



Hidrólisis parcial de cascarilla de cebada mediante el uso del extracto enzimático producido por *Penicillium* sp. HC1 para la obtención de xilosa

Sandra Marcela Bernal Ruiz  
Laura Constanza Gómez Sánchez

**Director:** Balkys Esmeralda Quevedo H.  
**Codirector:** Lilia Carolina Rojas Pérez

**Pontificia Universidad Javeriana**  
**Facultad de Ciencias**  
**Microbiología Industrial**  
**Bogotá D.C, Colombia**  
**2016**

### **NOTA DE ADVERTENCIA**

Artículo 23 de la Resolución Número 13 de Julio de 1946 “La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Sólo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”

## **Dedicado a:**

Nuestras familias por brindar apoyo y estar siempre cuando más los necesitábamos, por ser fuente motivación constante para hacer las cosas de la mejor manera, por ser luz y guía en nuestra vida y por todo el amor dispuesto a lo largo de esta.

## **Agradecimientos**

Agradecemos enormemente a nuestra directora Balkys Quevedo y a nuestra codirectora Carolina Rojas por hacer posible la realización de este proyecto de grado, por creer en nuestro trabajo, por hacer de cada día una oportunidad para aprender cosas nuevas y crecer tanto profesionalmente como personalmente, por ser ejemplo a seguir, por las palabras de motivación en el momento indicado y por la compañía en este camino recorrido.

A la profesora Ivonne Gutiérrez por sus enseñanzas y orientaciones con respecto a los datos estadísticos y manejo del software , a nuestras compañeras de laboratorio por la compañía y el apoyo en la realización de este trabajo, por siempre brindarnos una mano amiga y contribuir a nuestra formación.

## Tabla de contenido

<b>1. Introducción y justificación</b> .....	<b>9</b>
<b>1.1. Pregunta de investigación</b> .....	<b>11</b>
<b>2. Marco teórico</b> .....	<b>12</b>
<b>2.1. Proceso de producción de cerveza</b> .....	<b>12</b>
<b>2.2. Cascarilla de cebada</b> .....	<b>12</b>
2.2.1. Aplicaciones potenciales de la cascarilla de cebada .....	13
2.2.2. Xilitol .....	13
<b>2.3. Degradación de residuos lignocelulósico</b> .....	<b>14</b>
<b>2.4. Factores que afectan la actividad enzimática</b> .....	<b>15</b>
<b>3. Objetivos</b> .....	<b>16</b>
<b>3.1. Objetivo general</b> .....	<b>16</b>
<b>3.2. Objetivos específicos</b> .....	<b>16</b>
<b>4. Metodología</b> .....	<b>17</b>
<b>4.1. Adquisición y adecuación de la cascarilla de cebada</b> .....	<b>17</b>
<b>4.2. Producción del extracto enzimático</b> .....	<b>18</b>
4.2.1 Inoculo .....	18
4.2.2 Fermentación discontinua y obtención de extracto enzimático .....	18
<b>4.3. Efecto del pH y temperatura sobre la actividad enzimática</b> .....	<b>18</b>
<b>4.4. Hidrólisis parcial de la cascarilla de cebada</b> .....	<b>19</b>
4.4.1 Diseño experimental .....	19
4.4.2 Montaje y evaluación de los tratamientos .....	21
<b>4.5. Métodos analíticos</b> .....	<b>21</b>
4.5.1 Cuantificación de azúcares reductores y perfil de azúcares .....	21
4.5.2 Actividad endoxilanasas .....	22
<b>4.6. Análisis estadístico</b> .....	<b>22</b>
<b>5. Resultados</b> .....	<b>23</b>
<b>5.1. Efecto de pH y la temperatura en la actividad endoxilansas</b> .....	<b>23</b>
<b>5.2. Cinética de la hidrólisis parcial de cascarilla de cebada</b> .....	<b>23</b>
<b>5.3. Optimización por superficie de respuesta</b> .....	<b>26</b>
<b>6. Discusión de resultados</b> .....	<b>30</b>
<b>7. Conclusiones</b> .....	<b>34</b>
<b>8. Recomendaciones</b> .....	<b>35</b>
<b>9. Bibliografía</b> .....	<b>36</b>
<b>10. Anexos</b> .....	<b>40</b>
<b>10.1. Anexo 1. Curva patrón de xilosa con DNS</b> .....	<b>40</b>
<b>10.2. Anexo 2. Cromatograma de patrones de xilosa, arabinosa y glucosa</b> .....	<b>41</b>
<b>10.3. Anexo 3. Cromatograma del tratamiento 3, hora 6 (replica 1)</b> .....	<b>41</b>
<b>10.4. Anexo 4. Gráfica de Predicción vs. Datos reales del ANOVA (6 y 8 horas)</b> .....	<b>42</b>

## Lista de tablas

<b>Tabla 1.</b> Composición química cascarilla de cebada (Lote 2) .....	17
<b>Tabla 2.</b> Diseño experimental de tipo central compuesto .....	19
<b>Tabla 3.</b> Porcentajes de rendimiento y sacarificación de azúcares reductores a las 2, 6, 8 y 24 horas .....	25
<b>Tabla 4.</b> Análisis de la varianza (ANOVA) de la concentración de azúcares reductores a las 6 horas del proceso (modelo cuadrático) .....	26
<b>Tabla 5.</b> Análisis de la varianza (ANOVA) de la concentración de azúcares reductores a las 8 horas del proceso (modelo de segundo orden).....	27
<b>Tabla 6.</b> Optimización de liberación de azúcares reductores para las 6 y 8 horas del proceso.	29
<b>Tabla 7.</b> Optimización de liberación de azúcares reductores para las 6 y 8 horas del proceso, minimizando la dosis de endoxilanasas .....	29

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Estructura de arabinoxilano donde se muestra residuos de xilosa (A), con residuos de arabinosa (b), y algunas sustituciones de ácido ferúlico (C) - (Tomado de: Chávez et al. 2006).....	13
<b>Figura 2.</b> Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática (endoxilanasas) del extracto enzimático producido por <i>Penicillium</i> sp. HC1. (A) Actividad enzimática a 50°C bajo diferentes valores de pH. (B) Actividad enzimática a pH 4 bajo diferentes temperaturas .....	23
<b>Figura 3.</b> Cinética de la liberación de azúcares reductores a partir de la hidrólisis parcial de cascarilla de cebada haciendo uso del extracto enzimático producido por <i>Penicillium</i> sp. HC1. El proceso se llevó a cabo a 40°C, pH 4 y 150 rpm para cada uno de los tratamientos.....	24
<b>Figura 4.</b> Productividad de la liberación de azúcares reductores en la hidrólisis parcial de la cascarilla de cebada a través del tiempo de los distintos tratamientos. La hidrólisis se llevó a cabo a 40°C, pH 4 y 150 rpm.....	24
<b>Figura 5.</b> Efecto de la dosis de endoxilanasas y porcentaje de cascarilla de cebada sobre la concentración de azúcares reductores. Gráficas de respuesta de superficie de la concentración de azúcares reductores a las 6 (1) y 8 horas (2) y ecuaciones correspondientes; siendo (A) la dosis endoxilanasas y (B) el porcentaje de cascarilla de cebada .....	28

## Resumen

La industria cervecera es una de las más grandes a nivel mundial, produciendo más de 190 millones de kilolitros para el 2014. De esta se obtienen gran cantidad de co-productos como lo es la cascarilla de cebada, siendo este el más abundante. Este es un material rico en celulosa, hemicelulosa, proteína, lignina, entre otros. Hoy en día solo es utilizado como ingrediente en piensos animales, no obstante, tiene gran potencial como materia prima en diversas industrias y procesos de producción como lo son los procesos biotecnológicos, utilizando la cascarilla como sustrato para la generación de productos de valor agregado, p.e xilitol. Este es un azúcar-alcohol con múltiples beneficios como edulcorante terapéutico y bajo en calorías. Para este fin es necesario generar de la cascarilla un hidrolizado rico en los monosacáridos requeridos en el proceso de producción. La degradación se puede llevar a cabo mediante distintos procesos hidrolíticos ya sean enzimáticos, hidrotérmicos o químicos. El proceso de hidrólisis por enzimas lignocelulolíticas disminuye la contaminación, el consumo de energía y el uso de sustancias peligrosas al ser generadas por microorganismos como lo son los pertenecientes al género *Penicillium*.

En este trabajo de grado se determinaron las condiciones de temperatura, pH, tiempo de hidrólisis, dosis de la enzima endoxilanasas y porcentaje de cascarilla de cebada necesarios para obtener la mayor concentración de xilosa a partir de la hidrólisis del material con el extracto enzimático obtenido a partir de *Penicillium* sp. HC1 a escala de laboratorio. Para esto se evaluó la actividad endoxilanasas del extracto bajo diferentes valores de pH y temperatura, obteniendo la mayor actividad a pH 4 y 40°C. La influencia de la dosis de endoxilanasas y el porcentaje de biomasa en la liberación de azúcares reductores se determinó usando un diseño central compuesto (CCD), donde se evaluaron estos dos factores, cada uno con 2 niveles (+1 y -1), 2 puntos axiales (+1,5 y -1,5) y un punto central (0) con un total de 9 tratamientos y 29 experimentos incluyendo réplicas. Todos los tratamientos se evaluaron a las 2, 4, 6, 8, 10 y 24 horas. En cada hora de muestreo se determinó la concentración de azúcares reductores, la productividad, el porcentaje de sacarificación y rendimiento para así establecer la duración del proceso hidrolítico, siendo este entre las 6 y 8 horas. Se realizó un análisis ANOVA de dos vías a las 6 y 8 horas del proceso, ajustando los resultados a un modelo cuadrático y de segundo orden respectivamente. El análisis estadístico demostró que tanto el porcentaje de cascarilla, la dosis de endoxilanasas y la interacción entre ambos factores son términos que afectan significativamente la liberación de azúcares reductores (valor- $p < 0,05$ ), de forma positiva. No obstante, el término que mayor inciden sobre la variable de respuesta es el porcentaje de cascarilla. Se obtuvieron varias soluciones a la optimización de la concentración de azúcares reductores, estando entre ellas las condiciones del tratamiento 3 (1000 U g<sup>-1</sup> y 6%) donde el mejor tiempo resultó las 6 horas con 10,37 g L<sup>-1</sup> de azúcares reductores y 2,72 g L<sup>-1</sup> de xilosa.

## 1. Introducción y justificación

La cerveza se encuentra entre las cinco bebidas más consumidas a nivel mundial (Aliyu & Bala 2011, Steiner et al. 2015), fabricándose en el 2014 más de 190 millones de kilolitros de cerveza alrededor del mundo. En dicho año Colombia se posicionó como el cuarto productor de cerveza en Latinoamérica y ocupó el puesto 19 a nivel mundial, con una producción mayor a 2 millones de kilolitros de cerveza y un crecimiento del 26,3% en la producción en la última década (Kirin Beer University, 2015). No obstante, dicho crecimiento tiene un importante impacto a nivel ambiental debido al alto consumo de energía ( $\sim 126,9$  kWh/m<sup>3</sup> de cerveza) y grandes volúmenes de agua ( $\sim 49,9$  m<sup>3</sup>/m<sup>3</sup> de cerveza), además de la generación de numerosos residuos y co-productos derivados del proceso de producción (Mussatto et al. 2013, Olajire 2012). El co-producto más abundante de esta industria es la cascarilla de cebada, representando aproximadamente el 85% (p/p) del total (Steiner et al. 2015). Según Niemi et al. (2013) anualmente se generan más de 30 millones de toneladas de este material alrededor del mundo; en Colombia se estima una producción cercana a las 404.000 toneladas en base húmeda de cascarilla de cebada en el 2014 (Kirin Beer University, 2015, Steiner et al. 2015). Dicho material es usualmente desaprovechado al ser considerado un residuo de la industria, sin embargo, por su naturaleza la cascarilla de cebada puede ser fácilmente reciclada y reutilizada, permitiendo un manejo amigable con el ambiente (Mussatto et al. 2006, Reis et al. 2015, Waters et al. 2012).

La cascarilla de cebada es un material compuesto principalmente por lignina, celulosa, hemicelulosa y proteínas (Steiner et al. 2015, Wang et al. 2015). Gracias a su composición, gran abundancia y bajo costo, la cascarilla de cebada es reconocida por distintos autores como un recurso valioso para la industria, haciendo énfasis en la importancia de buscar alternativas de aprovechamiento de este tipo de co-productos (Aliyu & Bala 2011, Mussatto et al. 2013, Severini et al. 2015, Steiner et al. 2015, Waters et al. 2012). En la actualidad, la única aplicación de la cascarilla de cebada es la alimentación animal, no obstante, existe un creciente interés en su valor dentro de la alimentación humana (Reis et al. 2014, Waters et al. 2012), como material de construcción (Aliyu & Bala 2011) y para la producción de papel (Mussatto et al. 2006). Otras aplicaciones con gran potencial van encaminadas a su uso como materia prima en procesos biotecnológicos, siendo utilizado exitosamente como sustrato para el cultivo de distintos microorganismos a nivel de laboratorio y para la obtención de distintos compuestos con valor agregado como etanol, ácido láctico, ácido ferúlico, biogás, enzimas y xilitol, entre otros (Aliyu & Bala 2011, Mussatto et al. 2013, Steiner et al. 2015).

