericarpio de maíz por el proceso de nixtamalización en donde se observó un decremento en la concentración de la arabinosa y la tendencia a aumentar de la celulosa, este fenómeno se debe al proceso de disolución de hemicelulosa y de la transición de fase de la celulosa nativa (cristalina) a celulosa II (amorfa) en el medio alcalino, que se inicia con la hinchazón intracristalina seguido de la transición de fase a celulosa II.

Se ha determinado también los cambios sufridos por la nixtamalización del pericarpio de maíz en donde se encontraron pequeñas cantidades de silicio fósforo y nitrógeno (Bartolo et al. 1999)

Rostro-Alanís et al. (2014), reportan que durante el proceso de nixtamalización se modifica la composición del pericarpio, disminuyendo las concentraciones de celulosa, hemicelulosa y lignina. Se presentan otros componentes derivados de dicho proceso (Cuadro 3)

Cuadro 3. Composición del Pericarpio de maíz nixtamalizado (PMN) (Rostro et al., 2014)

| Componente | PMN (%) |
|---|----------------|
| Celulosa | 18.73 ± 0.81 |
| Almidón | 13.13 ± 1.75 |
| Xilano | 26.56 ± 0.67 |
| Arabinano | 13.01 ± 1.09 |
| Grupos acetilo | 2.37 ± 0.33 |
| Ácidos Uronicos | 2.76 ± 0.33 |
| Ácido Ferúlico | 0.79 ± 0.03 |
| Lignina Klason | 4.67 ± 0.18 |
| Ceniza | 2.72 ± 0.03 |
| Proteína | 5.56 ± 0.28 |
| Extractos | 8.81 ± 0.05 |
| Otros componentes (por diferencia) | 0.89 |

n=3 (g/100g de materia seca)

2.5 Componentes principales de la Biomasa Lignocelulósica

2.5.1 Lignina

La lignina tiene una estructura aromática y consta de subunidades de fenilpropano unidas mediante enlaces carbono-carbono o éter y forman una estructura tridimensional muy compleja. En general, las ligninas son copolímeros que se derivan principalmente de tres unidades fenilpropano-monoméricas básicas: alcohol *p*-cumarílico, alcohol coniferílico y alcohol sinapílico (Fig. 1) (red española de compostaje, 2014). Es uno de los biopolímeros más abundantes en las plantas y junto con la celulosa y la hemicelulosa conforma la pared celular vegetal. Forma redes de lignina-hidratos de carbono en una disposición regulada a nivel nano-estructural (Martínez et al., 2015). La lignina, es una abundante fuente de materias primas renovables con perspectivas bastante promisorias. La industria papelera produce enormes cantidades de lignina cada año que pueden tener aplicaciones directas, como las presentadas por los ligno-sulfonatos, compuestos no peligrosos que poseen aplicaciones como dispersantes de pesticidas, emulsificantes y secuestradores de metales pesados. Además, la lignina (sin ningún proceso de modificación química) puede ser utilizada como copolímero (López et al. 2010).

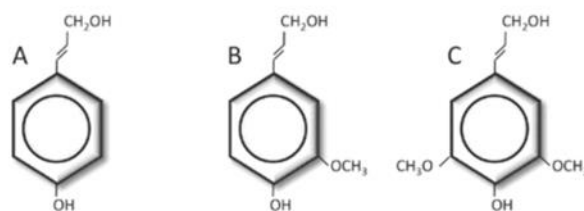


Fig. 1. Unidades básicas constituyentes de la lignina

En la degradación controlada de lignina a partir de desechos lignocelulósicos se generan compuestos aromáticos que pueden ser utilizados como materia prima en diferentes procesos, como, por ejemplo, la producción de vainilla. Además, la lignina seca es vendida a la industria química para ser utilizada como reactivo para la síntesis de productos poliméricos. (Castillo et al., 2012).

2.5.2 Hemicelulosa

La hemicelulosa es un heteropolímero constituido ya sea por una cadena principal de xilano (homopolímero) o por dos o más unidades, como los glucomananos, tiene diferentes ramificaciones como pentosas (xilosa, arabinosa), hexosas (glucosa, manosa y galactosa) o ácidos urónicos (ácidos glucurónicos, metilglucurónico y galacturónico) (Nogués, 2010). Por otro lado sus azúcares están esterificados con ácido acético y/o ácido ferúlico generando una estructura muy variable (Bribiesca, 2013).

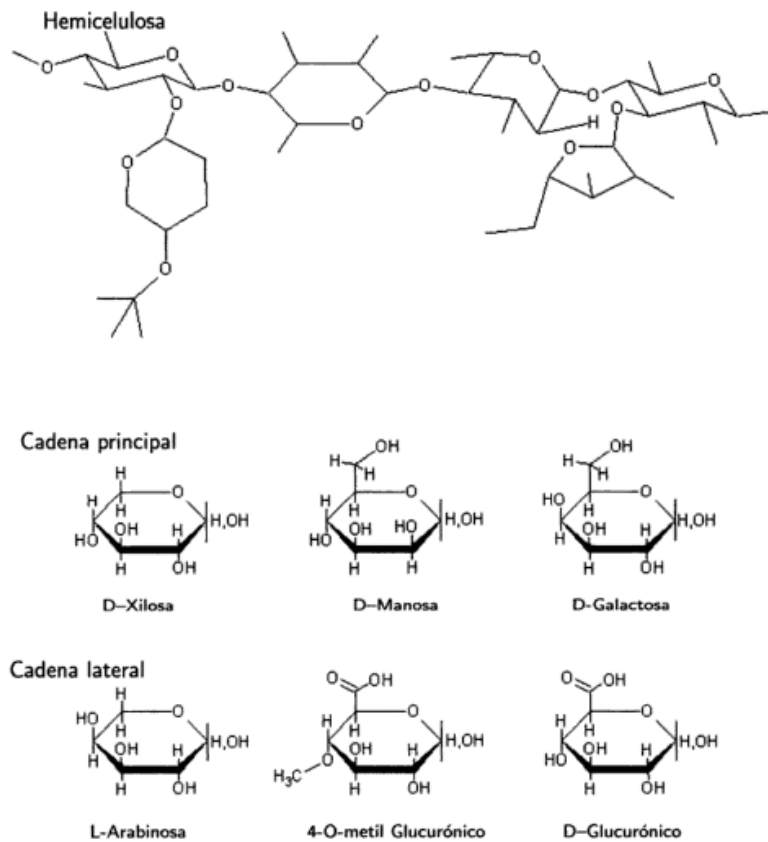


Fig. 2. Estructura de la hemicelulosa (Restrepo, 2004)

Los azúcares presentes en la hemicelulosa son fermentables, por lo que a partir de ellos se pueden derivar los biocombustibles; como el etanol o compuestos como el ácido láctico. Por otro lado, los componentes de la hemicelulosa pueden

ser utilizados en la preparación de productos como: cosméticos, farmacéuticos, para alimentación animal y humana (principalmente relacionados con alimentos dietéticos y funcionales), plásticos como el xilitol, el ácido acético, el furfural y productos poliméricos de síntesis (resinas furánicas) de interesantes propiedades, debido a su carácter biodegradable en contraste con los plásticos derivados del petróleo (Lopez et al., 2010).

2.5.3 Celulosa

La celulosa es el compuesto orgánico natural más abundante y una materia prima potencial para producir combustibles líquidos o gaseosos y para la industria química. La celulosa es un polímero lineal de residuos de glucosa, unidos por enlaces $\beta(1-4)$ que se encuentran unidas a las unidades β -D-glucopiranosas, que forman cadenas rectas reforzadas por enlaces cruzados de puentes de hidrogeno (Fig. 3) (Melo,2007), por su estructura compacta y cristalina. Es muy resistente a la hidrólisis y exige condiciones de concentración ácida y temperatura altas; Algunos organismos (bacterias, hongos, insectos fitófagos, caracoles, etc.), segregan enzimas celulíticas (celulasas) capaces de hidrolizar la celulosa (Yúfera, 1995).

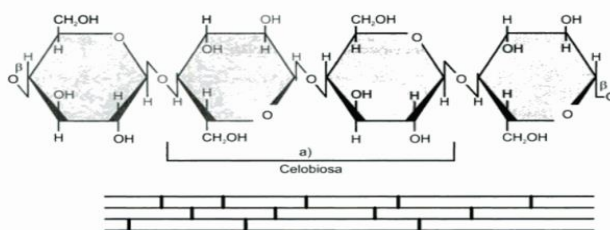


Fig. 3. Estructura química de la celulosa (Melo, 2007)

El inicio de la celulosa como material para fibras sintéticas en sustitución de la seda fue en 1899 cuando el alemán Lederer completó la fabricación del acetato de celulosa. El acetato de celulosa (CA) presentaba ventajas y sobre todo, no era inflamable, le siguieron el butirato de celulosa (CB) y el acetato butirato de celulosa (CAB) y el propionato de celulosa (CP); Estos esteres de celulosa,

especialmente el CA, se consumen en cantidades importantes en forma de láminas dentro de sus usos más diversos están en gafas, pelotas de ping-pong, soporte fotográfico, etc. Su aplicación más frecuente es la de herramientas de seguridad; igualmente, se utilizan para construir teclas de computadoras (Miravete et al., 2003). Los artículos moldeados y extruidos de acetato de celulosa son de uso muy extendido en los casos en que no se requiere una resistencia extremada a la humedad. El acetato de celulosa es también de uso muy extenso en forma de láminas, tiene una resistencia al impacto y propiedades eléctricas buenas y la ventaja de una baja inflamabilidad, no poseída por el nitrato de celulosa (Billmeyer, 1975).

La celulosa no puede ser usada como un termoplástico, debido a que cuando aumenta la temperatura se descompone, antes que fundirse. Sin embargo, se puede combinar con diversos compuestos para formar varios plásticos de importancia comercial, algunos ejemplos son el acetato de celulosa y acetato-butirato de celulosa ABC; el acetato de celulosa se produce en forma de hojas (para envolver), películas de fotografía y partes moldeadas. El acetato butirato de celulosa es mejor material de moldeo que el acetato de celulosa porque tiene una resistencia más grande al impacto, menor absorción de la humedad y mejor compatibilidad con los plastificantes (Groover et al., 1997).

2.5.4 Almidón

Los almidones representan un método muy importante para almacenar alimentos en las semillas y tubérculos de las plantas. El maíz, las papas, el trigo y el arroz contienen cantidades considerables de almidón (Brown, 2004).

El almidón es un polisacárido de elevado peso molecular que contiene generalmente alrededor del 20% de una fracción soluble en agua, llamada amilosa y el 80% de una insoluble, conocida como amilopectina (Morrison, 1998)

La amilosa es un polímero de glucopiranosas unidas entre sí por enlaces glucosídicos α entre el carbono 1 de una glucopiranososa y el grupo hidróxido del carbono 4 de la siguiente, formando cadenas lineales (Ege, 1998).

La amilopectina tiene enlaces α -1,4, pero por otro lado posee una estructura más compleja que la amilosa, ya que las moléculas de glucosa se unen también mediante enlaces α -1,6, este tipo de enlaces permite que se produzcan sitios de ramificaciones de las moléculas (Pena, 1988), que contienen aproximadamente un millón de unidades de glucosa en una única molécula (Ege, 1998).

El almidón se biodegrada fácilmente, de manera que sus disoluciones o deben ser recientes o se deben preparar con un conservante. Un producto de la Hidrólisis del almidón es la glucosa, que es un agente reductor (Harris, 2006).

2.6 Procesos de degradación de materiales lignocelulósicos

En los procesos convencionales la lignina se elimina por pretratamientos químicos (Liu and Wyman, 2003) o térmicos (Garrote et al., 1999), seguidos de Hidrólisis enzimática (Zhang and Lynd, 2004). La finalidad del pretratamiento en el material lignocelulósico es remover la lignina, hidrolizar la hemicelulosa a azúcares fermentables y reducir la cristalinidad de la celulosa para liberar glucosa (Cuervo, 2001).

2.6.1 Hidrólisis ácida

La Hidrólisis ácida presenta dos enfoques, ácido concentrado a bajas temperaturas y ácido diluido a altas temperaturas.

La concentración ácida elimina principalmente celulosa y hemicelulosa. La solubilización de los polisacáridos es alcanzada usando diferentes concentraciones como 72% H_2SO_4 , 41% HCl o 100% ácido trifluoroacético (TFA) siendo el ácido sulfúrico el más difícil de recuperar. Las concentraciones ácidas permiten operar a baja temperatura y presión media, que conduce a la formación de pequeñas cantidades de productos de degradación como el furfural y metil furfural compuestos indeseables que se producen por ligeros cambios en la temperatura y presión.

En la utilización de ácidos concentrados la recuperación de estos es un paso clave para la viabilidad económica del pre tratamientos; sin embargo, es un proceso difícil y la neutralización de los mismos incrementa los costos de producción (Carvalho, 2008).

2.6.2 Ácido diluido.

Consiste en la adición de ácido diluido a la biomasa y su eficiencia está determinada por el contenido de lignina de los materiales (Cuervo et al., 2001), esto es que a menor cantidad de lignina mejor eficiencia tendrá la Hidrólisis pues la demanda de ácido por parte de la lignina para lograr la ruptura de sus enlaces exige concentraciones altas de ácido. Este método logra altos rendimientos en la recuperación de hemicelulosa además de generar en menor proporción productos de degradación y problemas de corrosión en tanques de Hidrólisis comparado con la utilización de ácidos concentrados.

Además de los ácidos inorgánicos algunos ácidos orgánicos débiles, como el ácido maleico es un potencial catalizador para promover la Hidrólisis de celulosa (Carvalho, 2008).

2.6.3 Autohidrólisis

Este proceso es catalizado por iones hidronio (H^+), generados por un proceso de autoionización de agua, el único reactivo añadido al sustrato, a una elevada temperatura y presión. La auto-ionización del agua conduce a la despolimerización de hemicelulosa por Hidrólisis selectiva de ambos enlaces glicósidos y grupos acetilo (Carvalho, 2008).

En una segunda etapa, los iones hidronio catalizan la hidrólisis del ácido acético, el cual contribuye en forma importante a un aumento de la acidez y por lo tanto a la hidrólisis de los componentes de la hemicelulosa. En la autohidrólisis los ácidos urónicos y acético resultantes de la Hidrólisis de grupos acetilo y urónicos originalmente presentes en la hemicelulosa catalizan la Hidrólisis de los enlaces entre hemicelulosa y lignina, así como la Hidrólisis de los hidratos de carbono.

La autohidrólisis puede convertir hemicelulosa en sacáridos solubles con un alto rendimiento y con una baja formación de subproductos, lo que hace una fácil extracción de sólidos residuales ricos en celulosa y lignina. Los productos de autohidrólisis son una mezcla de oligosacáridos, monosacáridos, ácido acético y derivados furanos, y hidroximetilfurano, los cuales pueden además someterse a reacciones de descomposición de ácido fórmico y rendimiento de ácido levulínico. (Carvalho, 2008)

Este pretratamiento tiene una alta recuperación de hemicelulosa y no se necesita catalizador, la lignina no se solubiliza significativamente y los azúcares se hidrolizan parcialmente, por lo que se obtiene una fracción líquida y una baja proporción de compuestos potenciales inhibidores de bioconversión. (Carvalho, 2008)

2.6.4 Tratamiento térmico alcalino

En la degradación del pericarpio y de sus componentes el tratamiento alcalino se realiza por medio de la adición de agua y cal a temperaturas elevadas, Dependiendo de la temperatura de cocimiento, el pericarpio experimenta hidrólisis, al reaccionar con el calcio presente en la solución de cocción, durante la cual pierde compuestos tales como hemicelulosa y otros carbohidratos, por una lixiviación producida por la solución de cocimiento, esta pérdida puede conducir temporalmente a una disminución marcada del contenido de calcio en el pericarpio; este proceso influye en la cristalización de los componentes, y está correlacionada con el aumento de la temperatura y del tiempo de exposición, es decir a mayor tiempo de exposición a mayores temperaturas, mayor es el grado de modificaciones químicas y físicas en el pericarpio.