El xilitol es un edulcorante de gran interés en la industria de alimentos y farmacéutica al poseer solo el 60% de las calorías de la sacarosa y estar asociado a distintos beneficios a la salud como mejorar la salud dental, ayudar al control de la diabetes y pérdida de peso, entre otros. La cascarilla de cebada tiene un gran potencial como sustrato para la producción de xilitol debido a su alto contenido de xilosa (molécula precursora) ya que alrededor del 28 al 35% (peso seco) de este material corresponde a hemicelulosa, fracción constituida principalmente por

arabinosilanos (Aliyu & Bala 2011, Severini et al. 2015, Waters et al. 2012). Autores como Mussato & Roberto (2008) y Carvalheiro et al. (2006) han usado exitosamente la cascarilla de cebada como sustrato para la producción biológica de xilitol a nivel de laboratorio usando *Candida guilliermondii* y *Debaryomyces hansenii* respectivamente.

No obstante, para hacer uso de cualquier material lignocelulósico como sustrato en fermentaciones microbianas es necesario generar un hidrolizado fermentable rico en los monosacáridos requeridos en el proceso de producción, siendo necesario solubilizar estos a partir de los polímeros presentes en la biomasa para que se encuentren disponibles en mayor cantidad (Aliyu & Bala 2011, Camargo et al. 2015, Xiros et al. 2011). La degradación de la cascarilla de cebada puede llevarse a cabo mediante distintos procesos hidrolíticos ya sean enzimáticos, hidrotérmicos o químicos (en condiciones ácidas o álcali, alta temperatura y presión) (Mussatto et al. 2006, Rafiqul et al. 2014). Este último es el método más investigado y utilizado debido a su simplicidad y efectividad (Mussatto et al. 2006, Rafiqul et al. 2014), sin embargo el uso de enzimas lignocelulolíticas ganan valor por disminuir la contaminación, el consumo de energía y el uso de sustancias peligrosas (Motesshafi et al. 2016). Para llevar a cabo una hidrólisis enzimática completa y eficiente de los arabinosilanos presente en la cascarilla de cebada es necesario la acción de un complejo enzimático denominado “complejo xilanolítico” compuesto por diversas enzimas donde se destacan las endo-  $\beta$ -1,4-xilanasas o endoxilanasas (EC 3.2.1.8),  $\beta$ -xilosidasas (EC 3.2.1.37) y como enzimas de tipo accesorio:  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.55), acetil xilano esterasa (EC 3.1.1.72) y feruloil esterasa (EC 3.1.1.73) (Fanchini et al. 2016, Xiros et al. 2011).

Aún cuando el uso de enzimas se posiciona como alternativa a la hidrólisis química, es necesario determinar las condiciones y parámetros óptimos a los cuales se llevará a cabo la degradación del material lignocelulósico; la cantidad y mezcla de las enzimas, la absorción de la enzima, la recalcitrancia del material y las condiciones de reacción como la temperatura y el pH son variables que afectan considerablemente la hidrólisis de la biomasa. Lo anterior se ve potenciado por la complejidad y heterogeneidad que presenta la hemicelulosa lo que dificulta lograr altos niveles de sacarificación en tiempos de reacción cortos (Xiros et al. 2011). La hidrólisis parcial de la cascarilla de cebada para liberar xilosa y otros azúcares se ha realizado en trabajos previos con extractos enzimáticos provenientes de *Bacillus subtilis* (Motesshafi et al. 2016) y *Fusarium oxysporum* (Xiros et al. 2011), donde la optimización de las condiciones de degradación se centran en la dosis de las enzimas, el tiempo de reacción, la temperatura y el pH. Sin embargo no existen estudios con extractos enzimáticos obtenidos de *Penicillium* spp. a pesar de que especies de este género también poseen la maquinaria enzimática necesaria para la degradación de este material. Se ha reportado que *Penicillium janczewskii* expresa endoxilanasas,  $\beta$ -xilosidasas y  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa (Fanchini et al. 2016). También en un estudio previo a esta investigación se determinó que la cascarilla de cebada es un sustrato económico y promisorio para la producción extracelular de las enzimas endoglucanasas, celobiohidrolasas,  $\beta$  1,4-D-glucosidasas y endoxilanasas usando el hongo *Penicillium* sp. HC1 (Correa 2016). Por lo



anterior, en este trabajo de investigación se desea determinar las mejores condiciones de temperatura, pH, dosis de la enzima endoxilanasas y porcentaje de cascarilla para el proceso de hidrólisis enzimática de la cascarilla de cebada con el extracto enzimático obtenido a partir de *Penicillium* sp. HC1 a nivel de laboratorio.

### **1.1. Pregunta de investigación**

¿Cuáles son las condiciones que permiten la mayor liberación de xilosa a partir de la hidrólisis parcial de cascarilla de cebada haciendo uso del extracto enzimático obtenido de *Penicillium* sp. HC1?

## 2. Marco teórico y estado del arte.

### 2.1. Proceso de producción de cerveza

El proceso de producción de cerveza está compuesto de varias etapas como lo son el manejo de materias primas, malteado, molienda de la malta, enfriamiento del mosto, fermentación y maduración del filtrado, entre otras. Dentro de las principales materias primas que se usan en estas diferentes etapas, está la cebada (Mussatto et al. 2006).

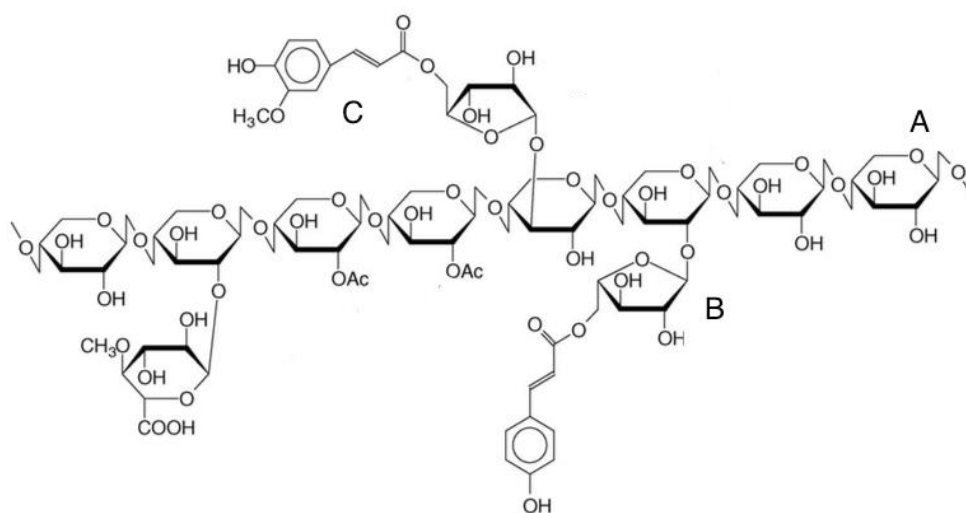
Para llevar a cabo la fabricación de la cerveza, esta materia prima (cebada malteada) debe pasar por un proceso de molienda y posterior mezcla con agua en ollas de cocción, donde se incrementa la temperatura gradualmente (empezando en temperaturas de 37°C hasta llegar a 78°C) con el fin de incentivar la hidrólisis enzimática de los componentes de la malta, este proceso se denomina maceración. Como resultado de este paso se obtiene un líquido dulce que se llama mosto. La parte del grano de cebada malteada insoluble que no se degradó, se deja reposar hasta que este forme un lecho sobre las ollas de cocción, lo cual sirve como un lecho filtrante para separar el mosto. El mosto que fue filtrado anteriormente se lleva a procesos de evaporación y enfriamiento. Luego este es usado como sustrato de fermentación para la producción de cerveza, mientras que la parte sólida (que forma el lecho filtrante) compone la cascarilla de cebada (Mussatto et al. 2006).

### 2.2. Cascarilla de cebada

La cebada maltera (*Hordeum vulgare*) es una especie de cereal, que pertenece al grupo de las plantas monocotiledóneas y a la familia taxonómica *Poaceae*. Comercialmente este cereal es valorado por la cosecha de sus granos que son empleados en la mayoría de los casos como materia prima para la industria de la cerveza (Holopainen 2015). El grano de cebada es rico en almidón y proteína, las cuales se encuentran distribuidas en tres estructuras que son el germen, el endospermo y la cubierta del grano. Esta última estructura corresponde al residuo más abundante de la industria cervecera. A su vez está compuesta por tres capas que son la envoltura de la semilla, las cubiertas del pericarpio y la cáscara.

La cascarilla de cebada está constituida principalmente por celulosa, hemicelulosa, lignina y proteína. Los porcentajes están entre 13-21%, 21-35%, 12-16% y 19-30% respectivamente. Así mismo este material es rico en distintos monosacáridos como xilosa, glucosa y arabinosa (Aliyu & Bala, 2011). La fracción de hemicelulosa está constituida principalmente por arabinoxilanos (Aliyu & Bala 2011, Severini et al. 2015, Waters et al. 2012), los cuales son un grupo heterogéneo de polisacáridos formados por una cadena lineal de xilosas unidas por enlaces  $\beta$ -(1-4) a la cual se enlazan residuos de arabinosa con enlaces  $\alpha$ -(1-2) o  $\alpha$ -(1-3) y pueden encontrarse sustituciones de ácido ferúlico unidos por enlaces éster (Severini et al. 2015)

(Figura 1). Según Laine et al. (2015), la xilosa presente en la cascarilla de cebada que emplearon corresponde aproximadamente al 17,1% de la materia seca.



**Fig. 1.** Estructura de arabinoxilano donde se muestra residuos de xilosa (A), con residuos de arabinosa (b), y algunas sustituciones de ácido ferúlico (C) (Tomado de: Chávez et al. 2006)

### 2.2.1. Aplicaciones potenciales de la cascarilla de cebada

En la actualidad el único uso que se le da a la cascarilla de cebada es para la fabricación de piensos animales. Sin embargo, este material tiene diversas aplicaciones potenciales que permiten su aprovechamiento como lo es su utilización dentro de la alimentación humana gracias a su alto contenido nutricional y el potencial de los arabinoxilanos como prebióticos (Reis et al. 2014, Waters et al. 2012). Por otra parte, se ha propuesto su uso como material de construcción debido a sus características termoaislantes, fabricación de papel, producción de energía, material absorbente para retirar compuestos volátiles tóxicos (p.e Compuestos orgánicos volátiles) y como materia prima en procesos biotecnológicos, entre otros (Aliyu & Bala 2011, Mussatto et al. 2006). El campo que más ha estudiado los diferentes usos de la cascarilla de cebada es el de los procesos biotecnológicos; donde se puede encontrar la producción de enzimas, biomasa y otros productos como antioxidantes, monosacáridos, oligosacáridos, xilitol, arabitol, bioetanol, biogás, ácido láctico o la producción de proteínas y lípidos funcionales (Xiros & Christakopoulo 2012, Mussato et al. 2007).

### 2.2.2. Xilitol

El xilitol es un edulcorante bajo en calorías de gran interés en la industria de alimentos que está asociado a distintos beneficios como mejorar la salud dental al ser un compuesto

anticariogénico, ayudar al control de la diabetes y pérdida de peso, además de mostrar efectos antimicrobianos y antiinflamatorios, incrementar la densidad ósea, entre otros. En la actualidad la producción de este edulcorante se realiza mediante la hidrogenación química de la xilosa, el cual es un proceso de alto costo y contaminante debido al uso de altas temperaturas (80-140°C) y altas presiones (>50 atm). No obstante, el xilitol puede ser producido a través de procesos netamente biotecnológicos haciendo uso de diversos microorganismos como *Candida guilliermondii*, permitiendo generar este compuesto a condiciones menos extremas (~30°C), siendo esta una alternativa más amigable con el ambiente y que ofrece disminuir los costos de producción (Camargo et al. 2015, Mussatto et al. 2005).