Briones et al. 2000 determinó que las etapas de cocción se componen principalmente de atacar a la cutina mediante la formación de celulosa alcalina con la combinación de agua caliente alcalina y hemicelulosa. Provocando que el pericarpio se hinche y posteriormente pase a una fase de transición de la celulosa.

2.6.5 Hidrólisis enzimática

La digestión es la degradación o descomposición de los alimentos a moléculas, este proceso ocurre normalmente en dos fases. Primero, el alimento es degradado en forma mecánica en trozos más pequeños, la segunda fase de la digestión es el proceso de rompimiento

La Hidrólisis proteica enzimática tiene varias ventajas. Entre ellas, la rapidez del proceso, la alta especificidad, el coste moderado, y la posibilidad de obtener productos de alta calidad que pueden comercializarse a gran escala (de Artiñano and Castro, 2009)

Cualquier proceso de Hidrólisis enzimática de biomasa lignocelulósica necesita una fase de pre tratamiento, ya que la estructura de los componentes está diseñada para resistir ataques de insectos y microorganismos por su estructura ordenada que además es resistente a efectos mecánicos ambientales. (Pérez, 1997)

2.7 Consorcios microbianos

Se entiende por consorcio microbiano como un grupo de diferentes especies de microorganismos que actúan conjuntamente como una comunidad, para la degradación de distintos compuestos (Vela, 2006).

Se ha reportado que las asociaciones de dos o más especies de microorganismos pueden llevar a cabo procesos de degradación de mayor eficiencia. Lo anterior, se explica debido a que los microorganismos cuando están expuestos a limitaciones nutricionales u otros factores de estrés ambiental, estimulan de una u otra forma interacciones benéficas de subsistencia, resultado de su asociación con otros organismos (Barreto and Anaguano, 2014).

2.7.1 Consorcios microbianos reportados como degradadores de materiales lignocelulósicos.

La degradación de la lignocelulosa es compleja, ya que resulta de la estructura tridimensional de las paredes celulares de las plantas y las complejas interacciones entre los diferentes componentes.

Se han establecido consorcios microbianos a partir de diferentes fuentes de materiales lignocelulósicos, diferentes condiciones de tiempo, temperatura y concentraciones, los cuales se abordan a continuación.

Un consorcio microbiano, designado WCS-6 por Wang et al. (2011), fue establecido por sub-cultivos sucesivos en presencia de paja de arroz y algodón en condiciones estáticas. Logrando una degradación del 99 y 81.3 % de algodón y paja respectivamente.

Se obtuvieron nueve aislamientos bacterianos de WCS-6 cultivados en condiciones aeróbicas, y la secuencia de sus 16S rADN indicaron que estas bacterias se relacionaron con *Bacillus thermoamylovorans* BTA, *Paenibacillus barenholtz* SAFN-016, *Proteobacterium* S072, *Pseudoxanthomonas taiwanensis* CB-226, *Rhizobiaceae str.* M100, *Bacillus sp.* E53-10, HMD444 *Proteobacteria Beta*, *Petrobacter succinimandens* 4BON y *Acidophilus margaritifer* N2-214. El ADN total reveló la presencia de secuencias afines a las de termo *Ureibacillus sphaericus*, bacteria clon GC3 no cultivado, termo *Succinogenes Clostridium* no cultivado, además de las secuencias identificadas a partir de las bacterias cultivadas (Togores, 2011)

Feng et al. (2011) establecieron otro consorcio microbiano degradador de materia lignocelulósica, usando como sustrato polvo de rastrojo de maíz crudo no esterilizado, el consorcio mantuvo su alta actividad celulítica y una estructura de la comunidad bacteriana de forma estable, logrando una degradación de 51% del sustrato. Los resultados indicaron que las secuencias parciales de genes de rARN son homólogas o muy similares a *Ralstonia sp.*, *Clostridium sp.*, *Firmicutes* no

cultivados, *Propionibacterium acnés*, *Betaproteobacterium* no cultivables y *Pantoea sp.*

Wongwiliawirn (2010) reportó un consorcio estructuralmente estable con la coexistencia de ocho grandes microorganismos usando como sustratos el bagazo, paja de arroz, rastrojo de maíz y lodos industriales de pulpa de eucalipto, el consorcio comprende los géneros anaeróbicos bacterianos *Clostridium* y *Thermoanaerobacterium* junto a una bacteria aeróbica facultativa *Rhodocyclaceae*, bacilos y bacterias no cultivadas. La mayoría de las actividades lignocelulósicas incluyendo endo-glucanasa, xilanasa y β -glucanasa estaban presentes en el sobrenadante del cultivo crudo en comparación con la fracción unida a las células. El análisis proteómico extracelular de la fracción unida a la celulosa cruda reveló la presencia de un sistema enzimático lignocelulósico múltiple compuesto principalmente de celulosas de clostridios junto con hemicelulasas y una β -glucanasa de orígenes relacionados con *Clostridium*, *Bacillus*, y *Thermobacillus*.

2.8 Proceso Biocatalítico

Los procesos biocatalítico consisten en el uso de compuestos de origen biológico para dar lugar a una o series de reacciones simultáneas en las cuales una molécula precursora es convertida.

Las enzimas ocupan el lugar más destacado dentro de los biocatalizadores, son de acción sobre una sustancia concreta o sobre un determinado tipo de enlace presente, la acción de las enzimas consiste en acelerar las reacciones químicas con un requerimiento de energía muy bajo en comparación a una reacción catalizada por un compuesto químico (Centro de Estudios Vector, 2004).

La degradación enzimática del material lignocelulósicos involucra una serie de diferentes enzimas, degradadoras de celulosa, hemicelulosa y lignina que han sido estudiadas intensivamente durante más de dos décadas, Las reacciones catalizadas por enzimas oxidativas juegan un papel significativo en la degradación completa de la biomasa lignocelulósica estos mecanismos de reacción han sido

revelados sobre el nivel molecular de diversos componentes enzimáticos. Los cuales se describen a continuación.

2.8.1 Ligninasas

En la naturaleza, la lignina es encontrada en su mayoría como una parte integral de la pared celular incrustado en una matriz de polímero de carbohidrato de celulosa y hemicelulosa (Aehle, 2008).

Reacciones catalizadas por enzimas oxidativas juegan un papel significativo en la degradación completa de la biomasa lignocelulósica. La lignina es el tercer mayor componente del material lignocelulósico, su modificación y degradación enzimática es hasta ahora parcialmente conocido, a causa de las reacciones oxido reductivas y radicales involucradas.

- Lignina peroxidasa (LiPs). Las peroxidasas fúngicas son hemoproteínas las cuales oxidan su sustrato con peróxido de hidrogeno. Las LiPs tienen un alto potencial de reducción y pueden oxidar compuestos modelo de lignina fenólicos, éteres aromáticos, y policíclicos aromáticos. Cationes radicales formados por la acción de la enzima causan reacciones severas diferentes y finalmente resulta en divisiones del anillo. Las LiPs han sido caracterizadas en varios hongos de podredumbre blanca.
- Manganeso peroxidasas (MnP). Manganeso peroxidasas son una hemoproteína con un centro de manganeso. El Mn^{3+} quelado puede degradar los restos fenólicos de lignina. Los radicales fenoxi son formados y sometidos a una variedad de reacciones que resultan en productos muy similares a los generados por las LiPs.
- Lacasas. Las lacasas pertenecen a las metaloenzimas de cobre y al subgrupo de azul oxidasas. La reacción típica de las lacasas es la oxidación de un compuesto fenólico transfiriendo los electrones a la molécula de

oxígeno para convertirla en agua. En la reacción de oxidación catalizada por la lacasa el sustrato pierde un solo electrón y forma un radical libre. Los radicales formados por la reacción enzimática pueden someterse a reacciones no enzimáticas ya sea de hidratación o polimerización generando otras estructuras fenólicas intensamente coloreadas (Aehle, 2008).

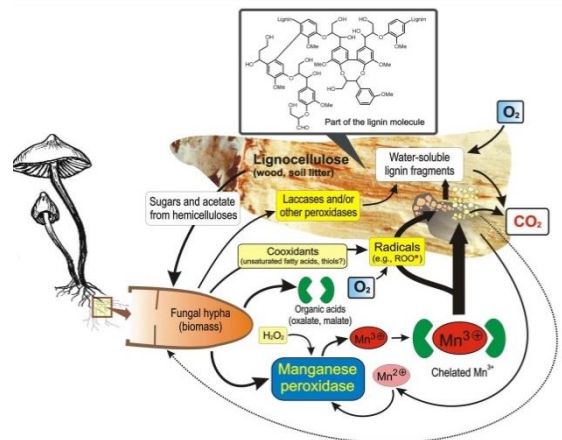


Fig. 4. Proceso esquemático de la degradación enzimática de lignina (Hofrichter, 2000).

2.8.2 Hemicelulasas

En la degradación de hemicelulosa intervienen distintos tipos de enzimas, por su diversa composición. Los mecanismos de acción permiten diferenciar dos tipos principales de enzima: endo y exo enzimas. Las primeras fragmentan la cadena principal en zonas internas, mientras que las segundas liberan unidades monoméricas a partir de zonas terminales.

- Endo-xilanasas. Actúan sobre los enlaces glicosídicos presentes en la cadena principal ocasionando una reducción del grado de polimerización del sustrato. Así, los productos que se generan son principalmente oligómeros de β-D-xilopiranosil, aunque existen diferencias en las características específicas del producto final liberado causadas por el tipo

de concreto de xilano y por la clase de endoxilanasas que actúe (Red Española De Compostaje, 2014).

- α -Glucuronidasas. Son enzimas que hidrolizan los vínculos entre α -1,2 ácido glucurónico y residuos de xilosa en la glucuronoxilano. Catalizan la hidrólisis por medio del mecanismo de inversión (Shallom et al., 2004). Sin embargo, el sustrato específico varía con el consorcio microbiano, y algunas glucuronidasas son capaces de hidrolizar el polímero intacto (Wet and Prior, 2004).
- Endomananasa. Cataliza la escisión aleatoria de enlaces β -manopiranosilo dentro de la cadena principal de galactomanano, glucomanano, galactoglucomanano y manano. Liberan cadenas cortas de β -1,4-Mano-oligómeros (Pandey, 2011).
- β -Manosidasa. Libera D-manosa del extremo no reductor de galacto(gluco)mananos y de mano-oligosacáridos producidos por la actividad de la endomananasa. La actividad de la enzima es más alta cuando uno o más residuos de D-manosa no sustituidas están presentes adyacentes a la terminal del residuo de D-manosa (Yarema, 2005).
- β -Xilosidasa. Las β -xilosidasas hidrolizan β -1,4-xilooligosacáridos con un grado de polimerización de 2 a 7, a una concentración fija, con una tasa creciente con el aumento de longitud de la cadena. (Harman and Kubicek, 2002).
- α -L-Arabinofuranosidasa. Actúa en sinergia con endoxilanasas, y β -xilosidasa para la Hidrólisis del xilano. La adición de esta enzima a endoxilanasas mejora la sacarificación del arabinoxilano (Bajpai, 2014).

- Esterasa de ácido Ferúlico. Desempeña una función similar a los álcalis en la desesterificación de los tejidos vegetales(Kuhad and Singh, 2007). Estudios indican que la enzima hidroliza ácidos fenólicos presentes en la estructura de la hemicelulosa(Bedford and Partridge, 2011).
- α -Galactosidasa. Hidroliza una variedad de α -D-galactósidos sencillos, así como moléculas más complejas tales como oligosacáridos y polisacáridos (Cruz and Park, 1982). Varios grupos han desarrollado procesos enzimáticos utilizando α -galactosidasa de origen vegetal, bacteriano, fúngico y la fuente para la hidrólisis de galacto-oligosacáridos de la familia de la rafinosa (Haghi, 2011).
- Ácido p-cumárico esterasa. La ácido p-cumárico esterasa es capaz de romper el enlace éster entre el ácido hidroxicinámico, principalmente ácido ferúlico o ácido p-cumárico, y el azúcar unido, y así liberar el ácido hidroxicinámico de materiales de la pared celular(Carmen, 1999)
- Acetil xilano esterasa. Estas enzimas fragmentan los enlaces éster y por lo tanto eliminan los restos de acetilo de arabinoxilano (Acton, 2012).

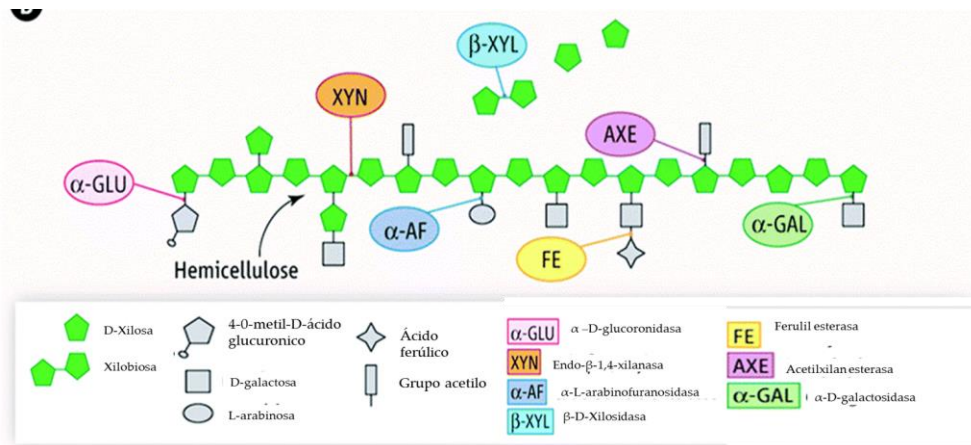


Fig. 5. Proceso esquemático de la degradación enzimática de hemicelulosa (De,S y Lucque, 2015)

2.8.3 Celulasas

La degradación eficiente de celulosa requiere de una mezcla de la actividad de diferentes celulasas actuando secuencialmente o conjuntamente.

- Endogluconasa. Las endogluconasas disocian las cadenas de celulosa internamente; actúan principalmente sobre las partes amorfas de las fibras de la celulosa, las endogluconasas hidrolizan enlaces β -1,4-glucosídicos al azar. Estas no atacan a la celobiosas pero hidrolizan celodextrinas, celulosa hinchada con ácido fosfórico y sustituto de celulosa como el carboximetil celulosa y la hidroxietil celulosa. La especificidad de estas enzimas no puede ser muy alta dado que ataca fácilmente a celulosa altamente sustituida.
- Celobiohidrolasas. Degradan la celulosa empezando por las cadenas finales libres, produciendo celobiosas, las celobiohidrolasas son también capaces de degradar celulosa cristalina. Estas enzimas no atacan celulosa sustituida lo cual refleja una alta especificidad de sustrato mayor que la de endoglucanasa, las celobiohidrolasas hidrolizan celodextrinas pero no

celobiosa. Celobiohidrolasas atacan los extremos de las cadenas de celulosa, mientras que las cadenas de celulosa endo-glucanasas escinden en el medio y reducen el grado de polimerización. (Teeri, 1997)

- β -glucosidasa. Hidroliza celobiosa y celo-oligosacáridos a glucosa. Realiza su acción bajo dos mecanismos el de inversión y retención (Fogarty, 1983)).