### 2.3. Degradación de residuos lignocelulósicos

Para llevar a cabo la biotransformación de un sustrato en algún producto se requiere la acción de enzimas, las cuales deben tener la capacidad de degradar el material lignocelulósico. En muchos casos, estas enzimas pueden ser producidas por diferentes microorganismos como bacterias, levaduras y hongos, y suelen ser extracelulares. Para la degradación de arabinoxilanos se requiere un grupo de enzimas glicanasas y esterases conocido como complejo enzimático xilanolítico que incluye enzimas como (Chávez et al. 2006):

- Endo-1,4- $\beta$ -xilanasas o endoxilanasas (E.C. 3.2.1.8) que hidroliza al azar la cadena principal de xilosa produciendo una mezcla de xilooligosacáridos.
- $\beta$ -Xilosidasas (E.C. 3.2.1.37) que liberan xilosa de los oligosacáridos cortos
- $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.55) que remueve los residuos de arabinosa de las cadenas laterales
- Feruloil esterases (E.C. 3.1.1.73) que remueve los ácidos fenólicos enlazados a los residuos de arabinosa

Para la sacarificación, es decir, para la liberación de azúcares de la cascarilla de cebada se reporta el uso de enzimas celulolíticas y xilanolíticas de diversos orígenes como lo son las enzimas producidas por *Fusarium oxysporum* F3 (Xiros et al. 2011) y de *Bacillus subtilis* D3d (Motesafi et al. 2016); adicionalmente se encuentra la utilización de distintas enzimas comerciales para la hidrólisis de los polisacáridos presentes en la cascarilla de cebada (Macheiner et al. 2003, Niemi et al. 2012).

*Penicillium* spp. son organismos filamentosos pertenecientes a la familia Trichomatiaceae, que poseen alta diversidad de enzimas con utilidad en la industria como las lipasas, proteasas, pectinasas, glucosa oxidasa y celulasas, entre otras (Gusakov & Sinitsyn 2012). Adicionalmente, se ha descrito que *Penicillium janczewskii* es productor del complejo de enzimas xilanolíticas, especialmente de las enzimas endo- $\beta$ -1,4-D-xilanasas y  $\beta$ -D-xilosidasas (Fanchini et al. 2010).

Así mismo, en especies como *P. echinulatum* se ha observado la producción de un complejo de  $\beta$ -glucosidasas termoestables y de endoxilanasas (Reis et al. 2013) y en *P. oxalicum* GZ-2 se ha reportado la producción de múltiples isoformas de endoxilanasas (Liao et al. 2015). Por su capacidad de generar estos tipos de enzimas, este microorganismo puede participar en la degradación de residuos lignocelulósicos (Carvalho et al. 2014) como lo es la sacarificación de hojarasca de maíz (Shi et al. 2011). En cuanto a *Penicillium* sp. HC1, este se ha reportado como productor de endoxilanasas, endoglucanasas, celobiohidrolasas y  $\beta$  1,4-D-glucosidasas sobre tamo de arroz (Sánchez 2013) y cascarilla de cebada (Correa 2016).

La degradación de estos residuos lignocelulosicos es un proceso oxidativo que requiere la acción de varias enzimas debido a su complejidad, donde además de incluir las enzimas mencionadas anteriormente, incluye enzimas como lo son la lacasa, lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa, las cuales pueden ser producidas por microorganismos como lo son los pertenecientes al género *Pleurotus* (Díaz et al. 2011).

#### **2.4. Factores que afectan la actividad enzimática**

Para que cada una de las enzimas que pueden ser generadas por un microorganismo actúen y degraden un sustrato, se les debe proporcionar ciertas condiciones para que este proceso se lleve a cabo. Algunos de estos factores que pueden alterar o favorecer la acción de una enzima corresponden al pH, temperatura, concentración de la enzima y concentración del sustrato, entre otros. Por ejemplo, en algunos estudios se ha descrito la actividad y estabilidad de enzimas en especies del género *Penicillium*. Lee y colaboradores (2010) evaluaron la producción de la enzima endo- $\beta$ -1,4-glucanasa por *Penicillium purpurogenum*, la cual mostró una actividad enzimática significativa a altas temperaturas (70° C y 60°C) y un pH óptimo de 5, en la investigación de Liao y colaboradores (2015) se describió la actividad enzimática y estabilidad de xilanasas producidas por *Penicillium oxalicum* sobre diferentes sustratos lignocelulósicos donde se observó que la actividad enzimática se mantuvo estable en un rango de pH entre 3-5 y una temperatura entre 50° y 55°C (donde se retuvo aproximadamente el 80% de actividad), lo cual deja ver que cada enzima tiene ciertas condiciones que favorecen o no su actividad.

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivo general**

Establecer las condiciones para la liberación de xilosa a partir de la hidrólisis parcial de cascarilla de cebada haciendo uso del extracto enzimático obtenido de *Penicillium* sp. HC1.

#### **3.2. Objetivos específicos**

1. Determinar el efecto del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática de las endoxilanasas presentes en el extracto enzimático producido por *Penicillium* sp. HC1
2. Establecer el tiempo de degradación de la cascarilla de cebada donde se obtenga la mayor liberación de xilosa.
3. Determinar la concentración de cascarilla de cebada y la dosis de endoxilanasas presente en el extracto enzimático que permita obtener la mayor liberación de xilosa.

## 4. Metodología

### 4.1. Adquisición y adecuación de la cascarilla de cebada

La cascarilla de cebada generada tras el proceso cervecero fue proporcionada en fresco por la planta industrial de Bavaria S.A ubicada en el municipio de Tocancipá, Cundinamarca. Dicha biomasa se sometió a un proceso de secado en un horno de convección a 50°C por 48 horas con el fin de disminuir el alto contenido de humedad que este presenta ( ~77-81%) a menos del 10%, para evitar el crecimiento de microorganismos durante su almacenamiento. Una vez seca la cascarilla, está fue molida mediante un molino de cuchillas con el fin de obtener partículas con un tamaño menor a 1mm. La cascarilla usada en esta investigación fue caracterizada (**Tabla 1**) mediante la técnica reportada por el Laboratorio Nacional de Energía renovable (NREL por sus siglas en inglés) para la determinación de la curva de concentración de lignina soluble en ácido por espectroscopia UV-Vis (Hyman et al. 2007).

**Tabla 1.** Composición química cascarilla de cebada (Lote 2)

Componente	Materia seca (%)
Proteína (N x 6.25)	17.2±0.4
Extractivos	12.6±0.5
Lignina ácido-insoluble	13.4±1.0
Celulosa	19.3±1.0
Hemicelulosa	30.1±0.4
Xilosa	20.7±0.4
Arabinosa	9.4±0.2
Grupos acetilo	0.2±0.008
Cenizas	3.5±0.1
Otros (por diferencia)	3.8±0.2

Realizado por Carolina Rojas

## 4.2. Producción de extracto enzimático

### 4.2.1. Inóculo

En este proyecto se utilizó un aislamiento de *Penicillium* sp. codificado como HC1, el cual fue obtenido de suelo rizosférico de un cultivo de arroz en Tolima, Colombia (Gutiérrez et al. 2012). A partir del banco de trabajo proveniente del cepario del Laboratorio de Biotecnología Aplicada de la Pontificia Universidad Javeriana se reactivó *Penicillium* sp. HC1 en medio agar papa dextrosa (PDA), con un tiempo de incubación de 8 días a 28°C. Culminado dicho tiempo se preparó una suspensión de conidios mediante la adición de 10 mL de solución salina (0.85% p/v) con Tween 80 (0,1% v/v) a cada caja sembrada para desprender los conidios y se filtraron los mismo a través de algodón estéril para retirar los restos de micelio. A esta suspensión de conidios se le realizaron lavados sucesivos con solución salina (0,85% p/v) con el fin de retirar trazas del medio de cultivo que pudiese impregnar los mismos. La suspensión ya lavada se ajustó a una concentración del orden de  $10^6$  conidios mL<sup>-1</sup> mediante recuentos en cámara de Neubauer, siendo esta suspensión el inóculo a utilizar en los cultivos subsecuentes.

### 4.2.2. Fermentación discontinua y obtención de extracto enzimático

La producción del extracto enzimático se llevó a cabo en matraces de 1L con un volumen efectivo de trabajo del 20%. A cada matraz se le adiciono 3% de la cascarilla de cebada previamente secada y molida junto con 180mL de una solución de sales compuesta de: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 g L<sup>-1</sup>; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,3 g L<sup>-1</sup>; MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0,83 g L<sup>-1</sup>; CaCl<sub>2</sub> 0,3 g L<sup>-1</sup>; FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0,005 g L<sup>-1</sup>; MnSO<sub>4</sub> 1,56 mg L<sup>-1</sup> y ZnSO<sub>4</sub> 1,4 mg L<sup>-1</sup> (Mandels & Weber, 1969) ajustado a pH 6. Se inoculó cada matraz con 20mL de la suspensión de conidios mencionada en el numeral 4.2.1. y se llevó a incubar durante 10 días a 150 rpm y 30°C (Correa 2016). Culminado el tiempo de incubación, el extracto crudo se separó por centrifugación a 8000 rpm durante 20 min a 7°C en una centrífuga Sorvall RC 6 Plus Thermo Scientific Co (Waltham, MA, USA). El sobrenadante fue filtrado en condiciones de esterilidad por membranas de 0,45 μm y 0,22 μm sucesivamente. Posteriormente se adicionó azida de sodio al 0,03% (p/p) al extracto enzimático y se almacenó a -20°C para su posterior uso (Faria et al. 2008). Se determinó de cada extracto la actividad enzimática de endoxilanasas y los azúcares reductores residuales del cultivo, como se describe en el ítem 4.5.

## 4.3. Efecto del pH y temperatura sobre la actividad enzimática

Diversos buffers (buffer citrato de sodio 0,1M pH 4 - 5 - 5,5 - 6 - 6,5 - 7 y buffer fosfato de sodio 0,1M pH 8) se utilizaron para evaluar el efecto del pH sobre la actividad endoxilanasas del extracto enzimático de *Penicillium* sp. HC1. Para ello se mezcló 50μl del extracto con 450μl de xilano de madera de haya (Beechwood en inglés) al 1% (p/v) preparado en los diferentes



buffers, siendo este el sustrato de la reacción enzimática. La reacción y medición de dicha actividad se llevó a cabo de la forma descrita en el numeral 4.5.2. adoptando la misma definición de la unidad de actividad enzimática. Con el pH en que se obtuvo la mayor actividad endoxilanasas se evaluó el efecto de la temperatura sobre la velocidad de la reacción siguiendo el mismo procedimiento descrito para el pH, pero en este caso se varió la temperatura de reacción en 30, 40, 50, 60 y 70°C, esto para determinar la temperatura a la que se obtiene mayor actividad endoxilanasas del extracto enzimático.

#### 4.4. Hidrólisis parcial de la cascarilla de cebada

##### 4.4.1. Diseño experimental

La influencia de la dosis de enzimas endoxilanasas y el porcentaje de cascarilla de cebada en la liberación de azúcares reductores se determinó usando un diseño central compuesto (CCD) establecido mediante el programa estadístico Desing-Expert Versión 7. De esta forma, se evaluaron los 2 factores mencionados, cada uno con 2 niveles (+1 y -1), 2 puntos axiales (+1,5 y -1,5) y un punto central (0), resultando en un total de 9 tratamientos y 29 experimentos con sus respectivas réplicas (cinco réplicas para el punto central y tres para los puntos axiales y los niveles) (**Tabla 2**). Todos los tratamientos se evaluaron en 6 tiempos, siendo estos: 2, 4, 6, 8, 10 y 24 horas con el fin de determinar la duración del proceso de hidrólisis enzimática. Las horas de muestreos fueron seleccionadas teniendo en cuenta el comportamiento de la concentración de azúcares liberados de la hidrólisis enzimática de materiales lignocelulosico a través del tiempo observadas en los estudios de Xiros et al. (2011) y Shi et al. (2011).

**Tabla 2.** Diseño experimental de tipo central compuesto

Factores	Código	Niveles codificados				
		+1,5	+1	0	-1	-1,5
Dosis de endoxilanasas (U g <sup>-1</sup> )	A	1145	1000	650	300	155
Cascarilla de cebada (%)	B	6,6	6	4,5	3	2,4

Tratamientos	Experimentos	Factores	
		A: Dosis (U/g <sup>-1</sup> )	B: Cascarilla (%)
1	1	1145	4,5
	2	1145	4,5
	3	1145	4,5
2	4	1000	3
	5	1000	3
	6	1000	3

Tratamientos	Experimentos	Factores	
		A: Dosis (U/g <sup>-1</sup> )	B: Cascarilla (%)
3	7	1000	6
	8	1000	6
	9	1000	6
4	10	650	2,4
	11	650	2,4
	12	650	2,4
5	13	650	4,5
	14	650	4,5
	15	650	4,5
	16	650	4,5
	17	650	4,5
6	18	650	6,6
	19	650	6,6
	20	650	6,6
7	21	300	3
	22	300	3
	23	300	3
8	24	300	6
	25	300	6
	26	300	6
9	27	155	4,5
	28	155	4,5
	29	155	4,5

A partir de la concentración de azúcares reductores liberados en los experimentos propuestos se calculó la productividad de los mismos, permitiendo conocer la concentración de azúcares que se liberaron por hora (Ecuación 1).

$$Productividad = \frac{g\ L^{-1}\ de\ AR\ obtenidos\ en\ la\ hidrólisis\ enzimática}{tiempo\ (h)} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Igualmente se calculó el porcentaje de rendimiento de azúcares reductores en la hidrólisis enzimática (Ecuación 2) y el porcentaje de sacarificación (Ecuación 3). Ambos parámetros permiten conocer cuán eficiente son los tratamientos en la liberación de los monómeros presentes en la cascarilla de cebada.

$$\% \text{ Rendimiento en la hidrólisis enzimática} = \frac{\text{g de AR obtenidos en la hidrólisis enzimática}}{100 \text{ g de materia prima}} \quad (\text{Ecuación 2})$$

$$\% \text{ Sacarificación} = \frac{\text{g de AR obtenidos en la hidrólisis enzimática}}{100 \text{ g de AR potenciales en la cascarilla}} \quad (\text{Ecuación 3})$$

Los azúcares reductores potenciales en la cascarilla se determinó partiendo de su caracterización (**Tabla 1**) y haciendo uso del factor de conversión de celulosa y hemicelulosa utilizado en el estudio de Shi et al. (2011) (Ecuación 4).

$$\text{g de AR potenciales en la cascarilla} = \frac{\text{g cascarilla} \cdot \frac{\text{g de celulosa} + \text{g hemicelulosa}}{100 \text{ g cascarilla}}}{0,9} \quad (\text{Ecuación 4})$$

#### 4.4.2 Montaje y evaluación de los tratamientos

Los tratamientos fueron llevados a cabo en matraces de 100mL con un volumen efectivo de trabajo del 20%. En cada matraz se adicionó el porcentaje de cascarilla de cebada previamente secada y molida correspondientes al tratamiento y se llevaron a esterilizar. Posteriormente se agregaron 20mL de una solución estéril con la dosis de la enzima endoxilanasas pertinente; la solución fue preparada mediante la dilución del extracto con buffer citrato a pH 4. Los matraces se colocaron en agitación a 150 rpm a 40°C. Las condiciones de temperatura y pH se seleccionaron tras realizar las actividades del numeral 4.3.

Los matraces se extrajeron en cada uno de los tiempos de muestreos definidos (muestreo destructivo) y su contenido se centrifugó a 10000 rpm por 15 minutos en una centrífuga Sorvall RC 6 Plus Thermo Scientific Co (Waltham, MA, USA). El sobrenadante fue filtrado por membrana de 0,45µm y las muestras se almacenaron inmediatamente en refrigeración. A partir del filtrado se determinaron los azúcares reductores y el perfil de azúcares por cromatografía líquida de alta eficacia del mejor tratamiento.

#### 4.5. Métodos analíticos

##### 4.5.1. Cuantificación de azúcares reductores y perfil de azúcares

En primera instancia se realizó la cuantificación de azúcares reductores mediante la técnica de del ácido 3,5-dinitrosalicílico o DNS (Miller 1959), calculando las concentraciones mediante una curva patrón realizada con xilosa. La determinación de las concentraciones de

glucosa, xilosa y arabinosa en el hidrolizado enzimático del tratamiento elegido se realizó por medio cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC por sus siglas en inglés) en un cromatógrafo con detector de índice de refracción (IR) y una columna Sugar Pack SZ5532(150 mm x 1.6 mm; Shodex) a 65°C, usando como fase móvil una mezcla compuesta por acetonitrilo - agua en proporción 80:20 a un flujo de 1 mL min<sup>-1</sup> y una inyección de muestra de 20 µL.

#### **4.5.2. Actividad endoxilanasas**

La actividad endoxilanasas o endo-1,4-B-D-xilano xilohidrolasa (EC 3.2.1.8) se determinó mezclando 50 µl de muestra con 450 µl de xilano de beechwood al 1% (p/v) en buffer citrato 50 mM (pH 5.3). La reacción enzimática se llevó a cabo a 50°C por 5 minutos (Bailey et al. 1992). La cantidad de azúcares reductores liberados se determinó por la técnica de DNS empleando xilosa como estándar. Una unidad de actividad endoxilanasas se define como la cantidad de enzima que libera 1 µmol de azúcares reductores equivalentes a xilosa por minuto a las condiciones del ensayo.

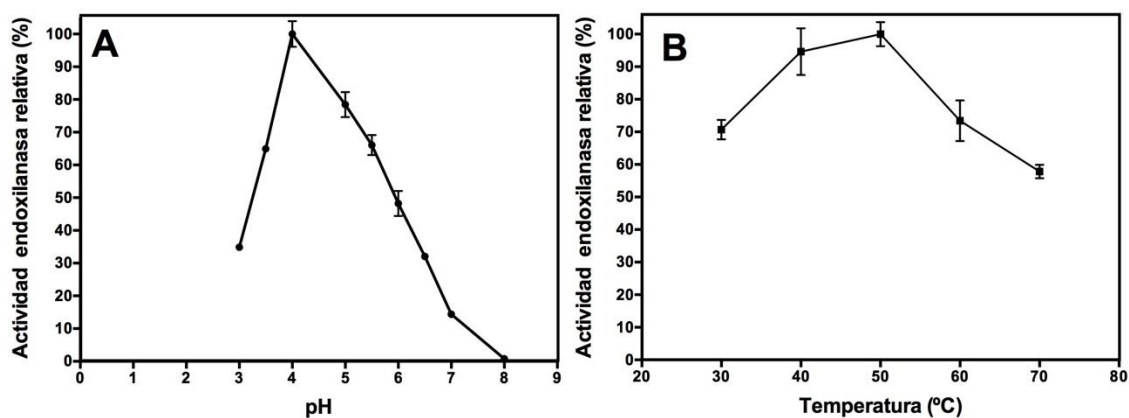
#### **4.6. Análisis estadístico**

A través del programa estadístico Desing Experter Versión 10 se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía para determinar el efecto del pH y la temperatura sobre la actividad endoxilanasas del extracto enzimático. Paralelamente, se llevó a cabo un análisis ANOVA de dos vías de los resultados del diseño experimental (CCD) para determinar el efecto que tiene el porcentaje de cascarilla de cebada, la dosis de endoxilanasas y la interacción entre ambos factores sobre la liberación de azúcares reductores, ajustándose los resultados a un modelo de segundo orden o cuadrático para su optimización.

## 5. Resultados

### 5.1. Efecto del pH y temperatura en la actividad endoxilanasas

Se evaluó la actividad endoxilanasas del extracto enzimático producido por *Penicillium* sp. HC1 bajo distintos valores de pH y temperatura. Como se observa en la **Figura 2** estas dos condiciones afectan significativamente la actividad enzimática presente en el extracto (valor-p <0,0001 para ambos factores), encontrándose que a pH 4 se obtiene la mayor actividad (Figura 2A); por otra parte, a pH 8 se encuentra la mínima actividad, siendo menor al 1%. Por otro lado, se determinó que la máxima actividad endoxilanasas se obtiene a 50°C. No obstante, la diferencia con la actividad presente en el extracto a 40°C no es significativa (valor-p =0,1233), siendo esta del 94% con respecto a la máxima y con una desviación estándar de 7,15% (Figura 2B). Tanto a 30°C como a 70°C se encuentran las actividades de endoxilanasas más bajas, estando estas por debajo del 71% con respecto a la máxima actividad enzimática obtenida.

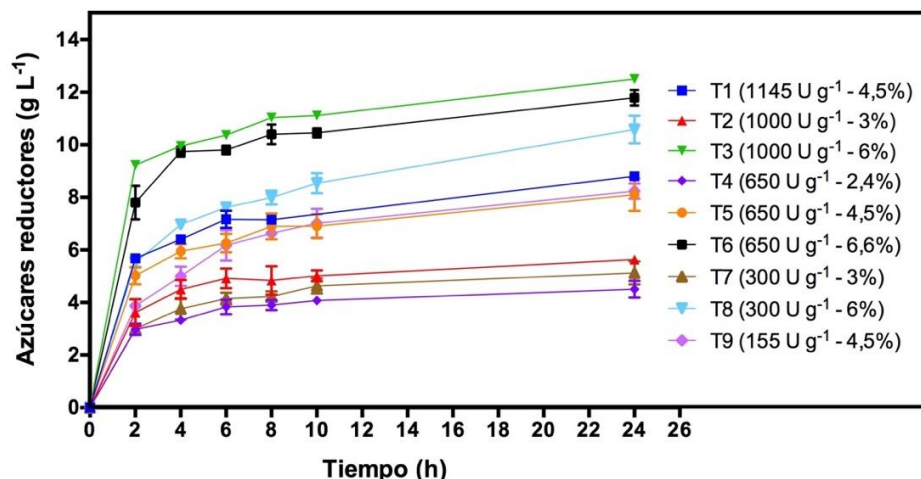


**Fig. 2.** Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática (endoxilanasas) del extracto enzimático producido por *Penicillium* sp. HC1. (A) Actividad enzimática a 50°C bajo diferentes valores de pH. (B) Actividad enzimática a pH 4 bajo diferentes temperaturas.

### 5.2. Cinética de la hidrólisis parcial de cascarilla de cebada

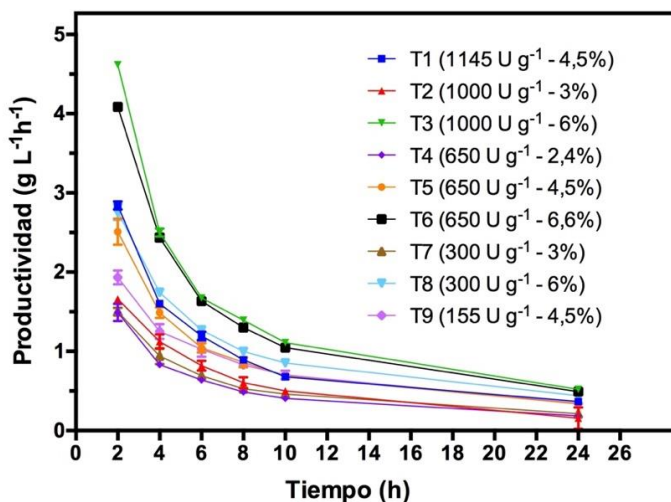
Se estudió el impacto de la dosis de endoxilanasas ( $U\ g^{-1}$ ) y el porcentaje de cascarilla de cebada en la hidrólisis parcial de los polisacáridos presentes en este material a través del tiempo. Se evidenció la liberación de azúcares reductores desde la segunda hora del proceso aumentando progresivamente hasta las 24 horas, encontrando en este las mayores concentraciones de azúcares reductores para todos los tratamientos realizados (**Figura 3**). La máxima concentración de azúcares obtenida fue de  $12,5 \pm 0,15\ g\ L^{-1}$  en el tratamiento 3 (6% de cascarilla de cebada y  $1000\ U\ g^{-1}$ ). No obstante, la diferencia entre las concentraciones máximas y las halladas desde la hora 8 para sus respectivos tratamientos es mínima, siendo dicha

diferencia de 1 a 2 g L<sup>-1</sup>. De esta forma se observa que la concentración de azúcares reductores en el hidrolizado enzimático se comienza a estabilizar en general entre las 6 y 8 horas de iniciado el proceso.



**Fig. 3.** Cinética de la liberación de azúcares reductores a partir de la hidrólisis parcial de cascarilla de cebada haciendo uso del extracto enzimático producido por *Penicillium* sp. HC1. El proceso se llevó a cabo a 40°C, pH 4 y 150 rpm para cada uno de los tratamientos.

La productividad de los azúcares liberados a través del tiempo (**Figura 4**) disminuye dado que la concentración de estos aumenta cada vez menos luego de la hora 2, es así que la mayor productividad se presenta en esta hora para todos los tratamientos. Los tratamientos 3 y 6 fueron los que presentaron mayor productividad ( $4,617 \pm 0,008$  g L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> y  $4,086 \pm 0,008$  g L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> respectivamente) en esta hora.



**Fig. 4.** Productividad de la liberación de azúcares reductores en la hidrólisis parcial de la cascarilla de cebada a través del tiempo de los distintos tratamientos. La hidrólisis se llevó a cabo a 40°C, pH 4 y 150 rpm.

Teniendo en cuenta la concentración de azúcares y la productividad de los mismos a través del tiempo, el momento para detener el proceso debe ser cercano al punto donde se establezca la liberación de azúcares reductores con el fin de obtener una concentración cercana al máximo obtenido a un menor tiempo. Para ello se compara los porcentajes de rendimiento y sacarificación de los azúcares reductores en la hidrólisis enzimática obtenidos a las 2, 6, 8 y 24 horas (**Tabla 3**), lo anterior teniendo en cuenta que a las 2 y 24 horas son aquellas en donde se hallan la mayor productividad y concentración de azúcares reductores respectivamente. En primer lugar, se observa que el mayor rendimiento es en la hora 24, pero entre las horas 6 y 8 los cambios son mínimos. Ahora bien, los porcentaje de rendimiento y de sacarificación logrados a la hora 8 son menores que el de las 24 horas (diferencia de 2-4% y 4-7%), no obstante ese aumento en los porcentajes se logró en 16 horas, comportamiento relacionado con la baja productividad en las últimas horas del proceso.