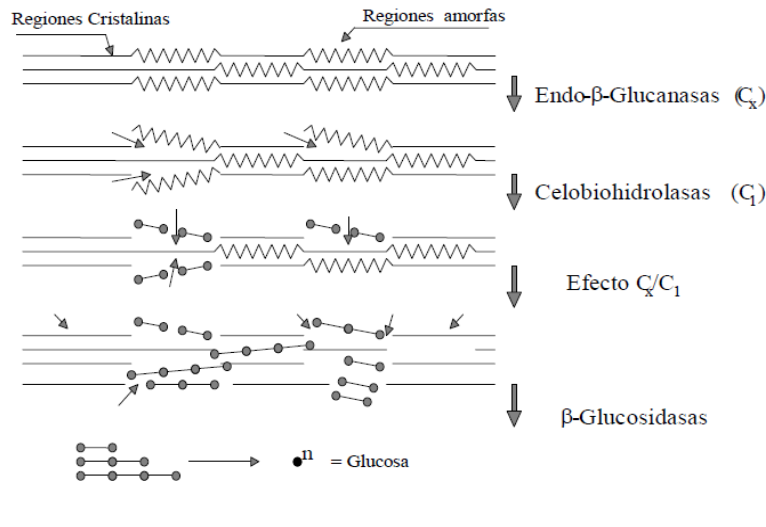


Fig. 6. Proceso esquemático de la degradación enzimática de celulosa (Nidetzky et al., 1994)

2.8.4 Amilasas

El almidón es un carbohidrato de reserva de alimentos en plantas y mayor fuente de energía para organismos fotosintéticos. Este es abundante en la naturaleza y está compuesto de dos distintos polisacáridos, amilosa y amilopectina. La amilosa es esencialmente lineal, polímero hidrosoluble que consiste de vínculos α -1,4 D-glucopiranososa, y la amilopectina está altamente ramificada por enlaces α -1,6.

- Amilasa. Las amilasas degradan almidón y compuestos relacionados, hidrolizando enlaces glucósidos α -1,4 y/o α -1,6 en un modo de acción endo u exo. La variedad de enzimas que catalizan tales reacciones incluyen α -amilasas, β -amilasas, amiloglucosidasas, α -glucosidasas, pululanasa y

isomilasas. Cada una de estas enzimas pueden ser distinguidas de las otras por las bases de reacciones específicas.

- Glucoamilasa. Las glucoamilasas son encontradas solo en bacterias, arqueas y hongos. Atacan el extremo no reductor de las cadenas de maltolooligosacaridos para producir glucosa. Las glucoamilasas pueden adherirse tanto a enlaces glucosidicos α -(1 \rightarrow 4) y α -(1 \rightarrow 6) en estas cadenas, así como todos los demás enlaces α -glucodicos entre dos residuos glucosil excepto en α , α -trehalosa (α -D-glucopiranosil α -D-glucopiranosido). La velocidad de Hidrólisis aumenta con el aumento de la longitud de la cadena de sustrato, pero teniendo en cuenta el tiempo y concentraciones suficientemente bajos de solidos disueltos, las glucoamilasas convertirán completamente los maltooligosacaridos a glucosa, son enzimas muy lentas; esto es compensado por las grandes cantidades producidas por muchos hongos. Su producción inicial es β -glucosa, ellos actúan por un mecanismo inversor. Para concentraciones altas de solidos disueltos que están presentes en la industria de la sacarificación, las glucoamilasas producirán concentraciones sustanciales de di-, tri- y tetra-sacáridos por condensación de glucosa y di y trisacáridos para los extremos no reductores de glucosa. (Aehle, 2008)

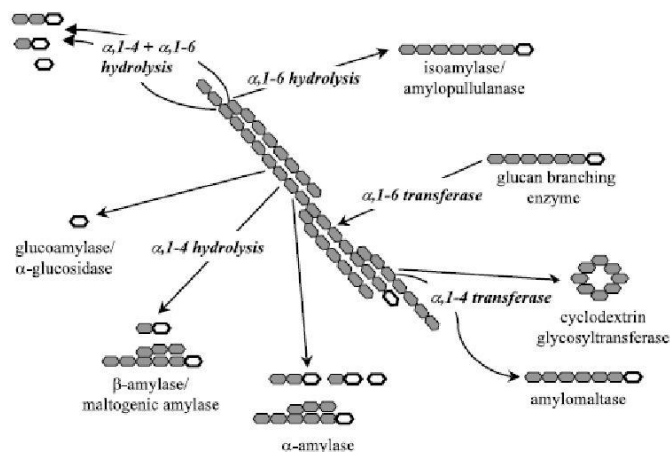


Fig. 7. Proceso esquemático de la degradación enzimática del almidón. (Maarel et al. 2002)

2.9 Relaciones sinérgicas

La sinergia depende de la relación de las enzimas implicadas (Nidetzky et al. 1994) así como la característica específica de la enzima y la característica del sustrato (Van Dyk, 2012) que determinan el tipo de enzima generada como las relaciones que pueden haber entre ellas de acuerdo a su grado de sinergia o sinergismo que se define como "la relación de la tasa o el rendimiento de producto liberado por las enzimas cuando se utilizan juntas comparado con la suma de la tasa o el rendimiento de estos productos cuando las enzimas se utilizan por separado"(Kumar and Wyman, 2009).

2.9.1 Sinergia entre celulasas

Las relaciones sinérgicas que se han podido establecer durante la degradación de la celulosa son entre diferentes celobiohidrolasas (con especificidad para extremos reductores y no reductores), entre endo y exo gluconasas; endo gluconasas, celobiohidrolasas y β -glucosidasas (Boisset et al., 2000, 2001; Lynd et al., 2002; Qi et al., 2007; Zhang and Lynd, 2004; Zhang et al., 2010; Zhou and Ingram, 2000) estas relaciones varían dependiendo de la naturaleza del sustrato, la naturaleza específica de las enzimas y las condiciones de ensayo. (Woodward, 1991).

2.9.2 Sinergia entre Hemicelulasas

En estas enzimas se han identificado tres tipos de sinergias: homosinergia se produce entre las enzimas de escisión de la cadena principal; la heterosinergia ocurre entre escisión de la cadena principal y las enzimas desramificadoras; y la anti- sinergia sucede cuando una enzima inhibe la acción de otra, por ejemplo cuando una enzima elimina un elemento de la cadena principal y esta modificación es requerido para la acción de otras enzimas. (Kovacs, 2009).

Las relaciones sinérgicas que se han reportado en diversos estudios son las que se establecen entre acetilxilan esteras y endoxilanasas; feruloil esterasa y endoxilanasas; xilanasas, β -xilosidasas y acetil xilan esterasas; exo y endo-xilanasas sobre xilano de granzas de avena; endo-xilanasas, β -xilosidasas y α -L-

arabinofuranosidasa sobre arabinoxilan; sinergia entre endoxilanasas, α -L-arabinofuranosidasa y endoxilanasas sobre arabinoxilan; β -mananasa, β -manosidasa entre xilanasas en la goma de guar y la sinergia entre mananasa y α -galactosidasa (Kovacs, 2009).

III. Objetivos

3.1 Objetivo General

Analizar el sistema biocatalítico de un consorcio microbiano producido durante la degradación de pericarpio de maíz nixtamalizado.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar la estabilización funcional y molecular del consorcio microbiano.
- Determinar los perfiles de degradación de los componentes del pericarpio de maíz por el consorcio microbiano
- Determinar los perfiles de producción de enzimas involucradas en la degradación de celulosa y hemicelulosa
- Describir el proceso de degradación del pericarpio de maíz nixtamalizado con base en la diversidad microbiana y las actividades enzimáticas encontradas.

IV Referencias

- Acton, Q.A., 2013. Gram-Positive Endospore-Forming Rods—Advances in Research and Application: 2013 Edition: ScholarlyBrief. ScholarlyEditions.
- Aehle, W. 2008. Enzymes in Industry: Wiley.
- Allan, E., Gámez, B., 2012. del ácido ferúlico de bacillus flexus NJY2 aislado.
- Arroyo, G. 1989. La Pérdida de la autosuficiencia alimentaria y el auge de la ganadería en México: Plaza y Valdés.
- Bajpai, P. 2014. Xylanolytic Enzymes: Elsevier Science.
- Barreto, J. A. R., & Anaguano, A. H. 2014. Evaluación del crecimiento y compatibilidad de hongos de la podredumbre blanca Evaluation of Growth and Compatibility of white Rot Fungi. *Revista Ciencia En Desarrollo*, 5(2), 197–205.
- Bartolome, B., Gómez-Cordovés, C., 1999. Barley spent grain: release of hydroxycinnamic acids (ferulic and p-coumaric acids) by commercial enzyme preparations. *J. Sci. Food Agric.* 79, 435–439.
- Bartolo-Pérez, P., Peña, J. L., Cruz-Orea, A., y Calderón, A. 1999. Estudio de la composición química de pericarpio de maíz con las técnicas XPS y EDAX. *Superficies Y Vacío*, 8(64), 64–68.
- Bedford, M. R., & Partridge, G. G. 2011. Enzymes in Farm Animal Nutrition: CABI Pub.
- Billmeyer, F. W. 1975. Ciencia de los polímeros: Reverté.
- Boisset C, Fraschini C, Schulein M, Henrissat B, Chanzy H. 2000. Imaging the enzymatic digestion of bacterial cellulose ribbons reveals the endo character of the cellobiohydrolase Cel6A from *Humicola insolens* and its mode of synergy with cellobiohydrolase Cel7A. *Appl Environ Microbiol*; 66(4):1444–52
- Boisset C, Petrequin C, Chanzy H, Henrissat B, Schulein M. 2001. Optimized mixtures of recombinant *Humicola insolens* cellulases for the biodegradation of crystalline cellulose. *Biotechnol Bioeng*; 72(3):339–45.

Boucher, F., Muchnik, J., Cirad, International Development Research, C., Inter-American Institute for Cooperation on, A., & Programa Cooperativo de Desarrollo Agroindustrial, R. 1995. Agroindustria rural: recursos técnicos y alimentación: CIRAD.

Bribiesca, B. L. C. 2013. Enzimas xilanolíticas bacterianas y sus aplicaciones industriales. revista especializada de ciencias de la salud, 1, 19-22.

Brown, T. L., LeMay, H. E., Bursten, B. E., & Burdge, J. R. 2004. Química: . Pearson Educación.

Caballero Briones, F., Iribarren, A., Peña, J.L., Castro Rodriguez, R., Oliva, A.I., 2000. Recent advances on the understanding of the nixtamalization process. Superf. y vacío 20–24.

Carmen, B. B. y G.C. 1999. Barley spent grain: Release of hydroxycinnamic acids (ferulic and p-coumaric acids) by commercial enzyme preparations. Journal of the Science of Food and Agriculture, 79, 435-439.

Carvalho, F., Duarte, L. C., & Gírio, F. M. 2008. Hemicellulose biorefineries: A review on biomass pretreatments. Journal of Scientific and Industrial Research, 67(11), 849–864.

Castillo, A., Castillo, A., Delgado, R. S., Hernández, E. G., Domínguez, M. M., Baeza, J. M. G., Martínez, A. M. M. 2012. Lignocelulósicos usos alternativos para aprovechar este subproducto agroindustrial, tal como la generación de fibras, 13(4), 140–150.

Cuervo, L., Folch, J.L., Quiroz, R.E., 2001. Lignocelulosa Como Fuente de Azúcares Para la Producción de Etanol. 13, 11–25.

De Wet, B.J.M., Prior, B.A., 2004. Microbial α -Glucuronidases. Lignocellul. Biodegrad. 241–254.

De, S., y Lucque, R. 2015. Integrated enzymatic catalysis for biomass deconstruction: a partnership for a sustainable future. *Sustainable Chemical Processes*, 3(1), 0–5.

de Artiñano, M.A.A., Castro, M.M., 2009. Péptidos antihipertensivos derivados de proteínas alimentarias. Editorial Complutense, S.A

Ege, S., 1998. Química orgánica: estructura y reactividad, Química orgánica: estructura y reactividad. Reverté.

Equipo del centro de estudios vector 2004 Prueba de Acceso a la Universidad Para Mayores de 25 Años. Biología Prueba Especifica.e-book. (n.d.). MAD-Eduforma.

Espinosa, R.D., 2002. Efluentes de la industrialización del maíz: ¿contaminante o recurso valioso? 54–63.

Feng, Y., Yu, Y., Wang, X., Qu, Y., Li, D., He, W., & Kim, B. H. 2011. Degradation of raw corn stover powder (RCSP) by an enriched microbial consortium and its community structure. *Bioresource Technology*, 102(2), 742–747.

Ferrer, J. A. C. 2000. Curso básico de análisis térmico. Editorial Club Universitario.

Fogarty, W. M. 1983. Microbial enzymes and biotechnology: Applied Science Publishers

García, O.Y.B., 2016. Producción de arabinosilanos de pericarpio de maíz mediante el uso de solventes, cavitación hidrodinámica y tratamiento enzimático. Universidad Autónoma de Querétaro.

Garrote, G., Dominguez, H. y Parajo, J. C. 1999. Hydrothermal processing of lignocellulosic materials. *Holz roh werkst*, 57, 191-202.

Gonzalez Barrera Herbert Rafael, 2005. simulación del proceso de producción, extracción y purificación de amilasas obtenidas de la fermentación de los efluentes del nixtamal. Universidad Autónoma de Yucatán

Groover, M. P., de la Peña Gómez, C. M., & Sarmiento, M. Á. M. 1997. Fundamentos de Manufactura Moderna: Materiales, Procesos Y Sistemas: Pearson Educación.

Haghi, A. K. 2011. Food Science: Research and Technology: Apple Academic Press.

Harman, G. E., and Kubicek, C. P. 2002. *Trichoderma And Gliocladium*: Enzymes, Biological Control and commercial applications: Taylor & Francis.

Harris, D. C., Navarro, V. B., & Murcia, Á. B. 2006. Análisis químico cuantitativo.

Hendriks, A. T. W. M., & Zeeman, G. 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 100(1), 10–18.

Hofrichter M. 2000. Manganese peroxidases: enzymatic combustion of lignin (in German). *BioSpektrum*, 6, 198–199.

Kovacs K. 2009. Production of cellulolytic enzymes with *Trichoderma atroviride* mutants for the biomass-to-bioethanol process. Sweden: Lund University.

Kuhad, R. C., & Singh, A. 2007. Lignocellulose Biotechnology: Future Prospects: I.K. International Publishing House.

Kumar, R., Wyman, C.E., 2009. Effect of xylanase supplementation of cellulase on digestion of corn stover solids prepared by leading pretreatment technologies. *Bioresour. Technol.* 100, 4203–4213.