**Tabla 3.** Porcentajes de rendimiento y sacarificación de azúcares reductores a las 2, 6, 8 y 24 horas

% Rendimiento de azúcares reductores en la hidrólisis enzimática									
Tiempo (h)	Tratamientos								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
2	12,63 ±0,22	11,08 ±0,14	15,39 ±0,02	12,43 ±0,90	11,16 ±0,72	11,83 ±0,96	10,01 ±0,32	9,20 ±0,33	8,60 ±0,38
6	15,93 ±0,72	16,40 ±1,25	16,74 ±0,04	15,96 ±1,16	13,92 ±0,77	14,86 ±0,25	13,83 ±0,73	12,70 ±0,22	13,72 ±1,29
8	15,89 ±0,36	16,13 ±1,80	18,56 ±0,11	16,28 ±0,80	15,33 ±1,90	15,76 ±0,56	14,10 ±0,68	13,32 ±0,43	14,74 ±0,17
24	19,56 ±0,35	18,77 ±0,01	20,83 ±0,25	18,76 ±1,32	18,00 ±1,38	17,87 ±0,44	17,10 ±1,46	17,64 ±0,88	18,31 ±0,63

% Sacarificación									
Tiempo (h)	Tratamientos								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
2	23,00 ±0,41	20,18 ±0,25	28,04 ±0,04	22,65 ±1,64	20,34 ±1,32	21,55 ±1,75	18,23 ±0,58	16,77 ±0,61	15,66 ±0,70
6	29,02 ±1,31	29,88 ±2,28	31,48 ±0,08	29,08 ±2,12	25,35 ±1,41	27,06 ±0,46	25,19 ±1,34	23,13 ±0,40	24,99 ±2,35
8	28,95 ±0,67	29,39 ±3,28	33,50 ±0,17	29,65 ±1,47	27,93 ±2,0	28,71 ±1,02	25,69 ±1,24	24,27 ±0,79	26,85 ±0,32
24	35,63 ±0,64	34,20 ±0,02	37,95 ±0,46	34,18 ±2,41	32,80 ±2,51	32,55 ±0,81	31,15 ±2,67	32,13 ±1,60	33,35 ±1,15

Teniendo en cuenta todo lo anterior se observa que la mejor duración del proceso de hidrólisis se encuentra entre las 6 y 8 horas. Aunque en dichas horas no se obtenga el máximo

de azúcares que se puede obtener, si se logra liberar una cantidad cercana a este con una productividad mayor a la que se obtendría si se llevara la hidrólisis durante 24 horas.

### 5.3 Optimización de azúcares reductores por superficie de respuesta.

Habiendo determinado el tiempo de duración del proceso de la hidrólisis parcial de cascarilla con el extracto enzimático de *Penicillium* sp. HC1, se llevó a cabo la optimización en función a la concentración de azúcares reductores de los dos factores estudiados en el diseño experimental (CCD): Dosis de la enzima endoxilanasas (U g<sup>-1</sup> de cascarilla) y porcentaje de cascarilla de cebada cargada al proceso. Para ello se realizó un análisis ANOVA de dos vías a las 6 y 8 horas del proceso, ajustando los resultados a un modelo cuadrático y de segundo orden respectivamente. Respecto a 6 horas, el modelo seleccionado es significativo (Valor F = 164,88 y valor-p <0,0001) (**Tabla 4**). El modelo de segundo orden ajustado para las 8 horas presenta un valor F de 217,43 y un valor-p<0,0001, implicando que el modelo también es significativo (**Tabla 5**). En ambos modelos el R<sup>2</sup> y el R<sup>2</sup> predictivo están por encima de 0,93, indicando que los datos se ajustan adecuadamente al modelo y que este es capaz de predecir respuestas de forma acertada.

**Tabla 4.** Análisis de la varianza (ANOVA) de la concentración de azúcares reductores a las 6 horas del proceso (modelo cuadrático).

Fuente	Suma de cuadrados	Valor F	valor-p Prob >F
<b>Modelo</b>	127,05	164,88	< 0.0001 <sup>a</sup>
<b>A-Dosis de endoxilanasas (U g<sup>-1</sup>)</b>	8,83	57,30	< 0.0001
<b>B-Cascarilla de cebada (%)</b>	114,04	739,98	< 0.0001
<b>AB</b>	3,15	20,45	0,0002
<b>A<sup>2</sup></b>	0,51	3,33	0,0813
<b>B<sup>2</sup></b>	0,95	6,16	0,0208
<b>Residual</b>	3,54		
<b>Falta de ajuste</b>	1,68	5,98	0,0044
<b>Error puro</b>	1,87		
<b>Cor Total</b>	130,60		
<b>R<sup>2</sup></b>	0,9729		
<b>R<sup>2</sup> Ajustado</b>	0,9670		
<b>R<sup>2</sup> Predictivo</b>	0,9568		

valor-p <0,05 indica que el término del modelo es significativo

<sup>a</sup> Indica que el modelo es significativo



**Tabla 5.** Análisis de la varianza (ANOVA) de la concentración de azúcares reductores a las 8 horas del proceso (modelo de segundo orden).

Fuente	Suma de cuadrados	Valor F	valor-p Prob >F
<b>Modelo</b>	150,82	217,43	< 0.0001 <sup>a</sup>
<b>A-Dosis de endoxilanasas (U g<sup>-1</sup>)</b>	6,81	29,44	< 0.0001
<b>B-Cascarilla de cebada (%)</b>	139,13	601,72	< 0.0001
<b>AB</b>	4,88	21,12	0,0001
<b>Residual</b>	5,78		
<b>Falta de ajuste</b>	3,48	6,03	0,0015
<b>Error puro</b>	2,30		
<b>Cor Total</b>	156,60		
<b>R<sup>2</sup></b>	0,9631		
<b>R<sup>2</sup> Ajustado</b>	0,9587		
<b>R<sup>2</sup> Predictivo</b>	0,9494		

valor-p <0,05 indica que el término del modelo es significativo

<sup>a</sup> Indica que el modelo es significativo

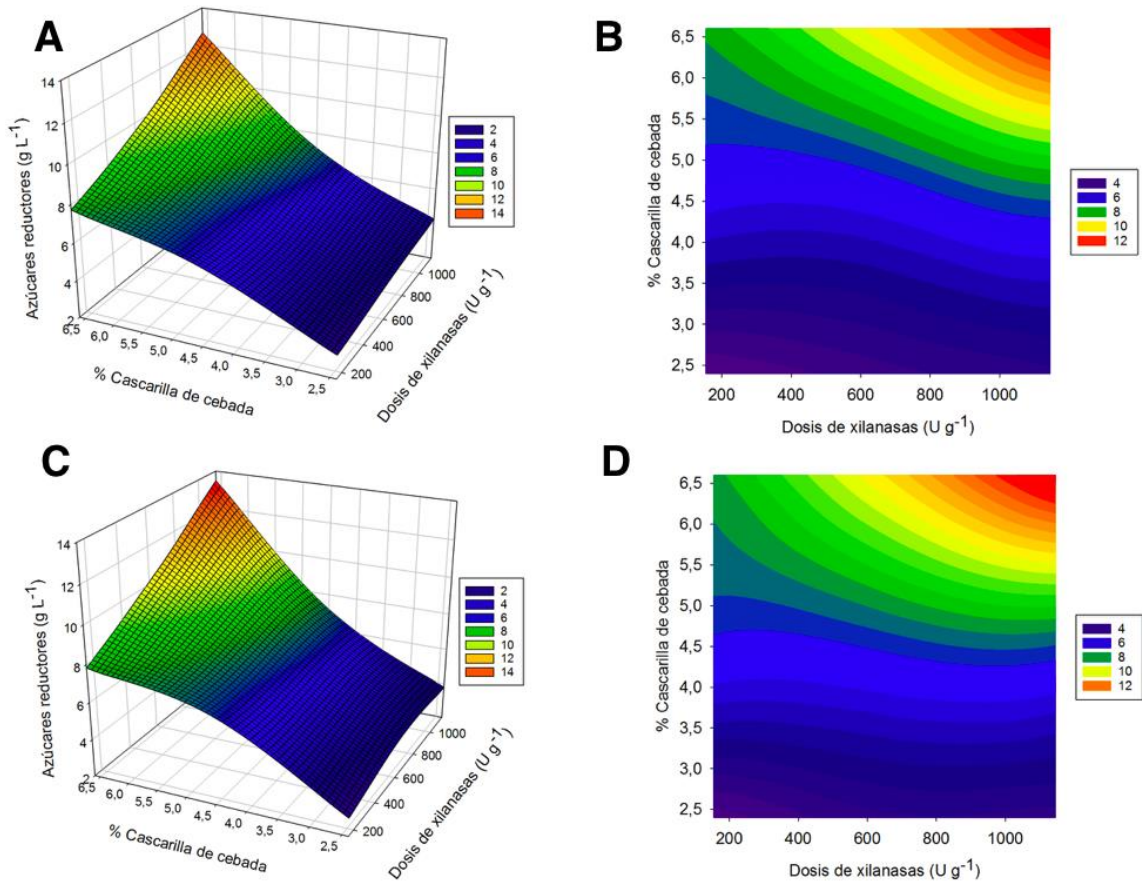
Paralelamente, el análisis estadístico demostró que tanto el porcentaje de cascarilla, la dosis de endoxilanasas y la interacción entre ambos factores son términos que afectan significativamente la liberación de azúcares reductores durante la hidrólisis parcial (valor-p < 0,05). No obstante, el término que mayor incide sobre la variable de respuesta es el porcentaje de cascarilla a degradar, teniendo el valor F más alto en ambos modelos (739,98 y 601,72 para la 6 y 8 horas respectivamente).

Las ecuaciones resultantes para cada uno de los modelos son:

$$Y1 = +4,65542 - 4,82466E - 003A + 0,29240B + 9,76089E - 004AB + 1,66572E - 006A^2 + 1,2346B^2$$

$$Y2 = +2,33092 - 3,9427E - 003A + 0,81532B + 1,21511E - 003AB$$

Donde (Y1) es la concentración de azúcares reductores a la hora 6, (Y2) es la concentración de azúcares reductores a la hora 8, (A) es la dosis de endoxilanasas y (B) el porcentaje de cascarilla. El porcentaje de cascarilla de cebada afecta de forma positiva a la concentración de azúcares reductores en ambos modelos, como se observa en la ecuación resultante del modelo (**Figura 5**), dicho efecto positivo se traduce en que el aumento de cascarilla de cebada en el tratamiento significa un aumento en la concentración de azúcares reductores liberados. Por el contrario, el efecto de la dosis de endoxilanasas resulta negativo, no obstante el valor del término es muy bajo para ambas horas evaluadas.



**Fig. 5.** Efecto de la dosis de endoxilanasas y porcentaje de cascarilla de cebada sobre la concentración de azúcares reductores. Gráficas de superficie de respuesta y contorno de la concentración de azúcares reductores a las 6 (A-B) y 8 horas (C-D).

Con base en los dos modelos se realizó una optimización numérica con el programa Design Expert Versión 10 buscando maximizar la concentración de azúcares en el tiempo correspondiente (6 u 8 horas), dando como resultando cuatro soluciones (**Tabla 6**) en donde la primera solución corresponde a las condiciones del tratamiento 3. Se observa que las concentraciones predichas por el programa son muy cercanas a las concentraciones obtenidas experimentalmente para las 6 y 8 horas de muestreo, siendo estas 10,367 y 11,03 g L<sup>-1</sup> respectivamente. Así, se observa que para esta optimización el mejor tiempo teóricamente para finalizar la hidrólisis es la hora 6 puesto que la concentración a esta hora solo es 0,5 g L<sup>-1</sup> menor a la hora 8.

**Tabla 6.** Optimización de liberación de azúcares reductores para las 6 y 8 horas del proceso

No.	Dosis de endoxilanasas (U g <sup>-1</sup> )	Cascarilla de cebada (%)	Azúcares reductores		Deseabilidad
			Hora 6	Hora 8	
1	1000,000	6,000	10,043	10,567	0,940
2	999,998	5,862	9,746	10,286	0,899
3	879,788	6,000	9,543	10,165	0,876
4	519,051	6,000	8,330	8,959	0,705

Al ser el tratamiento 3 aquel con las condiciones dadas por el programa como óptimas para la mayor liberación de azúcares reductores, se llevó a cabo la determinación del perfil de azúcares al hidrolizado enzimático de este tratamiento. Se obtuvo que la concentración de xilosa, arabinosa y glucosa a la hora 6 fueron:  $2,716 \pm 0,006$  g L<sup>-1</sup>,  $1,695 \pm 0,032$  g L<sup>-1</sup> y  $3,238 \pm 0,007$  g L<sup>-1</sup> respectivamente. Para la hora 8 fueron:  $2,984 \pm 0,014$  g L<sup>-1</sup> de xilosa,  $1,837 \pm 0,012$  g L<sup>-1</sup> de arabinosa y  $3,504 \pm 0,028$  g L<sup>-1</sup> de glucosa.

También se realizó una optimización numérica en los mismos modelos, pero en este caso se buscó adicionalmente minimizar la dosis de la enzima a utilizar, resultando en 6 soluciones posibles (**Tabla 7**). En este caso, la máxima concentración de azúcares sería  $9,397$  gL<sup>-1</sup> a las 8 horas del proceso (solución No. 1), con una diferencia de  $0,67$  g L<sup>-1</sup> con respecto a la hora 6.

**Tabla 7.** Optimización de liberación de azúcares reductores para las 6 y 8 horas del proceso, minimizando la dosis de endoxilanasas

No.	Dosis de endoxilanasas (U g <sup>-1</sup> )	Cascarilla de cebada (%)	Azúcares reductores		Deseabilidad
			Hora 6	Hora 8	
1	650	6	8,72	9,397	0,835
2	661,025	6	8,756	9,434	0,83
3	650,002	5,939	8,609	9,299	0,824
4	703,811	6	8,897	9,577	0,807
5	719,097	6	8,949	9,628	0,798
6	650	5,752	8,276	8,999	0,791

## 6. Discusión de resultados

Las condiciones de pH y temperatura reportadas en procesos de hidrólisis enzimática de cascarilla de cebada y otros materiales lignocelulósicos son variadas, lo anterior debido a que cada enzima tiene características propias, así como condiciones ambientales específicas que favorecen o no su actividad (Bisswanger 2014). Por ello se reporta para la hidrólisis de la cascarilla de cebada temperaturas de 40°C y pH 6 con el extracto enzimático de *Fusarium oxysporum* F3 (Xiros et al. 2011) y de 50°C y pH 6,12 con enzimas producidas por *Bacillus subtilis* D3d (Moteshafii et al. 2016).

Con respecto al efecto del pH y la temperatura en la actividad de las endoxilanasas producidas por *Penicillium* sp. HC1 se observa que estas dos condiciones inciden sobre la actividad enzimática, encontrándose las más altas a pH 4 y 50°C (Figura 2). La caracterización de diversas xilanasas expresadas por distintas especies y cepas de *Penicillium* muestran que el rango en el que usualmente se encuentra la actividad óptima para estas enzimas es de 40 a 50°C y pH de 3,5 a 6 (Chávez et al. 2006). Ejemplo de ello es el estudio realizado por Liao et al. (2012), que buscaban producir y caracterizar enzimas xilanolíticas de *Penicillium oxalicum* GZ-2 con el fin de evidenciar su potencial en aplicaciones industriales y agrícolas. Dentro de la caracterización que realizaron a las enzimas producidas se determinó que el pH y temperatura óptima de dichas xilanasas también son 4 y 50°C, sin embargo, se observó una disminución de más del 20% de la actividad relativa a 40°C y a 60°C, una mayor pérdida de la actividad que la observada en este trabajo (Figura 2B). De igual modo, en la investigación llevada a cabo por este mismo autor en el 2015, donde se determinó el origen, las funciones y las propiedades bioquímicas de distintas enzimas xilanasas producidas por *P. oxalicum* GZ-2, se concluyó que el pH óptimo de una de las enzimas purificadas (enzima xyn10A) es 4, y otras dos de estas enzimas mostraron una actividad relativa del 80% a dicho pH. Paralelamente, a 50°C todas las xilanasas estudiadas presentaron actividades relativas mayores al 80%, donde dos de ellas (xyn11A y xyn11B) fueron el 100%, es decir, la máxima actividad en comparación a las otras temperaturas evaluadas. Aun así, la diferencia con respecto a la actividad relativa a 40°C es mínima, estando esta por encima del 95%, valor cercano al obtenido en el presente estudio (Figura 2A).

Es así que los resultados obtenidos de los óptimos de pH y temperatura se encuentran dentro de lo esperado para las endoxilanasas producidas por el género *Penicillium*. Existe, empero, reportes de xilanasas expresadas por este mismo género con temperaturas óptimas por debajo de 40°C como las producidas por *P. herquei* cuyo óptimo es 30°C (Ito et al. 2003) o xilanasas acidófilas como las producidas por *Penicillium* sp. 40, teniendo una máxima actividad a pH 2,0 (Kimura et al. 2000). De ahí la necesidad de identificar el comportamiento de la actividad xilanasasa del extracto enzimático de *Penicillium* sp. HC1 a distintas condiciones de pH y temperatura para así seleccionar aquellas que permitan la mayor actividad de las enzimas durante el proceso hidrolítico. En este caso se prefirió escoger 40°C para llevar a cabo el proceso de hidrólisis parcial de cascarilla, aun cuando esta no es la temperatura óptima de las

xilanasas en el extracto. Esto debido a la diferencia insignificativa observada entre las actividades a ambas temperaturas, lográndose a 40°C una actividad xilanasas relativa de  $96 \pm 7,15\%$  y la de 50°C corresponde al 100%. Teniendo en cuenta la similitud entre las actividades halladas, se prefirió la menor entre las dos temperaturas puesto que utilizar esta se traducirá en un ahorro en la energía durante el proceso lo que conlleva a la reducción de costos y especialmente si se propone escalar a nivel industrial (Mussatto et al. 2005, Roy et al. 2015).

Como se observa en la cinética de liberación de azúcares reductores a partir de la hidrólisis parcial de cascarilla, la concentración de estos se va estabilizando durante el transcurso de las horas (Figura 3). Este mismo comportamiento es reportado por Xiros et al. (2011), donde evaluaron la concentración de diversos azúcares producidos en la hidrólisis enzimática de la cascarilla a diferentes horas, haciendo uso del extracto enzimático producido por *Fusarium oxysporum* F3. La concentración de xilosa, glucosa, arabinosa y xilobiosa aumentan notablemente en las primeras horas del proceso, sin embargo, antes de alcanzar las 10 horas la cantidad de azúcares comenzaba a aumentar más lentamente, observándose como estas concentraciones son cada vez más constantes en el tiempo. En el caso específico de la xilosa, la tasa de producción de este azúcar se disminuye entre las 7-9 horas. Esto mismo se ve reflejado en el comportamiento del porcentaje de conversión de celulosa y hemicelulosa durante la hidrólisis de hojarasca de maíz con el uso de enzimas provenientes de *Penicillium* sp ECU0913 (Shi et al. 2011). En este caso se muestra como la conversión de ambos polisacáridos se estancan desde la hora 12, siendo mínima la conversión de celulosa y hemicelulosa en cualquier tiempo posterior.

La caída en la tasa de hidrólisis puede ser atribuida a que la accesibilidad estructural de la matriz de la pared celular vegetal es cada vez más limitada conforme progresa la hidrólisis, impidiendo a las enzimas alcanzar su sustrato y generar el producto, que en este caso son distinta variedad de oligosacáridos, disacáridos y monosacáridos (Xiros et al. 2011). Es necesario recordar que la estructura de la pared celular vegetal está conformada por distintas componentes como lignina, celulosa, proteínas, hemicelulosa, entre otros, todas ellas entretejiendo un matriz compleja que dificulta la entrada de enzimas que logran degradar los diferentes polímeros en ella (Sticklen 2008).

La molienda hecha previamente a la cascarilla de cebada se considera un pre tratamiento que reduce el tamaño de partícula, abre parte de la estructura de la pared celular, reduciendo la cristalinidad de la celulosa haciendo así a la cascarilla más accesible a las enzimas y así facilitar su degradación. No obstante la molienda realizada no es suficiente para afectar la estructura de la pared celular en una escala micrométrica, siendo necesario moler la cascarilla de cebada a partículas de tamaño menor a  $100\mu\text{m}$ , y entre menor el tamaño de la partícula mayor solubilización de azúcares reductores se logrará por medio de hidrólisis enzimática (Niemi et al. 2012).

Mussatto et al. (2007) también reportaron un comportamiento similar al que se obtuvo en este trabajo con respecto a los azúcares solubilizados en el hidrolizado enzimático. En dicho estudio se llevó a cabo una sacarificación con enzimas comerciales (enzimas celulolíticas) de la pulpa de celulosa obtenida tras una hidrólisis ácida de la cascarilla de cebada. En las primeras 48 horas los investigadores lograron obtener  $43 \text{ g L}^{-1}$  de glucosa, pero en las siguientes 48 horas sólo se obtuvieron  $14,8 \text{ g L}^{-1}$ , disminuyendo notablemente la productividad ( $0,89 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$  y  $0,31 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$  respectivamente) con una productividad global de  $0,6 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$ . Este comportamiento puede deberse a la inhibición por producto final que ejerce la alta concentración de glucosa en el medio sobre las enzimas celulolíticas (Mussatto et al. 2007). Aunque en el presente trabajo no se haya encontrado una alta concentración de azúcares reductores en comparación a la investigación de Mussatto, es necesario tener en cuenta la posibilidad de inhibición de las xilanasas. Para las xilanasas producidas por *F. oxysporum* F3 una concentración de xilosa de 1 a  $10 \text{ g L}^{-1}$  no generó ningún efecto aparente sobre la actividad enzimática, no obstante una baja concentración de xilobiosa ( $0,05$  a  $0,6 \text{ g L}^{-1}$ ) tiene un fuerte efecto inhibitorio sobre dichas xilanasas. Por esta razón es fundamental la presencia de la  $\beta$ -xilosidasa para que hidrolice las moléculas de xilobiosa a xilosa (Xiros et al. 2011).

En el análisis ANOVA se evidenció que los dos términos evaluados, la dosis de xilanasas y el porcentaje de cascarilla de cebada, así como su interacción, afectan significativamente la concentración de azúcares reductores para las dos horas seleccionadas (hora 6 y 8). Aun así, es la cascarilla de cebada el término que más influye en la concentración de azúcares que se obtendrá del hidrolizado (Tabla 4 y 5). Xiros et al. (2011) reportaron la diferencia en la liberación de xilosa al utilizar distintas concentraciones de cascarilla de cebada pre-tratada en alcalinidad (ABGS por sus siglas en inglés). Se observó una mayor concentración de xilosa en los tratamientos con mayor ABGS, pasando de  $3 \text{ g L}^{-1}$  en 2,5% ABGS a  $11 \text{ g L}^{-1}$  en 12,5% ABGS, ambos valores obtenidos a las 24 horas. Este mismo comportamiento se observa para otros azúcares como la glucosa, arabinosa y xilobiosa.

Por otra parte, se ha evaluado el efecto de la dosis de xilanasas en la degradación de distintos materiales lignocelulósicos, tomándose incluso como un factor para la optimización de dichos procesos. En el estudio realizado por Garai y Kumar (2013) en donde se buscaba optimizar la sacarificación de distintos residuos agroindustriales con xilanasas provenientes de *Aspergillus candidus*; determinaron mediante un análisis ANOVA (modelo cuadrático) que la dosis de la enzima tiene un efecto positivo significativo (valor-p  $<0,001$ ) sobre la liberación de azúcares reductores. Paralelamente se encontró que para la degradación de cascarilla de cebada con enzimas generadas por *B. subtilis* D3d, la dosis es el factor más significativo (valor-p  $<0,0001$ , Valor F = 186,83) en la liberación de azúcares reductores, en contraste al tiempo de reacción (valor-p  $<0,0001$ , Valor F =) (Motesshafi et al. 2016).

Partiendo de los modelos a los que los datos se ajustaron a partir del ANOVA, se realizó una optimización numérica con el fin de maximizar la concentración de azúcares en el

tiempo correspondiente (6 u 8 horas), donde la primera solución corresponde a las condiciones del tratamiento 3 (1000 U g<sup>-1</sup> y 6,0%) obteniéndose como máxima concentración de azúcares generados 10,043 y 10,567 g L<sup>-1</sup> respectivamente para la hora 6 y 8 en la predicción. Se observa que las concentraciones predichas (Tabla 6) por el programa son cercanas a las concentraciones que se obtuvieron en este trabajo para las horas 6 y 8 de muestreo, siendo estas 10,367 y 11,03 g L<sup>-1</sup> respectivamente. Así, se observa que para esta optimización el mejor tiempo teóricamente para finalizar la hidrólisis es la hora 6 puesto que la concentración a esta hora solo es 0,5 g L<sup>-1</sup> menor a la hora 8.