- Liu, C. y Wyman, C. E. 2003. The effect of flow rate of compressed hot water on xylan, lignin and total mass removal from corn stover. *Ind Eng Chem Res* 42,5409-5416
- López B., J. García y M. Feria 2010, Biorrefinería de materiales lignocelulósicos. *Eucalyptus globulus*, Universidad de Huelva, Huelva, España.
- López P. O, Guevara Lara F, Bello Pérez LA. 2009. La nixtamalización y el valor nutritivo del maíz. *Ciencias*, 92-93:60-70.
- Lynd LR, Weimer PJ, van Zyl WH. 2002. Pretorius IS. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol Mol Biol*; 66(3):506–77.
- Machado, J. E. O. 2001 Características físico mecánicas y análisis de calidad de granos: Univ. Nacional de Colombia.
- Martínez, C. C. y Valverde, M. E. 2009. Biocombustibles: biomasa lignocelulósica y procesos de producción, 1246–1270.
- Martínez, J. M. R., Lora, E. E. S., & González, L. N. L. 2015. Bioenergía: Fuentes, conversión y sustentabilidad: José María Rincón Martínez, Electo Eduardo
- Medina, A.C.M., 1996. Determinación de las condiciones de operación de un reactor para la aplicación de digestión anaerobia al agua residual del cocido de maíz. Universidad Autónoma de Yucatán, Facultad de Ingeniería.
- Melo, V., Ruiz, V. M., & Cuamatzi, O. (2007). Bioquímica de los procesos metabólicos. Reverté. Retrieved from
- Miravete, A., Cuartero, J., Compuestos, A.E. de M., 2003. Materiales compuestos, Materiales compuestos 03. Antonio Miravete.
- Mondragón, M. 2004. Estudio comparativo de cambios estructurales y funcionales en almidones de maíz nixtamalizado, 35–40.

- Morrison, R. T., & Boyd, R. N. 1998. Química orgánica. Pearson Educación.
- Nidetzky B, Steiner W, Hayn M, Claeysens M. 1994. Cellulose hydrolysis by the cellulases from *Trichoderma reesei*: a new model for synergistic interaction. *Biochem J*; 298:705–10.
- Nogués, F. S. 2010. Energía de la Biomasa (volumen I). Prensas de la Universidad de Zaragoza.
- Paliwal, R. L., Food and Agriculture Organization of the United, N., Granados, G., Lafitte, H. R., Violic, A. D., & Marathée, J. P. 2001. El Maíz en los trópicos: mejoramiento y producción: Fao.
- Pandey, A., 2011. Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes. Academic Press.
- Pena, A. 1988. Bioquímica. Limusa.
- Pérez, E. M. 1997. Las energías renovables: un enfoque político-ecológico: Los Libros de la Catarata.
- Polanco-Jaime, Alejandro y Trinidad Flores Méndez 2008, Bases para una política de I&D e innovación de la cadena de valor del maíz, Foro Consultivo y Científico, a.c., México.
- Qi M, Jun H-S, Forsberg CW. 2007. Characterization and synergistic interactions of *Fibrobacter succinogenes* glycoside hydrolases. *Appl Environ Microbiol*; 73:6098–105
- Red Española De Compostaje, R. E. D. E. 2014. Residuos agrícolas I.1: Mundi-Prensa.
- Restrepo, M. L. P. 2004. Notas de clase. Bioquímica ruminal. Universidad Nacional de Colombia.

Sagarpa (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación) 2010. Sistema de Información Agropecuaria y Pesquera (siap), México, 1 de marzo de 2010.

Salmones, D., K. N. Waliszewski y G. Guzmán. 1996. Use of some agro-industrial lignocellulose by-products for edible mushroom *Volvariella volvacea* cultivation. Revista internacional de contaminación ambiental 12: 69-74

Sánchez, Reyes Rocio, A.G.A., Monica, S.G., 2010. Aislamiento de microorganismos presentes en residuos agroindustriales. Rev. Salud pública y Nutr. 1.

Saval, S., 2012. Aprovechamiento de Residuos Agroindustriales: Pasado, Presente y Futuro. BioTecnología 16, 14–46

Savala, S. 2012. Aprovechamiento de Residuos Agroindustriales : Pasado , Presente y Futuro. BioTecnología, 16(2), 14–46.

Shallom, D., Golan, G., Shoham, G., Shoham, Y., 2004. Effect of dimer dissociation on activity and thermostability of the α -glucuronidase from *Geobacillus stearothermophilus*: dissecting the different oligomeric forms of family 67 glycoside hydrolases, J. Bacteriol, 6928-6937.

Teeri TT. 1997. Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. Tibtech; 15:160–7

Togores, J. H. 2011. Tratado de enología I: Mundi-Prensa.

Tu, Y. 2014. Pretreatments to enhance the digestibility of wheat straw, 3(1), 26–34.
Van der Maarel MJE, van der Veen B, Uitdehaag JCM, Leemhuis H, Dijkhuisen L. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. J. Biotechnol. 2002; 94: 137-155

Van Dyk, J.S., Pletschke, B.I., 2012. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes—Factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnol. Adv.* 30, 1458–1480.

Valdez-Vazquez I, Acevedo-Benitez J A & Hernandez-Santiago C 2010 Distribution and potential of bioenergy resources from agricultural activities in Mexico. *Renew. Sust. Energy Rev.* 14: 2147-2153

Vela, N. A. C. 2006. *Glosario de Biotecnología*: Uaa.

Velilla, J. P. D. 2005. *Sistemas de energías renovables*: Paraninfo.

Wongwilaiwalin, S., Rattanachomsri, U., Laothanachareon, T., Eurwilaichitr, L., Igarashi, Y., & Champreda, V. 2010. Analysis of a thermophilic lignocellulose degrading microbial consortium and multi-species lignocellulolytic enzyme system. *Enzyme and Microbial Technology*, 47(6), 283-290.

Woodward J. 1991. Synergism in cellulase systems. *Bioresour Technol*; 36:67–75.

Yarema, K. J. 2005. *Handbook of Carbohydrate Engineering*: CRC Pres

Yoshida, T., Tsubaki, S., Teramoto, Y., & Azuma, J. 2010. Optimization of microwave-assisted extraction of carbohydrates from industrial waste of corn starch production using response surface methodology. *Bioresource Technology*, 101(20), 7820–6.

Yúfera, E. P. 1995. *Química orgánica básica y aplicada: de la molécula a la industria*: Reverté.

V. Artículo ¹

Análisis del sistema biocatalítico producido por el consorcio microbiano MP-06 degradador de pericarpio de maíz nixtamalizado.

Autores: Maritza Anahí García Gonzalez¹, Araceli González Burgos², Mónica Noel Sánchez González^{2*}.

1.- Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad autónoma de Yucatán, Carretera Mérida -Xmatkuil Km. 15.5 Apdo., Itzimná, 97100 Mérida, Yuc

2.- Facultad de Ingeniería Química. Universidad Autónoma de Yucatán, Periférico-Lic. Manuel Berzunza Norte Km. 33.5 TC 13615, Chuburná de Hidalgo Inn, 97203 Mérida, Yuc

Correo: monica.sanchez@correo.uady.mx

Aspectos principales

- El consorcio MP-06 degrada el 61% del pericarpio de maíz nixtamalizado
- La producción máxima de hemicelulasas es de 484 U/ g de residuo
- Las enzimas que tienen una acción endo son las que presentan una mayor producción durante el proceso de degradación para el caso de los dos grupos de enzimas evaluados.
- Se propone la acción sinérgica de xilanasas y celulosas para la separación de polisacáridos en una primera etapa del proceso de degradación del PMN.

¹ Nota: El texto fue elaborado acorde con las normas editoriales de la revista Bioresource Technology

Resumen

El uso de consorcios microbianos resulta efectivo para degradar lignocelulosa, por eso surge el interés de conocer las posibles interacciones durante el proceso de biodegradación. En este estudio se encontró que el consorcio PM-06 logró la degradación del 61% del PMN. Las enzimas con mayor producción fueron las α -amilasas (847 U/g de residuo) seguido por las endo-xilanasas (484 U/g de residuo). Los niveles de producción de estas últimas se encontraron en niveles mayores a los sintetizados por algunos hongos. Del grupo de las celulosas, las enzimas con actividad endo fueron producidas en mayor proporción. El análisis de los componentes del pericarpio residual indica que no fue necesario una alta actividad enzimática. El consorcio PM-06 inicialmente solubiliza sustratos que posteriormente son hidrolizados para que a través de la acción de diferentes actividades permita su hidrólisis total. Dentro de los géneros microbianos importantes en la degradación se encontró a *Paenibacillus*.

Palabras claves: Consorcio microbiano, pericarpio de maíz nixtamalizado, lignocelulosa, degradación enzimática sinérgica, *Paenibacillus*

Abstract

The use of microbial consortia is an effective tool for lignocellulose degradation. Because of this is important know the interactions during the biodegradation process. In this study, it was found that the consortium PM-06 achieved the degradation of 61 % of the PMN. α -Amylase was the highest enzymatic activity synthesized (847 U/g of residue), followed by endo-xylanase (484 U/g of residue), the latter was produced at levels close to fungi. The cellulases group, the enzymes with endo activity was produced in greater proportion. The analysis of the components of the residual pericarp indicates that a high enzymatic activity was not necessary. Apparently, the PM-06 consortium initially solubilizes substrates that are subsequently hydrolyzed so that through the action of different activities allow their total hydrolysis. One of the microbial genera important found in the MP-06 consortio is *Paenibacillus*.

Key words: Microbial consortia, pericarp of nixtamalized maize, lignocellulose, synergistic enzymatic degradation, *Paenibacillus*.

1 Introducción

El pericarpio de maíz nixtamalizado (PMN) es un residuo derivado del proceso de nixtamalización, principalmente compuesto en orden descendente por xilano, celulosa, almidón, arabinano, proteína y lignina (Rostro et al., 2014). La concentración de azúcares en pericarpio indica que es un sustrato importante en la producción de azúcares fermentables. Sin embargo, la lignina junto con la celulosa y la hemicelulosa, se encuentran en la pared celular vegetal formando redes con una disposición regulada a nivel nano estructural, difícil de degradar (Martínez et al., 2015).

La lignocelulosa puede ser degradada por métodos térmicos, químicos y biológicos (Medina-Morales et al., 2011). Los métodos biológicos hasta el momento son los menos eficientes y usualmente requieren la aplicación de pre tratamientos (químicos o térmicos), con la finalidad de remover la lignina, hidrolizar la hemicelulosa a azúcares fermentables y reducir la cristalinidad de la celulosa para liberar glucosa (Cuervo et al., 2001; Kumar and Wyman, 2009; Garrote et al., 1999). La hidrólisis enzimática es deseable debido a que no genera subproductos tóxicos y no requiere altas presiones y temperaturas (Dagnino et al., 2012). Las preparaciones enzimáticas comerciales utilizadas en la degradación de lignocelulosa, son de origen fúngico, producidas por cultivos axénicos. Sin embargo, en la naturaleza la degradación de la lignocelulosa ocurre a través de comunidades microbianas. Las comunidades microbianas o consorcios microbianos ofrecen mayor diversidad metabólica que los cultivos axénicos ya que ensamblan las capacidades bioquímicas de diferentes microorganismos con el fin de degradar lignocelulosa (Barreto and Anaguano, 2014). Se han reportado algunos estudios en donde a través de consorcios bacterianos se ha logrado la degradación de materiales lignocelulósicos tales como el algodón, paja de arroz, rastrojo de maíz y bagazo de caña de azúcar, obteniendo porcentajes de degradación que van del 51 al 99% (Hui et al. 2013; Feng et al. 2011 Wongwilaiwalin et al. 2010). Otros estudios enfocados al análisis biocatalítico de diversos consorcios obtenidos de diferentes fuentes son evaluados en la

capacidad de producción de enzimas y degradación de residuos lignocelulósicos como es el caso de Cortes-Tolalpa et al., 2016 que evaluaron tres consorcios microbianos obtenidos de diferentes fuentes y determinaron que la variación de las enzimas depende del sustrato.

Los consorcios microbianos realizan la degradación de la lignocelulosa a través de múltiples sistemas enzimáticos específicos para cada uno de sus componentes (Wongwilaiwalin et al., 2010).

En la Hidrólisis de la hemicelulosa interfieren distintos tipos de enzimas hidrolíticas, entre las que se ubican las endo-xilanasas (Red española de compostaje, 2014), β - xilosidasas (Klein and Eveleigh, 1998), α -L-arabinofuronosidasa (Bajpai, 2014); la presencia de diversas enzimas dependerá de los sustituyentes que se presenten en la cadena de xilano, los cuales varían de acuerdo al origen del residuo y al procesamiento.

La celulosa es hidrolizada por enzimas denominadas celulasas, que pueden actuar secuencial o intermitentemente sobre su sustrato. Dentro de la celulasas se encuentran las endo-glucanasas, las exo-glucanasas, también denominadas celobiohidrolasas (Teeri, 1997) y las β - glucosidasas (Fogarty, 1983).

La acción de las enzimas no se realiza de forma aislada. La actividad de algunas enzimas sobre un sustrato puede facilitar la participación de otras sobre el mismo u otro diferente. Es decir, las enzimas pueden actuar de forma sinérgica y esta característica dependerá de las enzimas involucradas y/o del sustrato. (Nidetzky et al., 1994; Van Dyk and Pletschke, 2012). Hasta la fecha son relativamente pocos los estudios relacionados con consorcios microbianos degradadores de lignocelulosa. En estos estudios se ha identificado a los microorganismos que conforman a la comunidad, el potencial degradador sobre diferentes materiales y se ha analizado el secretoma y el metatranscriptoma con el fin de entender su funcionamiento. A pesar de que en estos estudios se aporta información acerca del proceso degradativo, la estructura de los residuos lignocelulósicos y los consorcios es diversa por lo que los mecanismos de degradación pueden variar también. Hasta el momento no se han realizado estudios bioquímicos relacionados

con la producción de actividades enzimáticas y su acción sobre el sustrato. Con el fin de comprender el mecanismo por el cual un consorcio nativo (PM-06) realiza la degradación de PMN, en el presente estudio se cuantificó la producción de hemicelulasas y celulasas, las transformaciones ocurridas en el sustrato por acción de estos sistemas enzimáticos y la dinámica de la población durante el proceso.

2 Materiales y Métodos

2.1 Obtención y enriquecimiento del consorcio nativo

El PMN fue donado por Harinera de Yucatán S.A. de C.V. (MASECA). El enriquecimiento del consorcio nativo PM-06, consistió en la incubación de 1g de pericarpio en 25 mL de una solución estéril de extracto de levadura (20 g/L) en agua destilada. Los cultivos se incubaron por siete días a 37 °C y 150 rpm. Después de la incubación, se separaron los sólidos por filtración y el cultivo enriquecido del consorcio microbiano obtenido se conservó a -20°C. .

2.2 Estabilización del consorcio

Para la estabilización del consorcio PM-06 se realizaron resiembras consecutivas a partir del consorcio enriquecido. Las resiembras se iniciaron inoculando una cantidad de células equivalente a 7 mg de proteína e incubando por siete días a 37 °C a 150 rpm. Posteriormente se evaluó la estabilidad funcional a través de la medición de la degradación de sólidos totales y la estructural por medio del análisis del 16S ADN por electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE por sus siglas en inglés).

2.3 Degradación de sólidos totales

Se determinó midiendo la cantidad de PMN residual después de 7 días de cultivo. Para lo cual, el contenido de los matraces fue filtrado al vacío bajo condiciones de esterilidad, utilizando papel filtro de tamaño de poro medio y de peso seco

conocido. El papel filtro y los sólidos retenidos fueron secados a 85 °C por 24 h o hasta obtener el peso constante. Se utilizó como control un medio de cultivo sin inocular. El cálculo de los sólidos degradados se realizó utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de sólidos degradados} = (\text{PSC}-\text{PSD}) * 100 / \text{PSC}$$

Dónde:

PSC: peso seco del control sin inocular

PSD: es el peso seco de los sólidos no degradados.

2.3 Análisis del 16s ADN por DGGE.

El 16S ADN fue amplificado a partir de ADN metagenómico (ADNm_g). Los amplicones obtenidos fueron analizados por DGGE.

La extracción del ADN_mg del consorcio PM-06 se realizó de acuerdo a la metodología establecida por González-de la Cruz et al., 2011, utilizando 1 mL de cultivo del consorcio microbiano.

La amplificación del fragmento 16S ADN_r se realizó a través del kit Bioline (Biolase® DNA Polymerase) utilizando los iniciadores universales para bacteria 518r (ATTACCGCGGCTGCTGG) y gc338f (ACTCCTACGGGAGGCAGCAG) al cual se le adicionó una secuencia rica en GC en el extremo 5' (Muyzer et. al. 1993). La mezcla de reacción tuvo una concentración final de: 1X de buffer de reacción (10mM Tris-HCl [pH 8.8]), 200 mM de cada dNTP, 3 mM de MgCl₂, 1U de Taq polimerasa, 0.2 mM de cada iniciador (gc338f y 518r) y 50 ng del templado de ADN_mg en un volumen final de 25 µl. Las condiciones de amplificación incluyeron: ciclo inicial de desnaturalización a 90°C durante 10 minutos seguido de 40 ciclos a 95°C por 1 minuto, 65°C por 45 segundos y 72°C por 1min, por último una extensión final de 72°C por 1 minuto. El producto amplificado fue visualizado por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.

La DGGE se realizó en un equipo DCODE “Universal Mutation Detection System” (BioRad), con geles de 16 cm x 16cm x 1mm. La separación de los productos de PCR obtenidos de cada resiembra consecutiva del consorcio nativo MP-06 se corrieron en un gel de poliacrilamida al 6% (p/v) de acrilamida-bisacrilamida (37.5:1), con el gradiente de desnaturalización del 30 al 70% urea-formamida. La electroforesis se corrió a 75V durante 16h a 60°C en buffer TAE 1X (2M trizma base, 1M ácido acético glacial, 50mM EDTA [pH 8.0]). La tinción del gel se realizó con el colorante SYBR Gold (Molecular Probes Inc.) y se visualizó con un equipo foto-documentador Gel Doc XR system (BioRad) con el programa Quantity One (BioRad imaging systems).

2.4 Cinética de crecimiento, degradación del PMN y producción de enzimas.

La cinética se realizó utilizando un medio de cultivo con 40 g/L de pericarpio y 20 g/L de extracto de levadura, incubando a 37 °C a 150 rpm. El cultivo fue inoculado con el paquete celular obtenido de una resiembra estable y fue monitoreado cada 24 h, durante siete días. Se proporcionó seguimiento a la cinética a través de la determinación de azúcares reductores, actividades enzimáticas y crecimiento microbiano

2.4.1 Determinación de azúcares reductores

Los azúcares reductores producidos durante la fermentación fueron medidos utilizando ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1957) La reacción consistió en mezclar 100 µl del sobrenadante del cultivo y 100µl del reactivo DNS. La mezcla fue calentada a ebullición por 5 minutos para posteriormente ser enfriada en agua helada. Finalmente, después de agregar 1 mL de agua destilada, la absorbancia de las muestras fue leída a 540 nm, en un espectrofotómetro UV/VIS. Los cálculos de concentración se realizaron utilizando una curva estándar de xilosa con concentraciones en el intervalo de 0.02 a 0.1 mg/mL.

2.4.2 Preparación de extractos enzimáticos

Los cultivos fueron filtrados a través de papel filtro de tamaño de poro medio. El filtrado obtenido, que contenía el sobrenadante y el paquete celular, fue centrifugado a 19,812 xg, por 10 min a 4 °C para separarlos. Las actividades enzimáticas que se describen a continuación se determinaron en el sobrenadante del cultivo obtenido después de la centrifugación.

2.4.2.1 Determinación de actividad hemicelulasa

2.4.2.1.1 Endo-xilanasasa

La actividad endoxilanasasa se determinó utilizando una solución de xilano de haya (Sigma) al 2% en buffer fosfatos de sodio 0.1 M, pH 6.5. La reacción se inició al adicionar 25 µl del extracto enzimático (sobrenadante) a 900 µl de sustrato y 75 µl de buffer fosfato de sodio 0.1M. La mezcla se incubó a 60 °C por 15 min y la reacción se detuvo al adicionar 100 µl de la solución de DNS (Miller, 1957) el control se determinó usando como mezcla de reacción 25 µl de sobrenadante y 90 µl de buffer. La reacción de los azúcares reductores y el DNS se realizó bajo las condiciones anteriormente descritas. Una unidad de endoxilanasasa se definió como la cantidad de enzima que cataliza la producción de 1 µmol de xilosa por minuto.

2.4.2.1.2 β-Xilosidasa

La actividad β-xilosidasa se midió utilizando 250 µl de 4-nitrofenil-β-D-xilopiranosido (Sigma) 25 mM en buffer fosfato de sodio 0.1M a pH 6.5. El sustrato fue incubado por 5 min para mantenerlo a la temperatura del ensayo. Posteriormente se adicionaron 250 µl del sobrenadante diluido 1:2 con buffer fosfato de sodio 0.1M; la reacción control se preparó agregando 250 µl de sobrenadante y 250 µl de buffer fosfato de sodio 0.1M. La reacción se incubó a 60 °C por 10 min, transcurrido el tiempo se detuvo adicionando 500 µl de Na₂CO₃ 100 mM. La liberación de p-nitrofenol se midió por espectrofotometría a 400 nm. Una unidad de actividad de β- Xilosidasa se definió como la cantidad de enzima que cataliza la producción de 1 µmol de p-nitrofenol por minuto.

2.4.2.1.3 α -L -Arabinofuranosidasa

La actividad α -L-arabinofuranosidasa se determinó utilizando 4-nitrofenil- α -L-arabinopiranosido (Sigma) como sustrato. La reacción consistió en agregar 250 μ l de sobrenadante diluido 1:2 con buffer fosfato de sodio 0.1M y 250 μ l de sustrato previamente calentado; la reacción control se preparó agregando 250 μ l de sobrenadante y 250 μ l de buffer fosfato de sodio 0.1M. La reacción se incubó durante 10 min a 60 °C, transcurrido el tiempo se detuvo con la adición de 500 μ l de Na₂CO₃ 100 mM. La producción de p-nitrofenol se determinó como fue definida en la sección 2.4.2.1.2. Una unidad de α -L-arabinofuranosidasa se definió como la cantidad de enzima que produce 1 μ mol de p-nitrofenol a partir de 4-nitrofenil- α -L-arabinopiranosido, por minuto.

2.4.2.2 Actividad celulasas

2.4.2.2.1 Endo-glucanasa

Para determinar la actividad endo-glucanasa, se utilizó carboximetilcelulosa (CMC) como sustrato. Para la reacción 500 μ l del sobrenadante fueron incubados por 15 min con 1 mL de CMC 1 % (p/v), en 500 μ l de buffer citrato de sodio 0.1 M, pH 4, a 40 °C, la reacción control consistió en adicionar 500 μ l de sobrenadante y 1.5 mL de buffer citrato de sodio 0.1M. La reacción se detuvo al incorporar 100 μ l de la solución de DNS (Miller, 1957). Los azúcares reductores producidos se midieron como se describió anteriormente. Una unidad de endo-glucanasa se definió como la cantidad de enzima que genera 1 μ mol de glucosa por minuto.

2.4.2.2.2 Exo-glucanasa

Para determinar la actividad exo-glucanasa se utilizó 4-nitrofenil- β -D-celobiosido (Sigma) en buffer citrato de sodio 0.1M, pH 4. Para iniciar la reacción, se agregaron 100 μ l de sustrato y 50 μ l de sobrenadante, para el control se agregaron 50 μ l de sobrenadante y 100 μ l de sustrato y se incubaron a una temperatura de 40°C durante 10 minutos. La reacción se detuvo con la adición de 1ml de NaCO₃ 100 mM y se enfriaron en hielo por 5 min. Una unidad de exo-

glucanasa fue definida como la cantidad de enzima que genera 1 μmol de p-nitrofenol a partir de p-nitrofenil- β -D-celobiosido por minuto.

2.4.2.2.3 β -Glucosidasa

La actividad β -glucosidasa se determinó utilizando p-nitrofenol- β -D-glucopiranosido 1mM como sustrato en buffer citrato de sodio 0.1M pH 4. La reacción se inició tal y como se describió en la sección 2.4.2.2.2.

Una unidad de β -glucosidasa se define como la cantidad de enzima que genera 1 μmol de p-nitrofenol a partir de p-nitrofenol- β -D-glucopiranosido por minuto.

2.4.2.3 α -Amilasa

Para la determinación de la actividad α -amilasa, se utilizó como sustrato almidón marca Técnica química, S.A. al 1% (p/v) en buffer fosfatos de sodio 0.1 M, pH 6.9 en la mezcla de reacción se adicionó 3.95 mL de buffer fosfato de sodio 0.1M, pH 6.9 y 0.05 mL de sobrenadante y 2 mL de almidón, en la mezcla control se agregó 5.95 mL de buffer y 0.05 de sobrenadante. La reacción se inició por la adición de la enzima al sustrato e incubando a 40 °C por 15 min. La reacción se detuvo por la adición de DNS y la absorbancia de los azúcares reductores se midió a 540 nm. Una unidad de α -amilasa se definió como la cantidad de enzima que genera 1 μmol de glucosa a partir de almidón por minuto.

2.4.3 Análisis del crecimiento del consorcio microbiano

La determinación del crecimiento de la población que integra el consorcio MP-06 se realizó con la medición de la concentración de proteína por el método de Peterson, 1977. El paquete celular obtenido después de centrifugación fue resuspendido con 1 mL de NaOH 0.5M y se incubó a 75°C por 5 minutos, transcurrida la incubación se añadió 100 μl de ácido desoxicólico (DOC) al 0.15% p/v, se mezcló por inversión y se dejó incubar nuevamente por 10 minutos a

temperatura ambiente, seguidamente se adicionó 100 µl de ácido tricloroacético (TCA) al 72% v/v, la mezcla se agitó vigorosamente y se centrifugó a 10621 xg por 15 minutos el sobrenadante se descartó y la pastilla se resuspendió en 1 mL de agua destilada, de esta suspensión se tomó por cada medición una alícuota de 100 µl a la cual se le adicionó 500 µl de una solución de cobre-tartrato-carbonato (CTC), SDS y NaOH 0.25% v/v, la mezcla se incubó por 30 minutos y las muestras se leyeron en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 750 nm. Las absorbancias fueron interpoladas a una curva de calibración de albumina sérica bovina (BSA) en un rango de concentración final de 5 a 100 µg sometida al mismo procedimiento.

2.4.4 Hidrólisis ácida cuantitativa de PMN

Para la identificación y cuantificación de los azúcares que componen el PMN, fue necesario realizar una hidrólisis ácida cuantitativa (HAC) en dos etapas (Rostro et al., 2014). En la primera etapa el PMN se incubó con H₂SO₄ al 72% (p/p) para transformar los polisacáridos a oligómeros. En la segunda etapa los oligómeros se transformaron a monómeros al utilizar ácido sulfúrico al 4% (p/p).

Mediante la determinación de la concentración de estos monómeros se calculó el contenido en polisacáridos de la muestra inicial. Al finalizar la HAC quedó un residuo sólido denominado lignina de Klason.

2.4.5 Cromatografía de líquidos de alta resolución

El análisis de los azúcares presentes en los hidrolizados se realizó por cromatografía de líquidos de alta resolución con detector de índice de refracción (CLAR-IR). Las muestras después de ser neutralizadas con BaCO₃ y filtradas a través de membranas de PVDF de 0.45 µm fueron inyectadas en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución, equipado con una columna Phenomenex RPM-Monosaccharide (00H-0135-K0) y un detector de índice de refracción. Los azúcares en las muestras fueron resueltos en 45 min utilizando como fase móvil agua grado HPLC, a un flujo de 0.6 mL/min y 80°C.

2.5 Análisis estadístico

Las actividades enzimáticas, el porcentaje de degradación, azúcares reductores y proteína se realizaron por triplicado procesando los datos obtenidos con un análisis estadístico descriptivo determinando promedios y desviaciones estándar.

Para la determinación de la estabilidad funcional se realizó un análisis de varianza de una sola vía donde el factor evaluado fue la resiembra y la variable de respuesta fue el porcentaje de degradación, con el programa STATGRAPHICS Centurion XVI.I.

2.6.2 Pirosecuenciación

La identificación de los principales microorganismos que conforman el consorcio se realizó por medio de una pirosecuenciación de ADNmg del consorcio estabilizado. La secuenciación se realizó en el Research and Testing Laboratory (Lubbock, TX, USA).

3 Resultados y Discusión

3.1 Estabilización funcional y estructural del consorcio

La coexistencia de microorganismos con nichos tróficos similares es el principal factor que confiere estabilidad funcional y resiliencia a los ecosistemas microbianos (Deng, 2012; Loreau et al., 2001). Desafortunadamente, la modificación de los ecosistemas puede generar inestabilidad, ocasionando modificaciones en la función y en la proporción de las especies microbianas que componen a la comunidad. Debido a esto es importante establecer parámetros de estabilidad para poder replicar modelos experimentales con el uso de microorganismos.

La estabilidad funcional del consorcio en este estudio se relacionó con el porcentaje de degradación evaluado al final del proceso de incubación durante las resiembras consecutivas. Como se puede apreciar en la tabla 4, el porcentaje de

degradación se incrementó a partir de la resiembra 2. El análisis estadístico ANOVA de un solo factor indicó que no existen diferencias entre la capacidad degradativa de las resiembras 2 y 3 pero si con la resiembra 1 ($p < 0.05$), por lo que se definió que el consorcio es estable a partir de la segunda resiembra.

Tabla 4. Estabilidad funcional del consorcio PM-06 determinada como la capacidad de degradación de sólidos del pericarpio de maíz.

| Número de resiembra | % de sólidos degradados (p/p) |
|---------------------|-------------------------------|
| 1 | 62.6 ± 0.84 ^a |
| 2 | 68.65 ± 0.49 ^b |
| 3 | 66.7 ± 1.2 ^b |

$n = 2 \pm DS$. Letras distintas denotan diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza de 95%

Por otra parte, los porcentajes de degradación obtenidos se encuentran dentro del intervalo reportado en la degradación de residuos lignocelulósicos con el uso de consorcios microbianos, los cuales se ubican entre un 51%-81% (Feng et al., 2011; Hui et al., 2013; Wongwilaiwalin et al., 2010).

A través del análisis por DGGE del 16S ADNr, se determinó la estabilidad estructural de las resiembras evaluadas funcionalmente. Como se aprecia en la Fig.8, en todas las resiembras se cuantificaron 25 unidades taxonómicas operacionales (OTU's por sus siglas en inglés); sin embargo, sólo en las resiembras 2 y 3 se aprecia el mismo perfil de intensidades.

La determinación de la estabilidad se estableció con base en criterios usados en otros estudios que implementan series de resiembra o analizan variaciones en diversidad y número de OTU's. Jiménez et al., 2014 definió la estabilización

usando el criterio del número de OTU's ya que en la resiembra 6 obtuvo 12 OTU's y no presento variaciones en la diversidad en cultivos posteriores; Peng et al., 2008 mantuvo el mismo principio para la determinación de la estabilización de su consorcio MC.