Xiros y su grupo de colaboradores (2011) al momento de determinar el efecto del pH y la temperatura sobre la hidrólisis de ABGS, encontraron que la concentración de azúcares fue de aproximadamente 16 g L<sup>-1</sup>, estando la xilosa en mayor proporción (8 g L<sup>-1</sup> aprox) y el resto siendo glucosa (6 g L<sup>-1</sup>) y arabinosa (2 g L<sup>-1</sup>); las anteriores concentraciones fueron obtenidas a partir de 7,5% de ABGS tras 24 horas de reacción. Comparando los valores anteriores con los resultados de optimización de este trabajo, las diferencias de los valores obtenidos de azúcares pueden deberse a la diferencia del tiempo de hidrólisis, la concentración de cascarilla y tratamiento alcalino a esta realizado por los autores.

En el trabajo de Moteshafí et al. (2016) realizaron la hidrólisis de la cascarilla de cebada (sin ningún pre-tratamiento químico) con enzimas producidas por *B. subtilis* D3d, logrando producir 62,25 mg/g de azúcares reductores en 2,6 horas, a pH 6,12 y a 50°C. Para poder comparar con este estudio se calculó la concentración de azúcares reductores por gramo de cascarilla del tratamiento 6, a las 2 horas del proceso, obteniéndose un valor de 153,9 mg g<sup>-1</sup>. Es de resaltar que este valor es más alto, siendo aparentemente mejor el uso de las enzimas de *Penicillium* sp. HC1 para la hidrólisis de cascarilla de cebada.

En el estudio realizado por Macheiner et al (2003) cuyo objetivo era evaluar distintos pretratamientos químicos y térmicos para favorecer la acción de hidrolítica de las enzimas sobre la cascarilla de cebada, entre ellos la hidrólisis enzimática; utilizan enzimas comerciales y diferentes preparaciones con ellas. La concentración de azúcares generados por la acción de estas enzimas, está por debajo de 150 mg g<sup>-1</sup> a excepción de la preparación donde juntan dos de ellas (Ceremix Plus MG, CelluPract AL70) que está por encima de los 175 mg g<sup>-1</sup>, siendo estos valores cercanos a los generados en esta investigación.

También se realizó una optimización numérica en los mismos modelos, pero en este caso se buscó minimizar la dosis de la enzima a utilizar, resultando que la máxima concentración de azúcares sería 9,397 gL<sup>-1</sup> a las 8 horas del proceso (solución No. 1), con una diferencia de 0,67 g L<sup>-1</sup> con respecto a la hora 6. Esto es importante ya que es complicado preparar dosis altas como sería una dosis de 1000 U g<sup>-1</sup>, requiriendo mayor cantidad de los elementos necesarios para producir el extracto.

## 7. Conclusiones

Se logró liberar xilosa y otros azúcares reductores a partir de la hidrólisis parcial de cascarilla de cebada haciendo uso del extracto enzimático producido por *Penicillium* sp. HC1.

El pH y temperatura son condiciones que afectan la actividad de las xilanasas producidas por *Penicillium* sp. HC1, los valores óptimos de estas condiciones son 4 y 50°C respectivamente.

El porcentaje de cascarilla, la dosis de xilanasas y la interacción entre ambos factores son términos que afectan significativamente la liberación de azúcares reductores en el proceso (valor- $p < 0,05$ ). Aunque, el término que mayor incidencia tiene sobre la variable de respuesta es el porcentaje de cascarilla dispuesto para la degradación .

El mejor tiempo del proceso de hidrólisis se encuentra entre las 6 y 8 horas. Aunque en dichas horas no se obtenga el máximo de azúcares que se puede obtener, si se logra liberar una cantidad cercana a este con una productividad mayor a la que se obtendría si se llevara la hidrólisis durante 24 horas.



## 8. Recomendaciones

- Evaluar otras enzimas del complejo xilanolítico que son fundamentales en la hidrólisis de los arabinosilanos, y así mismo, que impactan en la concentración de azúcares que se pueda obtener de la hidrólisis.
- Evaluar la hidrólisis con el extracto enzimático sobre cascarilla pretratada por métodos químicos o biológicos que logren liberar y solubilizar la hemicelulosa de la matriz de la pared celular vegetal para conocer si la liberación de azúcares reductores, y en especial de xilosa, aumenta de forma significativa con respecto a los resultados obtenidos en esta investigación.
- Se recomienda validar el modelo de optimización obtenido del análisis estadístico.

## 9. Bibliografia

- Aliyu S, Bala M (2011) Brewer's spent grain: A review of its potentials and applications. *African Journal of Biotechnology* 10(3):324-331 DOI: 10.5897/AJBx10.006
- Bailey M, Biely P, Poutanen K (1992) Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *Journal of Biochemistry* 23:257-270
- Bisswanger H (2014) Enzyme assays. *Perspective in science* 1:41-55 <http://dx.doi.org/10.1016/j.pisc.2014.02.005>
- Camargo D, Sene L, Loreto I, Graças de Almeida Felipe D (2015) Xylitol Bioproduction in Hemicellulosic Hydrolysate Obtained from Sorghum Forage Biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 175:3628-3642 DOI 10.1007/s12010-015-1531-4
- Carvalho F, Duarte L, Lopes S, Parajo J, Pereira H, Gírio F (2006) Supplementation requirements of brewery's spent grain hydrolysate for biomass and xylitol production by *Debaryomyces hansenii* CCM1 94. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 33:646-654 DOI 10.1007/s10295-006-0101-8
- Carvalho M, Carvalho D, Gomes E, Maeda R, Santa-Anna L, Castro A, Pereira N (2014) Optimisation of Cellulase Production by *Penicillium funiculosum* in a Stirred Tank Bioreactor Using Multivariate Response Surface Analysis. *Enzyme Research* 2014:1-8 <http://dx.doi.org/10.1155/2014/703291>
- Chávez R, Bull P, Eyzaguirre J (2006) The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium*. *Journal of Biotechnology* 123(4):413-433 doi: 10.1016/j.jbiotec.2005.12.036
- Correa A (2016) Evaluación de la producción de celulasas y xilanasas empleando *Penicillium* sp. HC1 en cultivo sumergido sobre cascarilla de cebada. Tesis de pregrado. Facultad de ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Colombia
- Díaz R, Alonso S, Sanchez C, Araceli T, Bibbins M, Díaz G (2011) Characterization of the growth and laccase activity of strains of *Pleurotus ostreatus* in submerged fermentation. *Bio Resources* 6:282-290
- Fanchini C, Trobo-Masedaa L, Moreno-Pérez S, Cano E, Costa B, Guisan J (2016) Co-immobilization and stabilization of xylanase,  $\beta$ -xylosidase and  $\alpha$ -l-arabinofuranosidase from *Penicillium janczewskii* for arabinoxylan hydrolysis. *Process Biochemistry* 51:614-623
- Fanchini C, Temer B, Teixeira M, Cano E (2010) Production of xylanolytic enzymes by *Penicillium janczewskii*. *Bioresource Technology* 101:4139-4143 doi:10.1016/j.biortech.2010.01.011
- Faria L, Kolling D, Camassola M, Pinheiro A, Pereira L (2008) Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates. *Bioresource Technology* 99:1417-1424 doi:10.1016/j.biortech.2007.01.060
- Garai D, Kumar V (2013) A Box-Behnken design approach for the production of xylanase by *Aspergillus candidus* under solid state fermentation and its application in saccharification of

- agro residues and *Parthenium hysterophorus* L. *Industrial Crops and Products* 44:352-363  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.10.027>
- Gutiérrez I, Matiz A, Aguirre M, Reyes E, Lemos S, et al. (2012) Estimación de poblaciones de microorganismos ligninolíticos y celulolíticos, y  $\beta$ -glucosidasa en agrosistemas de arroz. En: Uribe D, Melgarejo L (ed) Ecología de microorganismos rizosféricos asociados a cultivos de arroz de Tolima y Meta. Editorial Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C., Colombia, pp 89 - 109
- Gusakov V, Sinitsyn P (2012) Cellulases from *Penicillium* species for producing fuels from biomass. *Biofuels* 3(4):463-477
- Holopainen M (2015) Composition and structure of barley (*Hordeum vulgare* L.) grain in relation to end uses. VTT, Helsinki, Finland
- Hyman D, Sluiter A, Crocker D, Johnson D, Sluiter J, et al. (2008) Determination of Acid Soluble Lignin Concentration Curve by UV-Vis Spectroscopy: Laboratory Analytical Procedure (LAP). National Renewable Energy Laboratory Colorado, Golden
- Ito T, Yokoyama E, Sato H, Ujita M, Funaguma T, et al. (2003) Xylosidases associated with the cell surface of *Penicillium herquei* IFO 4674. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 96:354-359  
 DOI: 10.1016/S1389-1723(03)90136-8
- Kimura T, Ito J, Kawano A, Making T, Kondo H, et al. (2000) Purification, characterization and molecular cloning of acidophilic xylanase from *Penicillium* sp. 40. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 64:1230-1237 <http://dx.doi.org/10.1271/bbb.64.1230>
- Kirin Beer University (2015) Kirin Beer University Report: Global Beer Production by Country in 2014. [http://www.kirinholdings.co.jp/english/news/2015/0810\\_01.html](http://www.kirinholdings.co.jp/english/news/2015/0810_01.html). Recuperado Junio 20 2016
- Laine C, Kemppainen K, Kuutti L, Varhimo A, Asikainen S, et al. (2015) Extraction of xylan from wood pulp and brewer's spent grain. *Industrial Crops and Products* 70:231-237  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.03.009>
- Lee K, Jeya M, Joo A, Singh R, Kim I, Lee J (2010) Purification and characterization of a thermostable endo- $\beta$ -1,4-glucanase from a novel strain of *Penicillium purpurogenum*. *Enzyme and Microbial Technology* 46:206-211
- Liao H, Zheng H, Li S, Wei Z, Mei X, et al. (2015) Functional diversity and properties of multiple xylanases from *Penicillium oxalicum* GZ-2. *Scientific Reports* 5:1-14 doi: 10.1038/srep12631
- Liao H, Xu C, Tan S, Wei Z, Ling N, et al. (2012) Production and characterization of acidophilic xylanolytic enzymes from *Penicillium oxalicum* GZ-2. *Bioresource Technology* 123: 117-124 <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.07.051>
- Macheiner D, Adamitsch B, Karner F, Hampel W (2003) Pretreatment and hydrolysis of brewer's spent grains. *Engineer Life Science*. 3(10):401-405
- Mandels M, Weber J (1969). The production of cellulases. *Advances in Chemistry* 95:391-414