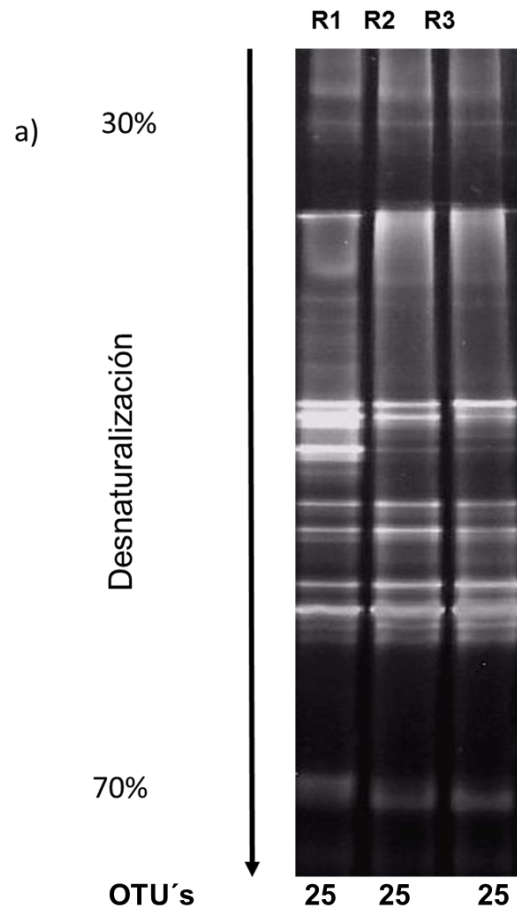


Fig. 8 Análisis por DGGE del 16S ADN amplificado del ADN metagenómico de las resiembras 1, 2 y 3. A. Gel de gradiente desnaturalizante de 30% a 70% en gel de acrilamida al 6%. B. 16S ADN amplificado

Con la determinación de la estabilidad estructural y funcional del consorcio PM-06 se estableció que los estudios para el análisis del proceso de degradación del PMN, se podrían realizar utilizando cultivos de la segunda o tercera resiembra.

3.2. Análisis del proceso de degradación: cinética de crecimiento, cuantificación de sólidos residuales y producción de enzimas.

Para poder obtener una visión amplia del desarrollo de la degradación de los residuos lignocelulósicos por la acción de microorganismos, es necesario analizar parámetros químicos y bioquímicos durante la transformación. Los datos adquiridos en este análisis nos permitirán aproximarnos al entendimiento del proceso de biodegradación.

Por lo anterior, se realizó una cinética en donde durante siete días se monitorearon parámetros como el crecimiento microbiano, porcentaje de degradación de los sólidos del PMN, composición del PMN residual, producción de azúcares reductores, así como la producción de hemicelulasas, celulasas y amilasas.

3.2.1 Cinética de crecimiento y degradación de los sólidos del PMN

En la Fig. 9 se presentan las gráficas de crecimiento microbiano y degradación de sólidos del PMN por el consorcio PM-06. Como se aprecia, los datos de la curva de crecimiento indican la presencia de 2 fases exponenciales, la primera finaliza después de 24 horas, mientras que la segunda finaliza en el día 3. Entre estas fases hay un período de latencia de 24 horas. Después del tercer día, se observa una fase estacionaria de 24 horas seguida por un decaimiento en el crecimiento celular. La presencia de dos fases logarítmicas es conocida como crecimiento diáuxico y generalmente se presenta en cultivos que metabolizan sustratos diferentes (Kammoun and Kriaaa, 2016) . En este caso se tienen diferentes microorganismos y un sustrato complejo, por lo que no es extraño que este tipo de fenómenos esté presente.

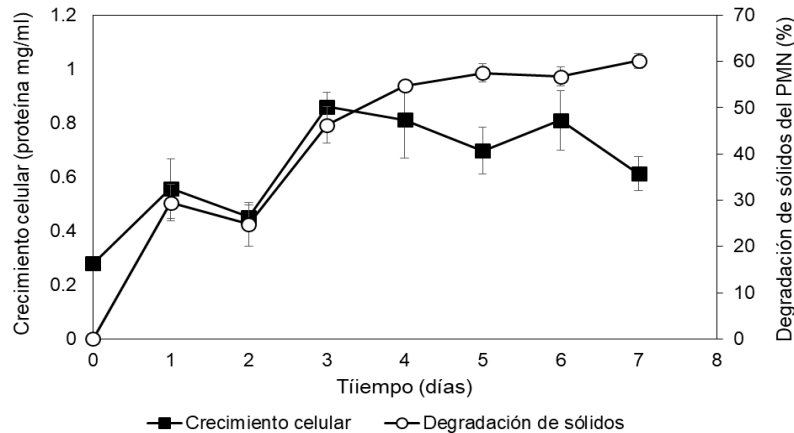


Fig. 9. Degradación de sólidos del PMN durante el crecimiento del consorcio microbiano PM-06

La disminución en el crecimiento celular puede ser debida a procesos de muerte o bien a esporulación ya que en los residuos de la nixtamalización se han encontrado algunas especies del género *Bacillus* (Rostro et al., 2014).

Por lo que respecta a la degradación, ésta tiene un comportamiento muy similar al crecimiento celular. Se ven dos fases exponenciales de degradación que coinciden con el crecimiento celular. En las primeras 24 horas de cultivo, se aprecia la mayor velocidad de degradación. Posterior a esta fase, se observa una disminución en la velocidad que coincide con la fase estacionaria de los microorganismos. Finalmente, después del quinto día, la degradación tuvo variaciones menores comparadas con el resto del proceso. La coincidencia entre los valores de degradación y crecimiento, indica que el proceso está asociado al crecimiento y que los azúcares producidos por la sacarificación de los componentes del PMN están funcionando como fuente de carbono para los microorganismos.

3.2.2 Producción de α -amilasas durante el proceso de degradación

En la Fig. 10 se presenta la producción de α -amilasas durante la degradación del PMN. Como se podrá observar, la mayor producción se presentó después de dos días, alcanzando una actividad de 847 U/g de residuo. Esta actividad se encuentra debajo de los valores reportados en la producción de α -amilasa por hongos a partir de residuos lignocelulósicos pero alta con respecto a la producción con el uso de bacterias (Balkan and Ertan, 2007; Murthy et al., 2009); sin embargo, es la actividad que se produjo en mayor proporción durante la degradación del PMN. La producción de α -amilasas es debida a la presencia de almidón en el residuo. Reportes en la literatura indican que la producción de α -amilasas está conectada con la presencia del sustrato, es decir el almidón induce la producción de estas enzimas (Abd-elhalem et al., 2015). A pesar de que hay varios azúcares presentes en el medio de cultivo, el más accesible por su solubilidad y disposición es el almidón, esto explica la presencia de una alta actividad amilolítica en los primeros días de degradación (270 U/g de residuo en 24 horas). La producción de las amilasas está asociada al crecimiento celular, a pesar de esto se puede ver afectada por condiciones ambientales como pH, temperatura y ser reprimida catabólicamente por la presencia de xilosa (Abd-elhalem et al., 2015).

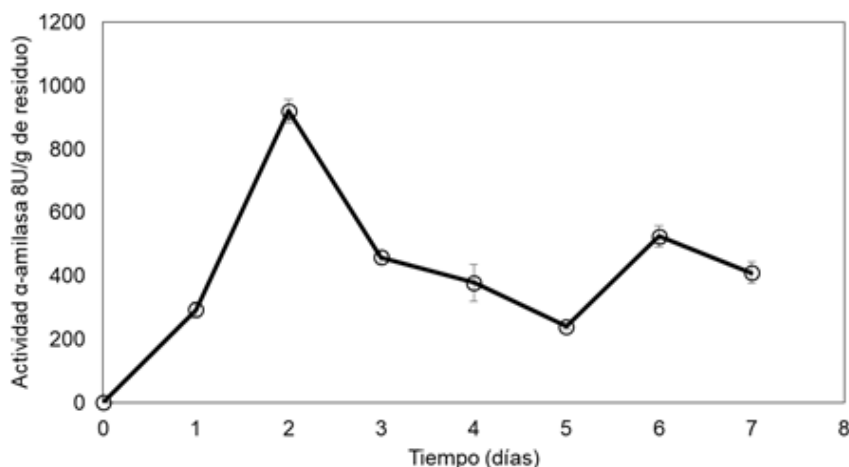


Fig. 10. Producción de α -amilasas por el consorcio PM-06 durante la degradación del PMN

3.3.3 Producción de xilanasas por el consorcio PM-06

En la Fig. 11 se presenta la producción de xilanasas durante el crecimiento del consorcio PM-06. La xilanasas que se produjo en mayor proporción fue la endo-xilanasas, alcanzando 484 U/g de residuo. Esta actividad se encuentra dentro de los niveles altos de producción por bacterias y hongos (Mihajlovski et al., 2015; Sarkar and Aikat, 2014; Szakacs and Tengerdy, 1997; Xia and Shan, 2015). Las endo-xilanasas son enzimas constitutivas cuya producción está asociada al crecimiento del microorganismo (Chakdar et al., 2016). De manera cronológica se puede apreciar que la actividad producida se incrementó en las primeras 24 horas y después disminuyó de manera significativa la velocidad de producción. Posteriormente, después de 5 días volvió a incrementar su producción alcanzando el valor máximo de actividad a los 7 días. Este incremento es coincidente con el incremento en el crecimiento celular (Fig. 9), por lo que posiblemente en este tiempo se favoreció el crecimiento de poblaciones productoras de endo-xilanasas.

Las β -xilosidasas y las α -L-arabinofuranosidasas son enzimas inducibles. Las β -xilosidasas son producidas en menor producción que las endo-xilanasas y su actividad es inducida por xilosa y xilano (Chakdar et al., 2016). Las actividades obtenidas son menores a las reportadas en otros trabajos (Rajoka, 2017). La producción de esta enzima se incrementó de manera significativa las primeras 24 horas, el mismo incremento se observó en las endo-xilanasas. Debido a que la actividad endo-xilanasas es 450 veces mayor a las 24 horas, es posible que los productos de su catálisis estén participando en la inducción de la producción de las β -xilosidasas. Este no es el caso de las α -L-arabinofuranosidasas cuya producción es menor que aunque aumentan a las 24 horas su máxima producción se aprecia a los 5 días.

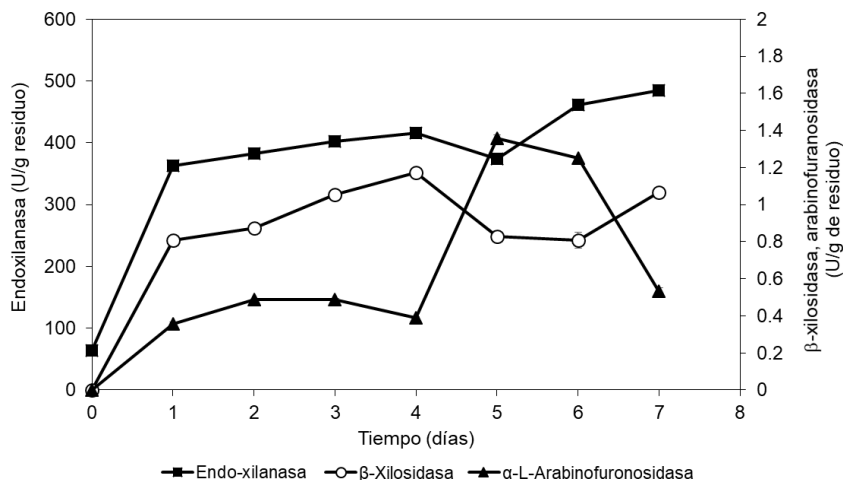


Fig. 11 Perfil de producción de Xilanasas durante el proceso de degradación

Existen evidencias en la literatura que indican una relación sinérgica entre estas enzimas. La actividad de la endo-xilanasas sobre el esqueleto de xilano se incrementa con la presencia de las α -L-arabinofuronosidasas ya que las primeras no son capaces de hidrolizar cadenas ramificadas (Deng and Wang, 2016; Raweesri et al., 2008) Rahman et al., 2003 encontraron que la hidrólisis secuencial de la hemicelulosa en el orden α -L-arabinofuronosidasa, endo-xilanasa, β -xilosidasa lograban una mayor eficiencia en la hidrólisis del sustrato.

3.3.4 Producción de celulosas por el consorcio PM-06

La producción de celulosas durante la degradación del PMN se presenta en la Fig. 12. Se puede apreciar que la producción de endo-glucanasas fue significativamente mayor que la de exo-glucanasas y la β -glucosidasas. Las producciones máximas obtenidas son mayores a las que se han reportado en la literatura con el uso de hongos y bacterias modificadas en sustratos específicos y complejos lignocelulósicos (Mihajlovski et al., 2015; Sarkar and Aikat, 2014; Szakacs and Tengerdy, 1997; Xia and Shan, 2015) las celulosas son inducidas por la presencia de celulosa y celobiosa (Coughlan, 1985). Aunque al inicio se presenta un incremento en la producción de endo-glucanasas, la actividad se disminuye posteriormente. Existe la posibilidad de que sea una actividad basal asociada a células y al disminuir la concentración celular, también disminuya la

actividad (Coughlan, 1985). Después de dos días, la actividad alcanzó su máximo (208 U/g) para después disminuir. Es interesante que la producción de exoglucanasas aunque es menor, fue posterior a la producción máxima de la actividad endo. Lo anterior crea la posibilidad de que la actividad endo genere productos que induzcan o estimulen la producción de exo-glucanasas. Las β -glucosidasas se incrementaron en las primeras 24 horas, permanecieron constantes hasta el día 4 y finalmente disminuyeron. Las actividades de estas últimas enzimas son bajas en comparación con las producidas con fuentes de carbono puras como celulosa, celobiosa, entre otras. Existen reportes en donde las actividades enzimáticas producidas con residuos agroindustriales son bajas (Dueñas et al., 1995; Wen et al., 2005)

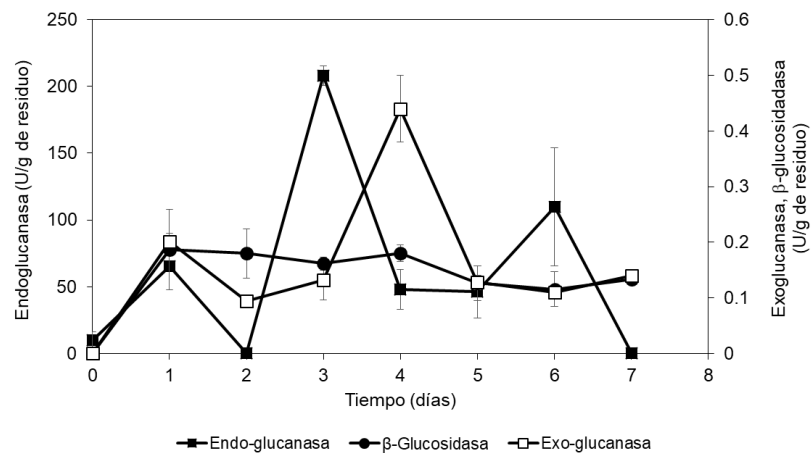


Fig. 12. Perfil de producción de celulasas durante el proceso de degradación del PMN

3.3.5 Análisis del perfil químico del PMN durante el proceso de degradación

En la Fig. 13 se puede apreciar que la disminución significativa en los componentes del pericarpio de maíz se presenta en las primeras 24 horas. Los principales componentes degradados son el glucano (almidón y celulosa) y hemicelulosa (xilosa y arabinosa), seguido de la lignina y los hidrolizados con menor velocidad fueron los urónicos, posiblemente porque se encuentran en menor proporción en el PMN. Después de 24 horas, se aprecia un período

estacionario y posteriormente hay un incremento aparente de las concentraciones. Este incremento puede deberse a un proceso de concentración de estos componentes en el residuo debido a la degradación de otros como los urónicos, proteínas, etc. Por lo que respecta a la lignina, esta se cuantifica como los sólidos residuales obtenidos después del proceso de hidrólisis ácida, por lo que su incremento puede ser debido a la presencia de residuos celulares no digeribles en ácido sulfúrico.

El análisis del perfil químico de degradación y la producción de enzimas indican que la Hidrólisis de la celulosa y la hemicelulosa presente en el PMN es simultánea, por lo que se presume la acción sinérgica de estas enzimas. El sinergismo enzimático es esencial para la degradación de los materiales lignocelulósicos, específicamente la disminución de la celulosa propicia el aumento en la productividad de las hemicelulasas.

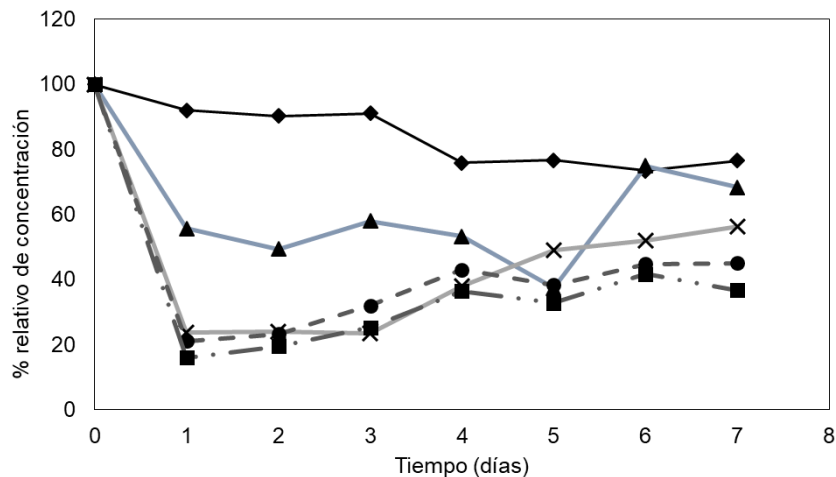


Fig 13. Perfil químico del pericarpio residual durante el proceso de degradación.

Se han realizado estudios referentes a las interacciones entre las enzimas, en los que se ha encontrado que las xilanasas contribuyen a la liberación de glucosa como de xilosa en las primeras 24 horas de degradación (Pauly et al., 1999)

Referente a esta acción sinérgica Selig, Knoshaug, Adney, Himmel, & Decker, 2008 concluyeron que existe un enmascaramiento de la celulosa hacia el xilano

permitiendo con esto la Hidrólisis simultánea. Murashima, Kosugi, & Doi, 2003 coincidieron con la afirmación de las interacciones simultáneas entre celulasas y xilanasas.

Con base en el análisis de otros estudios, Malgas et al. 2017 postulan que la alta cooperación establecida entre las enzimas en etapas iniciales resulta en una disociación de los diferentes polisacáridos y afirma que la sinergia va disminuyendo respecto al tiempo y a la disponibilidad que se tiene de la celulosa.

Los efectos sinérgicos que se presentan durante el proceso de degradación vuelven a los sustratos más susceptibles a la hidrólisis a través de la eliminación de obstáculos fijos y la creación de nuevos sitios de hidrólisis (Xu et al., 2013).

3.3.6 Producción de azúcares reductores

Durante el proceso de degradación se cuantificaron los azúcares reductores presentes en el sobrenadante. Estos azúcares son el resultado de la diferencia entre el proceso de producción a partir de la hidrólisis (solubilización) de los azúcares presentes en el PMN, menos el consumo por los microorganismos del consorcio. En la Fig. 14 se observa que durante los primeros 3 días se presenta un incremento en la producción de azúcares reductores. Aunque este período coincide con el crecimiento celular en el que se están utilizando los azúcares, el incremento indica que la velocidad de producción rebasa a la de crecimiento. Posteriormente en el día 4 se observa una disminución en los azúcares y es en este tiempo donde la degradación de sólidos presenta una meseta, es decir se dejan de solubilizar azúcares del PMN y los que estén solubles posiblemente se siguen desdoblado y consumiendo. El incremento final observado es resultado del decaimiento celular, el consumo de azúcares en este tiempo es mínimo y aparentemente las enzimas siguen desdoblado los azúcares solubles.

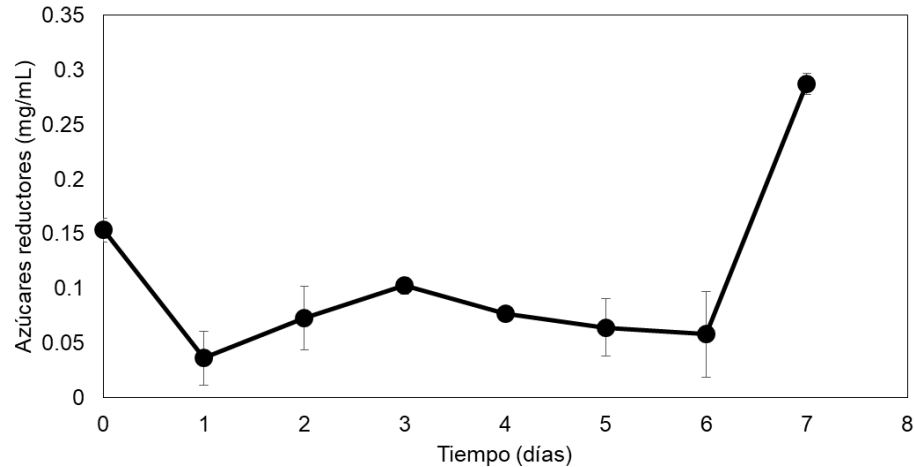


Fig. 14. Azúcares reductores presentes en el sobrenadante

3.3.2 Descripción de la diversidad microbiana

La diversidad genética de las poblaciones microbianas se analizó a través del patrón de bandeo obtenido a lo largo de la cinética degradativa del pericarpio por el consorcio PM-06 (Fig. 15).

Los patrones de bandeo muestran que la riqueza (Núm. De OTU's) no varía durante el proceso de degradación, pero si existen variaciones en la abundancia (Intensidad) de las poblaciones (OTU's) que intervienen en el proceso degradativo del PMN. Las bandas 5,7 y 8 presentan una abundancia mayor los días 3 y 4 mientras que la abundancia de las bandas 2,3 y 4 se intensifican a partir del día 5. La variación en la abundancia de algunas poblaciones específicas sugiere una relación con la producción de enzimas. En los días 5,6 y 7 la actividad de xilanasas aumenta por lo que se podría decir que las bandas que aumentan su intensidad (bandas 3,2 y 5) y las bandas que no se encuentran en los primeros días, representan poblaciones que tienen una acción directa sobre la hemicelulosa.

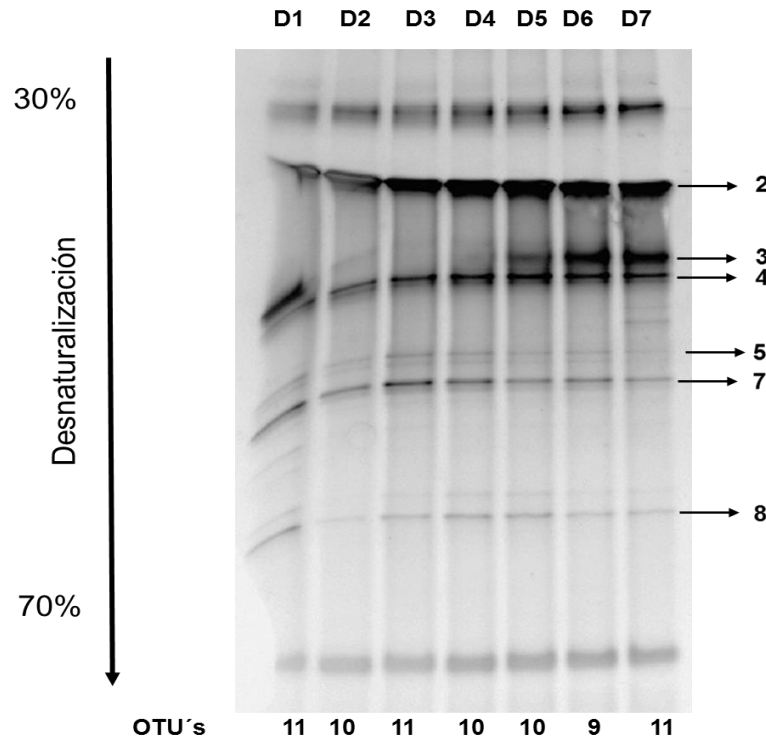


Fig. 15. Patrones de banda correspondiente a la cinética de degradación del PMN. Los cambios en las poblaciones presentes pueden ser debidos a las interacciones microbianas y disponibilidad de sustratos entre otras cosas (Díaz-Raviña et al., 1993; Jiang et al., 2017).

El análisis de la pirosecuenciación indicó la identidad del 99.9% de los microorganismos del consorcio, distribuidos en 9 géneros bacterianos (Fig.16). Los cuatro principales géneros fueron *Paenibacillus*, *Aneurinibacillus*, *Alicyclobacillus* y *Clostridium* y conforman el 98.6% de la composición microbiana del consorcio.

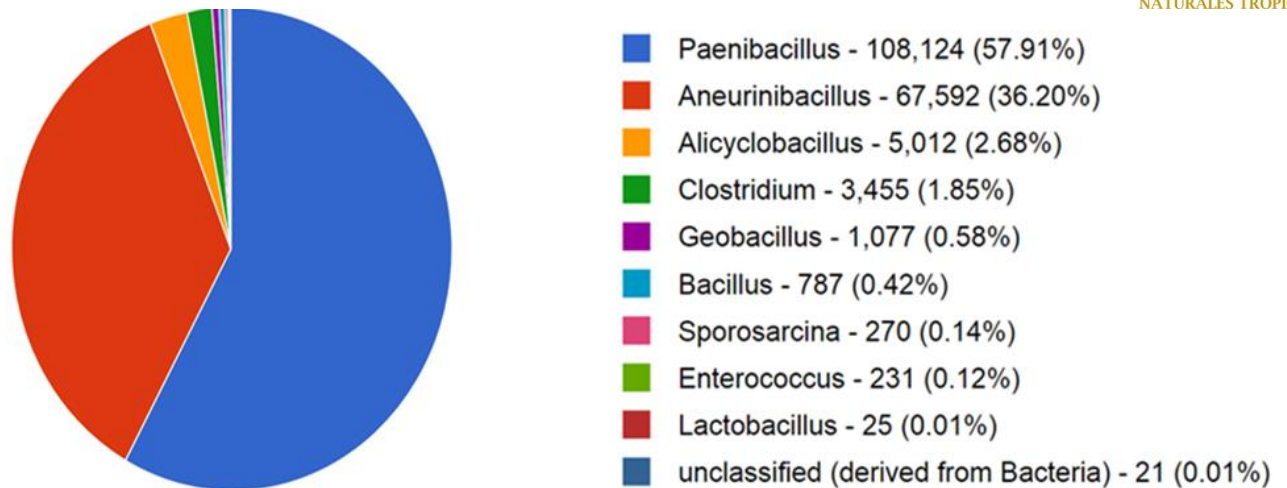


Fig. 16. Análisis de las poblaciones presentes en el consorcio MP-06

Los cuatro géneros bacterianos mencionados pueden relacionarse con las bandas 2,3, 4 y 5 (Fig. 15) en el patrón de bandeado de la cinética degradativa. En este sentido los resultados sugieren que *Paenibacillus* y *Alicyclobacillus* (Fig. 15, bandas 2 y 4, respectivamente) se encuentran presentes durante todo el proceso degradativo; sin embargo, su abundancia va ascendiendo durante el proceso. *Aneurinibacillus* (Fig. 15, banda 3) se encuentra presente al inicio del proceso (Fig.14), no se detecta en los días 2,3 y 4 y vuelve a detectarse del día 5 al 7 con un incremento paulatino de su abundancia. El Género *Clostridium* (Fig. 15, banda 5), se encuentra presente durante todo el proceso con ligeros cambios en la abundancia, la presencia de este género se podría atribuir a que la cantidad de oxígeno en el medio disminuye con respecto al tiempo de incubación además de tener diferentes condiciones en el fondo del matraz.

Aunque los demás géneros se encuentran en proporciones menores al 1% esto no demerita la importancia de su presencia y función como parte del consorcio, aunque en este trabajo no se tengan elementos suficientes para poner en claro su intervención en la degradación del pericarpio.

Existen estudios en los que se analiza la capacidad de producción de enzimas celulolíticas y xilanolíticas de *Paenibacillus*, *Alicyclobacillus* y *Clostridium* conocidos por su capacidad de degradar lignocelulosa y de ser potentes productores de celulosas y xilanasas o de ambas (Boyce and Walsh, 2015;

Emtiazi et al., 2007; Jin and Toda, 1989; Moracci, 2006; Orencio Trejo et al., 2016; Rani et al., 2004). Para el caso de *Aneurinibacillus* sólo existe un estudio en el cual se logró aislar *Aneurinibacillus thermoaerophilum* el cual presentó la capacidad de producir celulosas alcalinas (Somen Acharya and Chaudhary, 2012)

3.3.3 Modelo biocatalítico propuesto de la degradación de lignocelulosa

Derivado del análisis de la producción enzimática, composición de sólidos, crecimiento celular, porcentaje de degradación de sólidos y producción de azúcares reductores se puede apreciar que el proceso fundamental ocurre en las primeras 24 horas. Aquí se obtiene la mayor degradación de sólidos y mayor producción enzimática. Es de llamar la atención que algunas están en niveles realmente bajos por lo que se puede proponer que la cantidad de enzimas presentes no es tan importante como las relaciones sinérgicas existentes entre las mismas. Por otro lado, el perfil de degradación de los componentes del PMN y la producción de azúcares reductores en los primeros tres días indican que el proceso enzimático trabaja para cumplir dos funciones: la primera solubilizar los sólidos del PMN (celulosa y xilano) y la segunda es el desdoblamiento o hidrólisis de los azúcares solubles producidos (oligosacáridos de alto peso molecular) para que sean asimilados por los microorganismos presentes.

Con los resultados obtenidos se propuso un modelo hipotético presentado en la Fig. 17. En este modelo se contempla en la primera etapa que la celulosa es el primer polisacárido hidrolizado con la acción sinérgica de celulosas y xilanasas. Estas últimas actúan como palanca para desenredar los enlaces que se tienen entre la celulosa y la hemicelulosa (Kumar and Wyman, 2009). Lo anterior se propuso con base en la producción de celulosas como de xilanasas en las primeras 24 horas y en la disminución de los polisacáridos de glucosa y xilosa en el PMN. Por otro lado las α -L-arabinofuronosidasas al hidrolizar los sustituyentes de arabinosa logran la disminución porcentual de la degradación que encontramos en el primer día.

En la segunda etapa, las enzimas actúan de manera sinérgica pero ahora sobre los sustratos solubles liberando azúcares que a su vez funcionan como inductores o estimulantes de la síntesis de otras enzimas con lo que se complementa la degradación. Como se aprecia en el DGGE (Fig.15), existen cambios en las poblaciones durante la degradación por lo que estos incrementos y disminuciones en la producción de enzimas puede también estar ligada a procesos de comunicación celular que sólo se lograrán determinar con el análisis metagenómico del consorcio.

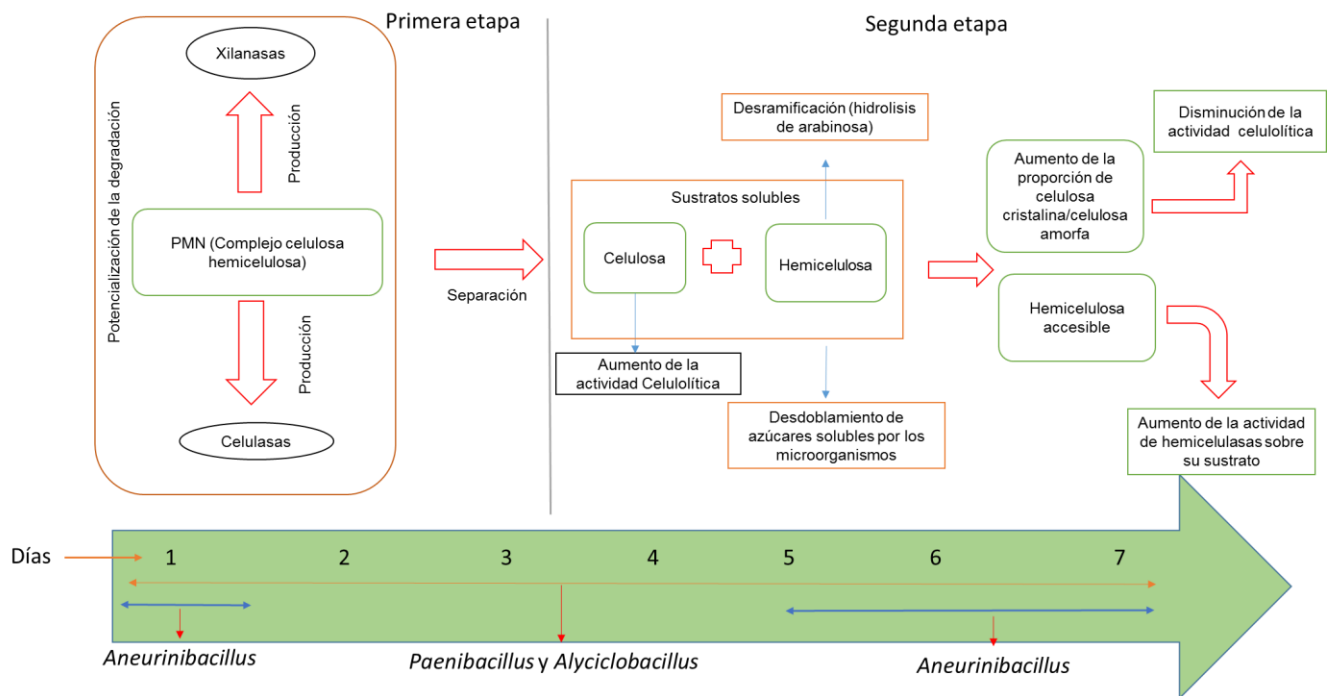


Fig. 17. Modelo hipotético del proceso de degradación del PMN

4. Conclusión

El proceso de degradación del pericarpio de maíz por el consorcio MP-06 se realiza por la acción sinérgica de las enzimas producidas. En este proceso los niveles de enzima producidos no son tan importantes como la acción sinérgica de las mismas.

En la degradación enzimática del PMN se aprecian dos etapas: la primera es la solubilización de sólidos generando oligosacáridos de alto peso molecular y en la segunda se propone una hidrólisis de los productos solubles para el consumo microbiano.

Los productos generados por la hidrólisis de los componentes del PMN inducen, estimulan o bien reprimen la producción de enzimas. Estos productos también pueden incidir en las interacciones microbianas presentes.

Este estudio nos proporciona un acercamiento inicial al entendimiento del proceso de degradación del PMN.

5. Referencias

- Abd-elhalem, B.T., Gamal, R.F., Abou-taleb, K.A., 2015. Production of amylases from *Bacillus amyloliquefaciens* under submerged fermentation using some Production of amylases from *Bacillus amyloliquefaciens* under submerged fermentation using some agro-industrial by-products. *Ann. Agric. Sci.*
- Bajpai, P., 2014. *Xylanolytic Enzymes*. Elsevier Science.
- Balkan, B., Ertan, F., 2007. Production of α -Amylase from *Penicillium chrysogenum* under Solid-State Fermentation by Using Some Agricultural By-Products. *Proizv. α -amilazeiz *Penicillium chrysogenum* Ferment. Poljopr. nusproizvoda.* 45, 439–442.
- Barreto, J.A.R., Anaguano, A.H., 2014. Evaluación del crecimiento y compatibilidad de hongos de la podredumbre blanca Evaluation of Growth and Compatibility of white Rot Fungi. *Rev. Cienc. en Desarr.* 5, 197–205.
- Boyce, A., Walsh, G., 2015. Characterisation of a novel thermostable endoglucanase from *Alicyclobacillus vulcanalis* of potential application in bioethanol production 7515–7525.
- Chakdar, H., Kumar, M., Pandiyan, K., Singh, A., Nanjappan, K., Kashyap, P.L., Srivastava, A.K., 2016. Bacterial xylanases: biology to biotechnology. *3 Biotech* 6, 150.
- Cortes-Tolalpa, L., Jiménez, D.J., de Lima Brossi, M.J., Salles, J.F., van Elsas, J.D., 2016. Different inocula produce distinctive microbial consortia with similar lignocellulose degradation capacity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 7713–7725.
- Coughlan, M.P., 1985. The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 3, 39–110.
- Cuervo, L., Folch, J.L., Quiroz, R.E., 2001. Lignocelulosa Como Fuente de Azúcares Para la Producción de Etanol. *13*, 11–25.

Dagnino, E.P., Roggero, F.S., Morales, W.G., Chamorro, E.R., Felissia, F.E., Area, M.C., Romano, S.D., 2012. Hidrólisis enzimática de cascarilla de arroz pretratada con ácido diluido para evaluar la eficacia de la etapa de pretratamiento. II Jornadas Investig. en Ing. del NEA y países limítrofes 5.

Díaz-Raviña, M., Acea, M.J., Carballas, T., 1993. Seasonal fluctuations in microbial populations and available nutrients in forest soils. *Biol. Fertil. Soils* 16, 205–210.

Emtiazi, G., Pooyan, M., Shamalnasab, M., 2007. Cellulase Activities in Nitrogen Fixing *Paenibacillus* Isolated from Soil in N-free Media, *World J Agricul Sci*.

Fogarty, W.M., 1983. *Microbial enzymes and biotechnology*. Applied Science Publishers.

González-de la Cruz, J.U., Delfin-González, H., de la Cruz-Leyva, M.C., Rojas-Herrera, R.A., Zamudio-Maya, M., 2011. Protocolo para la extracción de adn metagenómico bacteriano del langostino *Macrobrachium carcinus* L. *Trop. Subtrop. Agroecosystems* 14, 875–883.

Hui, W., Jiajia, L., Yucai, L., Peng, G., Xiaofen, W., Kazuhiro, M., Zongjun, C., 2013. Bioconversion of un-pretreated lignocellulosic materials by a microbial consortium XDC-2. *Bioresour. Technol.* 136, 481–487.

Jiang, L.-L., Zhou, J.-J., Quan, C.-S., Xiu, Z.-L., 2017. Advances in industrial microbiome based on microbial consortium for biorefinery. *Bioresour. Bioprocess.*

Jin, F., Toda, K., 1989. Applied microbiology Biotechnology Nutrient effects on cellulase production by the new species, *Clostridium thermocopriae* 3,597–600.

Klein, D., Eveleigh, D.E., 1998. Ecology of *Trichoderma*, *Trichoderma* and *Gliocladium* -Volume 1.

Kammoun, M., Kriaaa, R., 2016. Producing *Aspergillus tubingensis* CTM507 Glucose oxidase by Solid state fermentation versus submerged fermentation : process optimization and enzyme stability by an intermediary metabolite in relation with diauxic growth. *Chem. Technol. Biotechnol.* 91, 1540–1550.

Kumar, R., Wyman, C.E., 2009. Effect of xylanase supplementation of cellulase on digestion of corn stover solids prepared by leading pretreatment technologies. *Bioresour. Technol.* 100, 4203–4213.

Loreau, M., Naeem, S., Inchausti, P., Bengtsson, J., Grime, J.P., Hector, A., Hooper, D.U., Huston, M.A., Raffaelli, D., Schmid, B., Tilman, D., Wardle, D.A., 2001. Biodiversity and Ecosystem Functioning: Current Knowledge and Future Challenges. *Science* 80. 294, 804 LP-808.

Malgas, S., Thoresen, M., van Dyk, J.S., Pletschke, B.I., 2017. Time dependence of enzyme synergism during the degradation of model and natural lignocellulosic substrates. *Enzyme Microb. Technol.* 103, 1–11.

Martínez, J.M.R., Lora, E.E.S., González, L.N.L., 2015. Bioenergía: Fuentes, conversión y sustentabilidad. José María Rincón Martínez, Electo Eduardo Silva Lora.

Medina-Morales, M.A., Lara-Fernández, L., Aguilar, C.N., de la Garza-Toledo, H., 2011. Aprovechamiento de materiales lignocelulósicos para la producción de etanol como carburante. *Acta Química Mex.* 3, 35–41.

Mihajlovski, K.R., Davidović, S.Z., Carević, M.B., Radovanović, N.R., Šiler-marinković, S.S., Rajilić-stojanović, M.D., Dimitrijević-branković, S.I., 2015. Carboxymethyl cellulase production from a *Paenibacillus* sp. 329–338.

Miller, G.L., 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.* 31, 426–428.

Moracci, R.Æ.M., 2006. Characterization of a β -glycosidase from the thermoacidophilic bacterium *Alicyclobacillus acidocaldarius* 301–310. 1

Murthy, P.S., Naidu, M.M., Srinivas, P., 2009. Production of α -amylase under solid-state fermentation utilizing coffee waste 1246–1249.

Murashima, K., Kosugi, A., Doi, R.H., 2003. Synergistic Effects of Cellulosomal Xylanase and Cellulases from *Clostridium cellulovorans* on Plant Cell Wall Degradation Synergistic Effects of Cellulosomal Xylanase and Cellulases from

Clostridium cellulovorans on Plant Cell Wall Degradation. J Bacteriol. 185, 1518–1524.

Muyzer, G., de Waal, E.C., Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. 59, 695–700.

Nidetzky, B., Steiner, W., Hayn, M., Claeysens, M., 1994. Cellulose hydrolysis by the cellulases from *Trichoderma reesei*: a new model for synergistic interaction. Biochem. J. 298 Pt 3, 705–10.

Orencio Trejo, M., De la Torre Zavala, S., Rodriguez Garcia, A., Avilés Arnaut, H., Gastelum Arellanez, A., 2016. Assessing the Performance of Bacterial Cellulases: the Use of *Bacillus* and *Paenibacillus* Strains as Enzyme Sources for Lignocellulose Saccharification. Bioenergy Res. 9, 1023–1033.

Pauly, M., Albersheim, P., Darvill, A., York, W.S., 1999. Molecular domains of the cellulose/xyloglucan network in the cell walls of higher plants. Plant J. 20, 629–639.

Peng, G.U.O., Xiaofen, W., Wanbin, Z.H.U., Hongyan, Y., Xu, C., Zongjun, C.U.I., 2008. Degradation of corn stalk by the composite microbial system of MC1 20, 109–114.

Peterson, G.L., 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. Anal. Biochem. 83, 346–356.

Rahman, A.K.M.S., Sugitani, N., Hatsu, M., Takamizawa, K., 2003. A role of xylanase, α -L-arabinofuranosidase, and xylosidase in xylan degradation. Can. J. Microbiol. 49, 58.

Rajoka, M.I., 2017. Hyper-production of a thermotolerant β -xylosidase by a deoxy-D-glucose and cycloheximide resistant mutant derivative of *Kluyveromyces marxianus* PPY Sana Riaz 1–9.

Rani, D.S., Thirumale, S., Nand, K., 2004. Production of cellulase by *Clostridium papyrosolvens* CFR-703 629–632.

Raweesri, P., Riangrunrojana, P., Pinphanichakarn, P., 2008. α -L-Arabinofuranosidase from *Streptomyces* sp. PC22: Purification, characterization and its synergistic action with xylanolytic enzymes in the degradation of xylan and agricultural residues. *Bioresour. Technol.* 99, 8981–8986.

Red Española De Compostaje, R. E. D. E. 2014. *Residuos agrícolas I.1: Mundi-Prensa.*

Rostro, M., Sánchez-gonzález, M., Rivas, S., Moure, A., Domínguez, H., Carlos, J., 2014. Author's personal copy *LWT - Food Science and Technology* Non-isothermal autohydrolysis of nixtamalized maize pericarp: Production of nutraceutical extracts. *LET- Food Sci. Technol.* 58, 550–556.

Sarkar, N., Aikat, K., 2014. *Aspergillus fumigatus* NITDGPKA3 Provides for Increased Cellulase Production.

Selig, M.J., Knoshaug, E.P., Adney, W.S., Himmel, M.E., Decker, S.R., 2008. Synergistic enhancement of cellobiohydrolase performance on pretreated corn stover by addition of xylanase and esterase activities. *Bioresour. Technol.* 99, 4997–5005.

Somen Acharya, Chaudhary, A., 2012. Alkaline cellulase produced by a newly isolated thermophilic *Aneurinibacillus thermoaerophilus* WBS2 from hot spring, India. *African J. Microbiol. Res.* 6, 5453–5458.

Szakacs, G., Tengerdy, R.P., 1997. Lignocellulolytic enzyme production on pretreated poplar wood by filamentous fungi 13, 487–490.

Teeri, T.T., 1997. Crystalline cellulose degradation: New insight into the function of cellobiohydrolases. *Trends Biotechnol.* 15, 160–167.

Van Dyk, J.S., Pletschke, B.I., 2012. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes—Factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnol. Adv.* 30, 1458–1480.

Wongwilaiwalin, S., Rattanachomsri, U., Laothanachareon, T., Eurwilaichitr, L., Igarashi, Y., Champreda, V., 2010. Analysis of a thermophilic lignocellulose

degrading microbial consortium and multi-species lignocellulolytic enzyme system. *Enzyme Microb. Technol.* 47, 283–290.

Xia, P.L.J., Shan, Y., 2015. Comparative study of multi-enzyme production from typical agro-industrial residues and ultrasound-assisted extraction of crude enzyme in fermentation with *Aspergillus japonicus* PJ01. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 38, 2013–2022.

Xu, Q., Ding, S.-Y., Brunecky, R., Bomble, Y.J., Himmel, M.E., Baker, J.O., 2013. Improving activity of minicellulosomes by integration of intra- and intermolecular synergies. *Biotechnol. Biofuels* 6, 126.

6. Agradecimientos

Este trabajo fue realizado con presupuesto de los proyectos PRODEP-PTC-210 y SEP-CONACyT clave 242952.