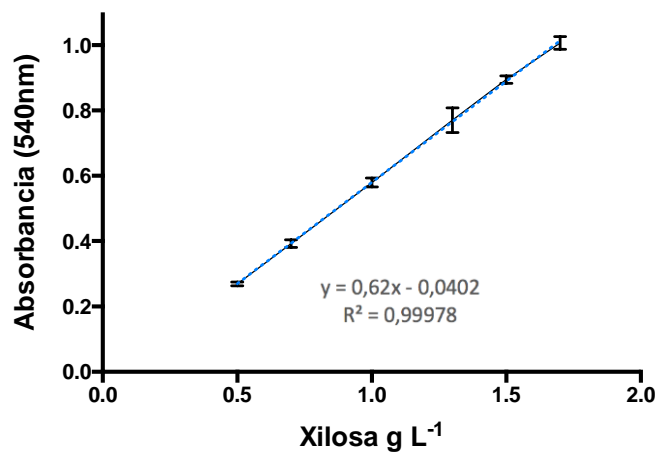
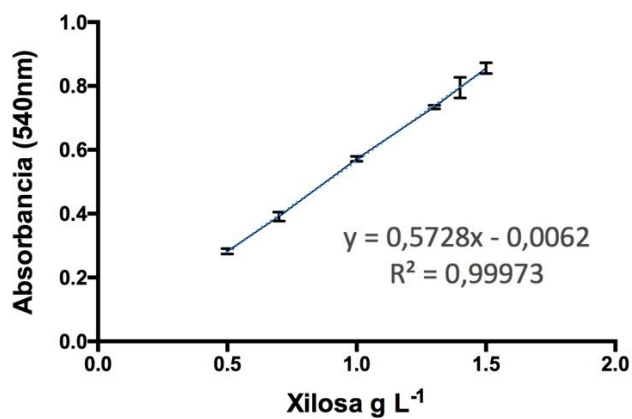
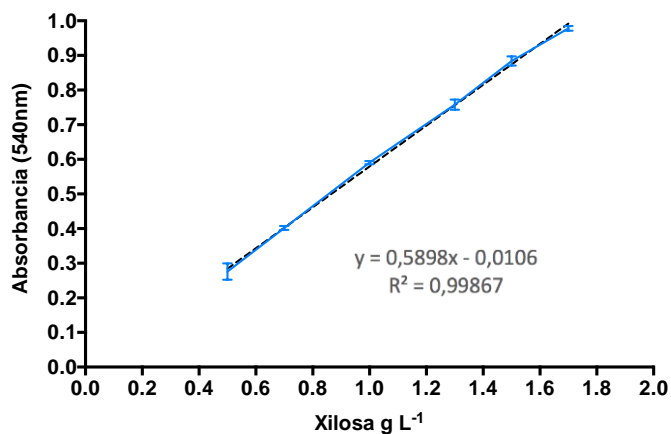
- Miller G (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31(3):426-428 DOI: 10.1021/ac60147a030
- Moteshafi H, Hashemi M, Mousavi S, Mousivand M (2016) Characterization of produced xylanase by *Bacillus subtilis* D3d newly isolated from apricot phyllosphere and its potential in pre-digestion of BSG. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 37:251-260 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jiec.2016.03.036>
- Mussatto S, Dragone G, Roberto I (2006) Brewers' spent grain: generation, characteristics and potential applications. *Journal of Cereal Science* 43:1-14 doi:10.1016/j.jcs.2005.06.001
- Mussatto S, Dragone G, Roberto I (2005) Influence of the toxic compounds present in brewer's spent grain hemicellulosic hydrolysate on xylose-to-xylitol bioconversion by *Candida guilliermondii*. *Process Biochemistry* 40:3801-3806 doi:10.1016/j.procbio.2005.06.024
- Mussatto S, Fernandes M, Dragone G, Mancilha I, Roberto I (2007) Brewer's spent grain as raw material for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii*. *Biotechnology Letters* 29:1973-1976 DOI 10.1007/s10529-007-9494-3
- Mussatto S, Moncada J, Roberto I, Cardona C (2013) Techno-economic analysis for brewer's spent grains use on a biorefinery concept: The Brazilian case. *Bioresource Technology* 148:302-310 <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.046>
- Mussatto S, Roberto I (2008) Establishment of the optimum initial xylose concentration and nutritional supplementation of brewer's spent grain hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. *Process Biochemistry* 43:540-546 doi:10.1016/j.procbio.2008.01.013
- Niemi P, Martins D, Buchert J, Faulds C (2013) Pre-hydrolysis with carbohydrases facilitates the release of protein from brewer's spent grain. *Bioresource Technology* 136:529-534 <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.076>
- Niemi P, Faulds C, Sibakov J, Holopainen U, Poutanen K, Buchert J (2012) Effect of a milling pre-treatment on the enzymatic hydrolysis of carbohydrates in brewer's spent grain. *Bioresource Technology* 116:155-160 <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.04.043>
- Olajire A (2012) The brewing industry and environmental challenges. *Journal of Cleaner Production* 1-21 doi:10.1016/j.jclepro.2012.03.003
- Rafiqul I, Sakinah A, Karim M (2014) Production of Xylose from Meranti Wood Sawdust by Dilute Acid Hydrolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 174:542-555 DOI 10.1007/s12010-014-1059-z
- Reiss D, Fontana C, Delabona S, Lima S, Camassola M, Pradella C, Dillon P (2013) Increased production of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum* S1M29 in batch and fed-batch cultura. *Bioresource Technology* 146:597-603 doi:10.1016/j.biortech.2013.07.124
- Reis S, Coelho E, Coimbra M, Abu-Ghannam N (2015) Improved efficiency of brewer's spent grain arabinoxylans by ultrasound-assisted extraction. *Ultrasonics Sonochemistry* 24:155-164 <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.10.010>

- Reis S, Gullón B, Gullón P, Ferreira S, Maia C, et al. (2014) Evaluation of the prebiotic potential of arabinoxylans from brewer's spent grain. *Applied Microbiology Biotechnology* 98:9365-9373 DOI 10.1007/s00253-014-6009-8
- Roy P, Dutta A, Deen B (2015) Greenhouse gas emissions and production cost of ethanol produced from biosyngas fermentation process. *Bioresource Technology* 192:185-191 <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.05.056>
- Sánchez A (2013) Evaluación de la degradación del tamo de arroz por hongos celulolíticos aislados de suelos de cultivo de arroz. Tesis de maestría. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Colombia
- Severini C, Azzollini D, Jouppila K, Jussi L, Derossi A, De Pilli T (2015) Effect of enzymatic and technological treatments on solubilisation of arabinoxylans from brewer's spent grain. *Journal of Cereal Science* 65:162-166 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2015.07.006>
- Shi Q, Sun J, Yu H, Li C, Bao J, Xu J (2011) Catalytic Performance of Corn Stover Hydrolysis by a New Isolate *Penicillium* sp. ECU0913 Producing both Cellulase and Xylanase. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 164:819-830 DOI 10.1007/s12010-011-9176-4
- Steiner J, Procopio S, Becker T (2015) Brewer's spent grain: source of value-added polysaccharides for the food industry in reference to the health claims. *European Food Research and Technology* 241:303-315 <http://doi.org/10.1007/s00217-015-2461-7>
- Sticklen M (2008) Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. *Nature Reviews Genetics* 9:433-443 doi:10.1038/nrg2336
- Wang H, Tao Y, Temudo M, Bijl H, Kloek J, et al. (2015) Biomethanation from enzymatically hydrolyzed brewer's spent grain: Impact of rapid increase in loadings. *Bioresource Technology* 190:167-174 <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.073>
- Waters D, Jacob F, Titze J, Arendt E, Zannini E (2012) Fibre, protein and mineral fortification of wheat bread through milled and fermented brewer's spent grain enrichment. *European Food Research and Technology* 235:767-778 DOI 10.1007/s00217-012-1805-9
- Xiros C, Katapodis P, Christakopoulos P (2011) Factors affecting cellulose and hemicellulose hydrolysis of alkali treated brewers spent grain by *Fusarium oxysporum* enzyme extract. *Bioresource Technology* 102:1688-1696 doi:10.1016/j.biortech.2010.09.108
- Xiros C, Christakopoulos P (2012). Biotechnological potential of brewers spent grain and its recent applications. *Waste and Biomass Valorization*, 3: 213–232. <http://doi.org/10.1007/s12649-012-9108-8>

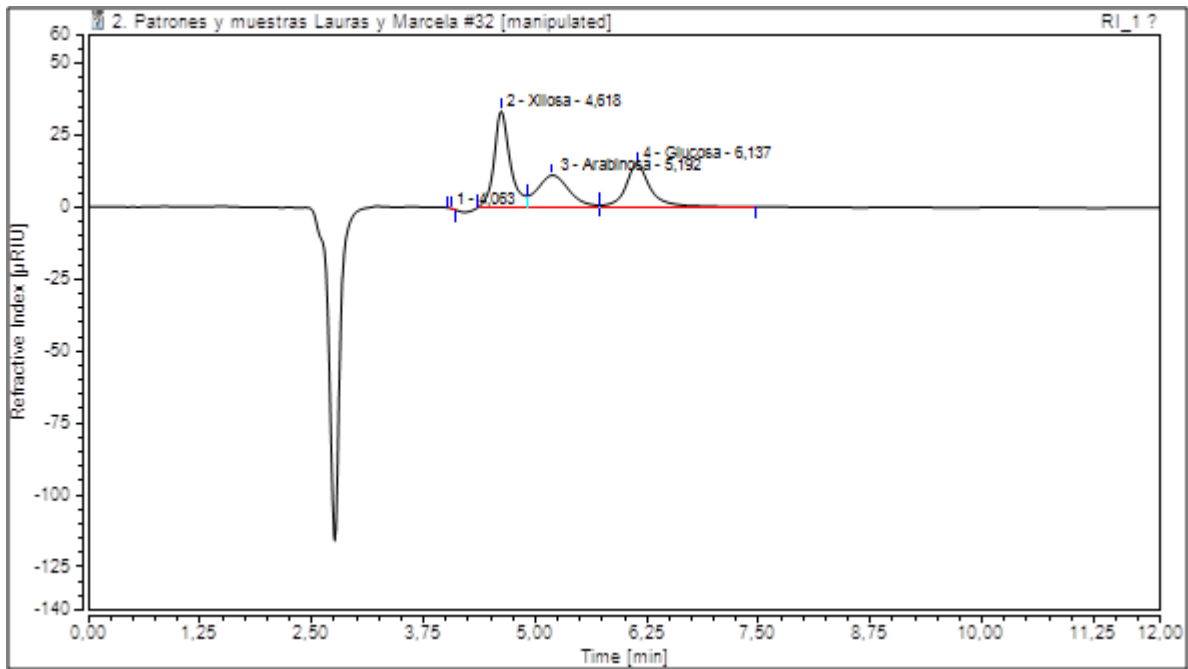
## 10. Anexos

### 10.1. Anexo 1. Curva patrón de xilosa con DNS

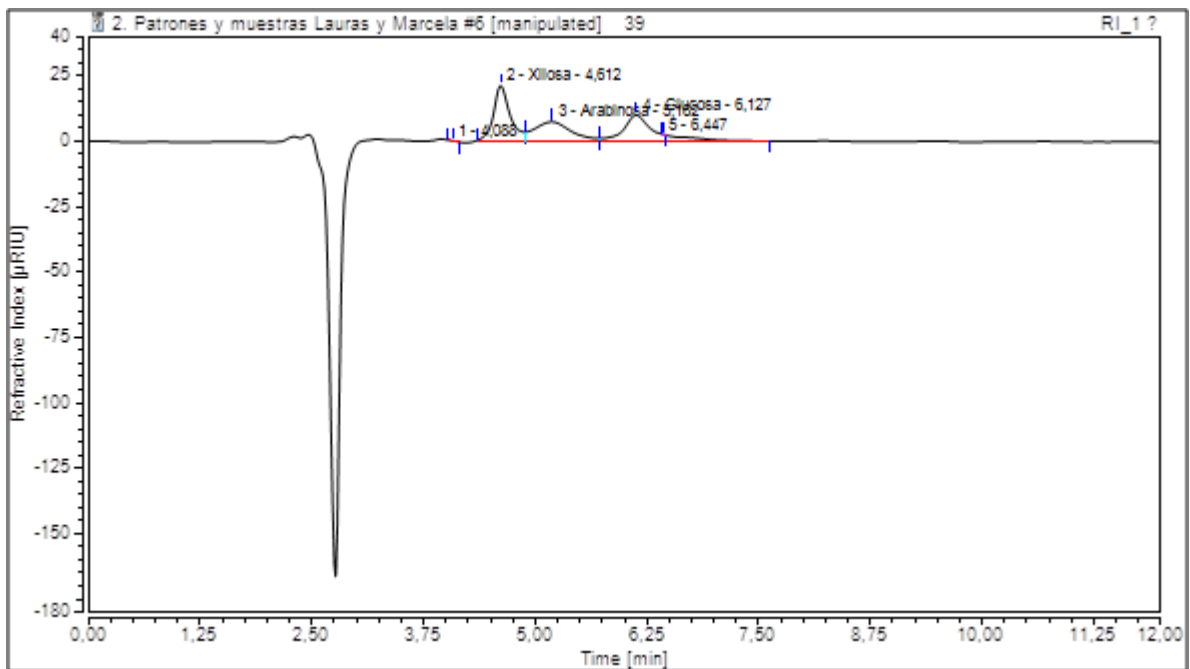
Se elaboraron varias curvas patrón para la cuantificación de actividad enzimática de endoxilanasas y azúcares reductores.



### 10.2. Anexo 2. Cromatograma de patrones de xilosa, arabinosa y glucosa.



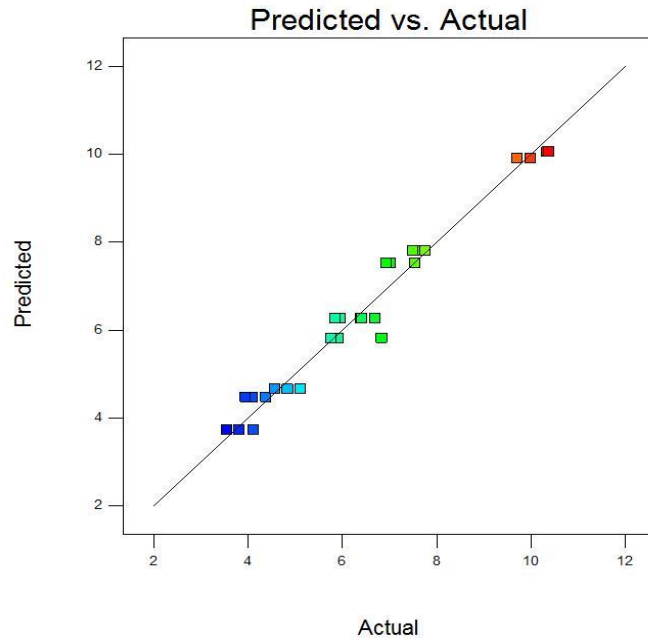
### 10.3. Anexo 3. Cromatograma del tratamiento 3, hora 6 (1 réplica).



### 10.4. Anexo 4. Gráfica Predicción Vs. Datos reales (6 y 8 horas).

Design-Expert® Software  
AR 6

Color points by value of  
AR 6:



Design-Expert® Software  
AR 8

Color points by value of  
AR 8:

