



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN
ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA
CARRERA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS



Tema: Producción de la enzima recombinante Xyn30D de *Paenibacillus barcinonensis* para la degradación de residuos agroindustriales.

Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Alimentos, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Trabajo de Titulación parte del Proyecto de investigación "Estudios enzimológicos de biorremediación por medio de pruebas bioquímicas y estructurales" aprobado bajo Resolución: 1541-CU-P-2018.

Autora: Yessenia Abigail Arévalo López

Tutora: PhD. Liliana Alexandra Cerda Mejía

AMBATO-ECUADOR

Enero 2020

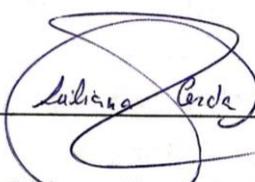
APROBACIÓN DEL TUTOR

PhD. Liliana Alexandra Cerda Mejía

CERTIFICO:

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación, Modalidad: Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad.

Ambato, 11 de diciembre del 2019



A handwritten signature in blue ink, reading "Liliana Alexandra Cerda", is written over a horizontal line.

PhD. Liliana Alexandra Cerda Mejía

C.I. 180414808-6

TUTORA

DECLARACION DE AUTENTICIDAD

Yo, Yessenia Abigail Arévalo López, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Trabajo de Titulación modalidad proyecto de investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Alimentos, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas

A handwritten signature in black ink, reading "Yessenia Arévalo", is written over a horizontal line. The signature is stylized and cursive.

Yessenia Abigail Arévalo López

C.I. 050427544-7

AUTORA

APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos profesores calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

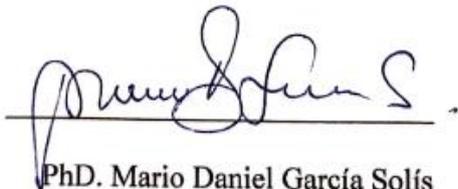
Para constancia firman:



Presidente de Tribunal de Grado



PhD. David Andrés Terán Mera
C.I. 1716569726



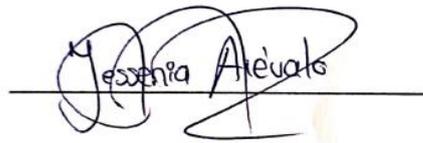
PhD. Mario Daniel García Solís
C.I. 1103605471

Ambato, 08 de enero del 2020

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que considere el presente trabajo de titulación o parte de él, como un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi proyecto de investigación, con fines de difusión pública, además apruebo su reproducción parcial o total dentro de las regulaciones de la Universidad Ecuatoriana, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.

A handwritten signature in black ink, written over a horizontal line. The signature is stylized and appears to read 'Yessenia Arévalo'.

Yessenia Abigail Arévalo López

C.I. 050427544-7

AUTORA

DEDICATORIA

A Dios

A mis padres y hermana

Jorge Ariel

Max 🐾

AGRADECIMIENTO

A Dios por darme la fuerza para poder culminar mis estudios, protegerme y darme sabiduría en cada etapa de mi vida.

A mi madre Cecilia López, por orar y pedir por mí, apoyarme desde mis etapas tempranas de vida, jamás abandonarme y estar siempre para mí hasta en los momentos más difíciles.

A mi padre Juan Arévalo, por sacrificarse tantos años para velar por nuestra familia y jamás permitir que nos falte nada.

A mi hermana Andrea Arévalo (Candis pandis) por apoyarme en muchas locuras, ser mi cómplice de aventuras.

A Jorge Ariel por apoyarme, estar siempre a mi lado a pesar de la distancia, ayudarme en los momentos más difíciles de mi vida, por su enorme paciencia y tolerancia, por tu amor y cariño sincero, por ser mi confidente, amigo y compañero de aventuras.

De manera especial a mis tutores la Dra. Liliana Cerda y Dr. David Terán, por su enorme paciencia, tiempo y dedicación, por impartirme sus conocimientos y haberme permitido realizar este trabajo con el grupo de investigación DTLC.

A Brayan Rodríguez, quien ha sido mi mejor amigo durante toda la carrera universitaria, por tus consejos, tu compañía y sobre todo tu amistad sincera, siempre estarás en mi corazón, y sabes que estaré para ti cuando más lo necesites.

A Shimabel Peñafiel por haber sido mi compañera de tesis y por todo su apoyo.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR.....	II
DECLARACION DE AUTENTICIDAD.....	III
APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO.....	IV
DERECHOS DE AUTOR	V
DEDICATORIA	VI
AGRADECIMIENTO	VII
RESUMEN EJECUTIVO	XIII
ABSTRACT.....	XIV

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1.Pared celular vegetal y su importancia fisiológica.....	1
1.1.1. Celulosa.....	2
1.1.2. Lignina.....	3
1.1.2.1. Biomasa lignocelulósica en el Ecuador.....	4
1.1.3. Hemicelulosa.....	6
1.1.3.1. Xilano.....	6
1.1.3.2. Xilanasas.....	6
1.1.3.3. Degradación enzimática del xilano.....	7
1.2. <i>Paenibacillus barcinonensis</i>	8
1.3.Xyn30D.....	8
1.4.Cel6D.....	8
1.5.Aplicaciones biotecnológicas de las xilanasas.....	9
1.6.Objetivos.....	9
1.6.1. Objetivo General.....	9

1.6.2.	Objetivos Específicos	9
1.7.	Hipótesis.....	10
1.7.1.	Hipótesis nula	10
1.7.2.	Hipótesis alternativa	10
1.8.	Señalamiento de variables de la hipótesis	10
1.8.1.	Variable independiente	10
1.8.2.	Variable dependiente	10

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.	Materiales.....	11
2.1.1.	Materiales de laboratorio.....	11
2.1.2.	Reactivos	12
2.1.3.	Equipos.....	13
2.2.	Métodos	14
2.2.1.	Microorganismos utilizados.	14
2.2.2.	Medio de cultivo de células bacterianas.....	14
2.2.3.	Antibióticos e inductor.	15
2.2.4.	Inoculación y cultivo de microorganismos.	15
2.2.5.	Preparación de las células competentes.	15
2.2.6.	Transformación de células competentes con plásmido de interés.	16
2.2.7.	Extracción de ADN plasmídico.	16
2.2.9.	Expresión de proteínas.	17
2.2.10.	Obtención de los extractos celulares.	18
2.2.11.	Análisis de expresión de proteína recombinante Xyn30D.	18
2.3.	Preparación de sustrato específico y xilanolíticos.	18
2.3.1.	Sustrato específico.	18
2.3.2.	Sustrato rico en xilosa.	18

2.4.	Determinación de la actividad enzimática en sustrato específico y residuos agroindustriales.....	19
2.5.	Análisis de azúcares reductores mediante cromatografía de capa fina de alto rendimiento (HPTLC).....	20
2.6.	Análisis estadístico.....	20

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1.	Análisis y discusión de datos	22
3.1.1.	Expresión de la enzima Xyn30D de <i>Paenibacillus barcinonensis</i> en <i>E. coli</i> BL21 (DE3) y <i>E. coli</i> TF(H2).	22
3.1.2.	Análisis de la actividad enzimática de Xyn30D en sustrato específico....	23
3.1.3.	Análisis de la actividad enzimática de Xyn30D en diferentes residuos agroindustriales.....	24
3.1.4.	Evaluación de la actividad sinérgica de Xyn30D y Cel6D sobre residuos agroindustriales.....	25
3.1.5.	Determinación de la actividad enzimática de Xyn30D mediante el uso de cromatografía HPTLC de los diferentes residuos agroindustriales.	26
3.1.6.	Determinación de azúcares reductores provenientes de la actividad sinérgica entre Xyn30D y Cel6D mediante cromatografía HPTLC.	28
3.1.7.	Análisis estadístico	30
3.1.8.	Verificación de la hipótesis.....	32

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1.	Conclusiones	33
4.2.	Recomendaciones.....	34

MATERIAL DE REFERENCIA

5.1.	Referencias bibliográficas	35
------	----------------------------------	----

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Composición química de los diferentes residuos agroindustriales	4
Tabla 2. Pruebas de sinergia entre Xyn30D y Cel6D	19
Tabla 3. Diseño experimental usado en el experimento.....	21
Tabla 4. Actividad enzimática de Xyn30D en sustrato específico.....	24
Tabla 5. Análisis de varianza en relación a la actividad enzimática (U/mg proteína) de Xyn30D sobre residuos agroindustriales a diferentes tiempos de incubación.	30
Tabla 6. Prueba de comparación Tukey en relación al tiempo de incubación	30
Tabla 7. Prueba de comparación Duncan en relación al tiempo de incubación.....	31
Tabla 8. Prueba de comparación Tukey en relación a los residuos agroindustriales	31
Tabla 9. Prueba de comparación Duncan en relación a los residuos agroindustriales	31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Pared celular vegetal. (A). Modelo de la pared celular primaria. (B). Modelo de la pared celular secundaria.	2
Figura 2. Estructura y composición de la lignina.....	3
Figura 3. Estructura hipotética del xilano indicando sus ramificaciones y los diferentes sitios de corte de las enzimas del sistema xilanolítico..	7
Figura 4: (A) Extracto celular de E. coli BL21 (DE3) que contiene a la enzima Xyn30D y (B) Pellet de células (no se evidencia presencia de la enzima), electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	23
Figura 5. Actividad enzimática de Xyn30D evaluada en diferentes residuos agroindustriales: Salvado de arroz (A), cascara de cacao (B), bagazo de caña (C), rastrojo de maíz (D).	25
Figura 6. Sinergia de Xyn30D y Cel6D sobre residuos agroindustriales: Prueba 1 (A), prueba 2 (B) y prueba 3 (C). Las pruebas de sinergia son detalladas en el capítulo 2 en la Tabla 2).	26
Figura 7. Análisis mediante cromatografía de HPTLC de los productos generados mediante la reacción enzimática de Xyn30D en sustratos agroindustriales. De estándar se utilizó xilosa (A) y las muestras a analizar fueron, xilano de madera de haya (B), salvado de arroz (C), cáscara de cacao (D), bagazo de caña (E), rastrojo de maíz (F), teniendo cada una un control que contenía la enzima inactivada.	27
Figura 8. Análisis mediante cromatografía de HPTLC de los productos generados mediante la sinergia entre Xyn30D y Cel6D en sustratos agroindustriales. De estándar se utilizó xilosa (A) y glucosa (B), las muestras a analizar fueron, salvado de arroz (C), cáscara de cacao (D), bagazo de caña (E), Rastrojo de maíz (F), teniendo cada una un control con las enzimas inactivadas.	29

RESUMEN EJECUTIVO

La finalidad de este estudio fue la obtención de la enzima recombinante Xyn30D proveniente de *Paenibacillus Barcinonensis*, la cual posterior a su expresión en *E. coli* BL21(DE3) y (TF2) y extracción, se analizó su actividad degradadora sobre residuos agroindustriales en función de su actividad enzimática específica (U/mg de proteína).

La actividad enzimática se midió a través de la cuantificación de azúcares reductores producidos de la digestión de los residuos agroindustriales después de la reacción enzimática a 50 °C y a diferentes intervalos de tiempo. La cáscara de cacao fue el sustrato que presentó mayor actividad enzimática (468,3 U/mg proteína) con un tiempo de incubación de 15 minutos, seguida de bagazo de caña, rastrojo de maíz y salvado de arroz. Adicionalmente se calculó la actividad enzimática sobre su sustrato óptimo (xilano de madera de haya) con reacciones enzimáticas a 15 y 30 minutos, obteniendo valores de 88,67 y 57,46 U/mg proteína.

Por último, la identificación de los productos generados por la reacción enzimática de Xyn30D sobre residuos agroindustriales mediante la técnica de HPTLC, el cual mostro los productos de degradación obteniendo xilobiosa y xilooligosacáridos como se menciona en bibliografía. Por otra parte, al analizar los productos de degradación de la sinergia entre Xyn30D y Cel6D se obtuvo xilobiosa, celobiosa, celooligosacáridos y xilooligosacáridos.

Palabras claves: Residuos agroindustriales, xilosa, *Paenibacillus barcinonensis*, celobiosa, xilano, xilooligosacáridos.

ABSTRACT

The purpose of this study was to obtain the recombinant enzyme Xyn30D from *Paenibacillus Barcinonensis*, which after its expression in *E. coli BL21 (DE3)* and (*TF2*) and extraction, its degrading activity on agroindustrial waste was analyzed based on its specific enzyme activity (U/mg protein).

Enzymatic activity was measured through the quantification of reducing sugars produced from the digestion of agroindustrial waste after the enzymatic reaction at 50 °C and at different time intervals. Cocoa husk was the substrate that showed the highest enzymatic activity (468.3 U/mg protein) with an incubation time of 15 minutes, followed by cane bagasse, corn stubble and rice bran. Additionally, the enzymatic activity on its optimal substrate (beech wood xylan) was calculated with enzymatic reactions at 15 and 30 minutes, obtaining values of 88.67 and 57.46 U/mg protein.

Finally, the identification of the products generated by the enzymatic reaction of Xyn30D on agroindustrial waste by means of the HPTLC technique, which showed the degradation products obtaining xylobiose and xylooligosaccharides as mentioned in the literature. On the other hand, when analyzing the degradation products of the synergy between Xyn30D and Cel6D, xylobiose, cellobiose, celooligosaccharides and xylooligosaccharides were obtained.

Keywords: Agroindustrial wastes, xylose, *Paenibacillus barcinonensis*, cellobiose, xylan, xylooligosaccharides.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1.Pared celular vegetal y su importancia fisiológica.

La pared celular de las plantas es una fusión compleja de carbohidratos, proteínas, lignina, agua y sustancias incrustantes como la cutina, suberina y compuestos inorgánicos que varían entre especies de plantas, tipos de células e incluso de células vecinas (**Showalter, 1993**). Es también una fuente primaria de celulosa, considerada el componente más abundante y útil de la Tierra (**Cosgrove, 2005**). La pared celular no solo vigoriza el cuerpo de la planta, asimismo cumple diferentes roles en el crecimiento de esta, en la diferenciación celular, la comunicación intercelular, y en el movimiento de sustancias de defensa y agua. (**O'Neill & York, 2003**)

La pared celular es usualmente clasificada como pared celular primaria y secundaria. Esto depende mucho de sus propiedades mecánicas y composición química. La pared celular primaria (Fig 1A) es una estructura mecánicamente dinámica, que recluye a la célula durante el periodo de crecimiento rápido posterior a la división celular (**York, Darvill, McNeil, Stevenson, & Albersheim, 1986**). Los principales componentes son polisacáridos como celulosa, hemicelulosas, pectinas y agua (60-70%) (**Cosgrove, 2005; Loqué, Scheller, & Pauly, 2015; Showalter, 1993**).

La pared celular secundaria (Fig 2B) es una estructura mecánicamente estática que determina la forma y tamaño de la célula madura. (**Nakano, Yamaguchi, Endo, Rejab, & Ohtani, 2015**). Está formada por celulosa, hemicelulosas, lignina, y agua (5%) (**Cosgrove, 2005; Loqué et al., 2015; Showalter, 1993**).

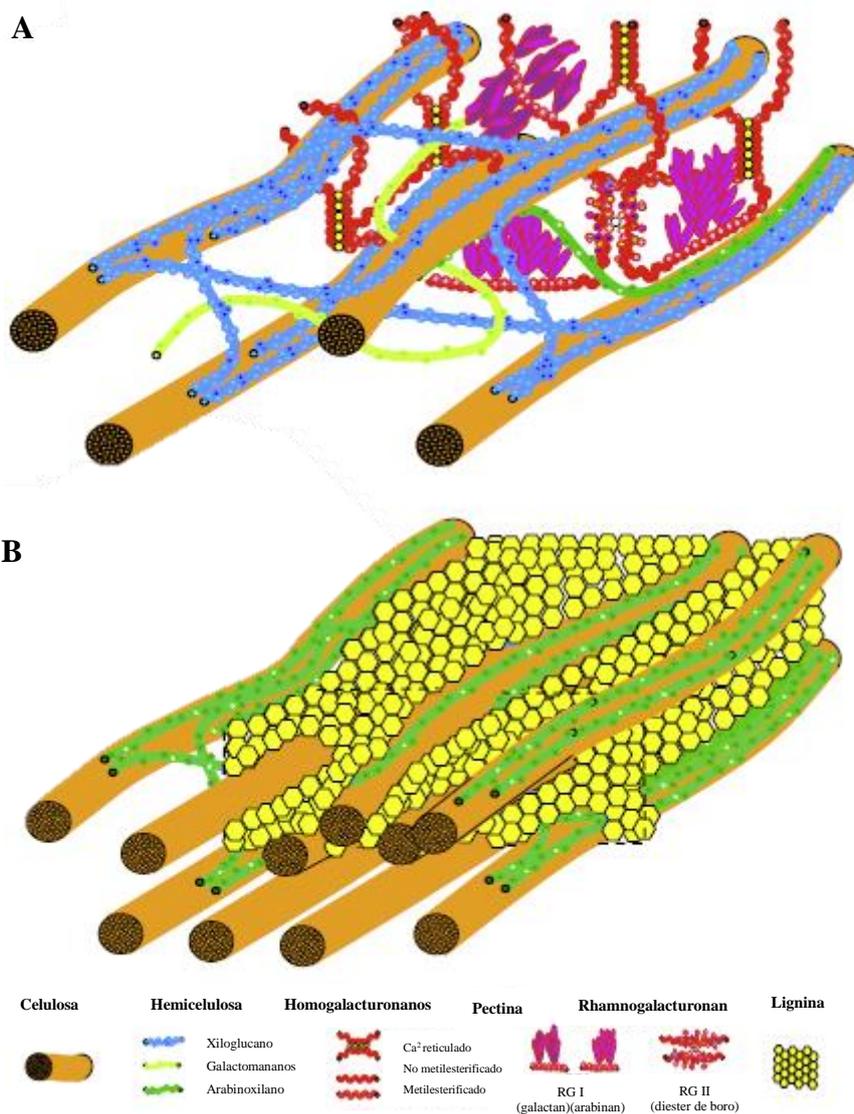


Figura 1. Pared celular vegetal. **(A).** Modelo de la pared celular primaria. **(B).** Modelo de la pared celular secundaria (Loqué et al., 2015).

1.1.1. Celulosa.

La celulosa es el biopolímero natural renovable y más abundante de la Tierra, puede ser potencialmente sometida a bioconversión en una variedad de productos de valor agregado (Baramée et al., 2017). Es el polisacárido más conocido de la pared celular. Es particularmente abundante en la pared celular secundaria, con alrededor del 20% - 30% de la masa seca de la mayoría de la pared celular primaria (McNeil, 1984). Su composición química consiste en cadenas lineales de glucosa unidas por enlaces β -1,4 unidos a moléculas de glucosa conectadas por puentes de hidrógeno que

empaquetan una estructura altamente cristalina recalcitrante (Cerde-Mejía, Valenzuela, Frías, Díaz, & Pastor, 2017).

1.1.2. Lignina.

La lignina es después de la hemicelulosa, el tercer biopolímero terrestre más abundante, cuenta con aproximadamente el 30% del carbón orgánico en la biosfera, es crucial para la integridad estructural de la pared celular, rigidez y resistencia del tallo. Adicionalmente, impermeabiliza la pared celular, lo cual permite el transporte de agua y solutos a través del sistema vascular y en la protección de la planta contra patógenos (Boerjan, Ralph, & Baucher, 2003). Son heteropolímeros aromáticos derivados de tres monómeros, los alcoholes p-cumarílico (4-hidroxicinamílico), coniferílico (4-hidroxi-3-metoxicinamílico) y sinapílico (4-hidroxi-3,5dimetoxicinamílico), que se enlazan por polimerización oxidativa, dando lugar a una red tridimensional con diferentes tipos de enlaces (Figura 2) (Vanholme, Demedts, Morreel, Ralph, & Boerjan, 2010). Se encuentra depositado principalmente en la pared celular secundaria y mantiene unidas las fibras celulósicas (Cerde, 2016).

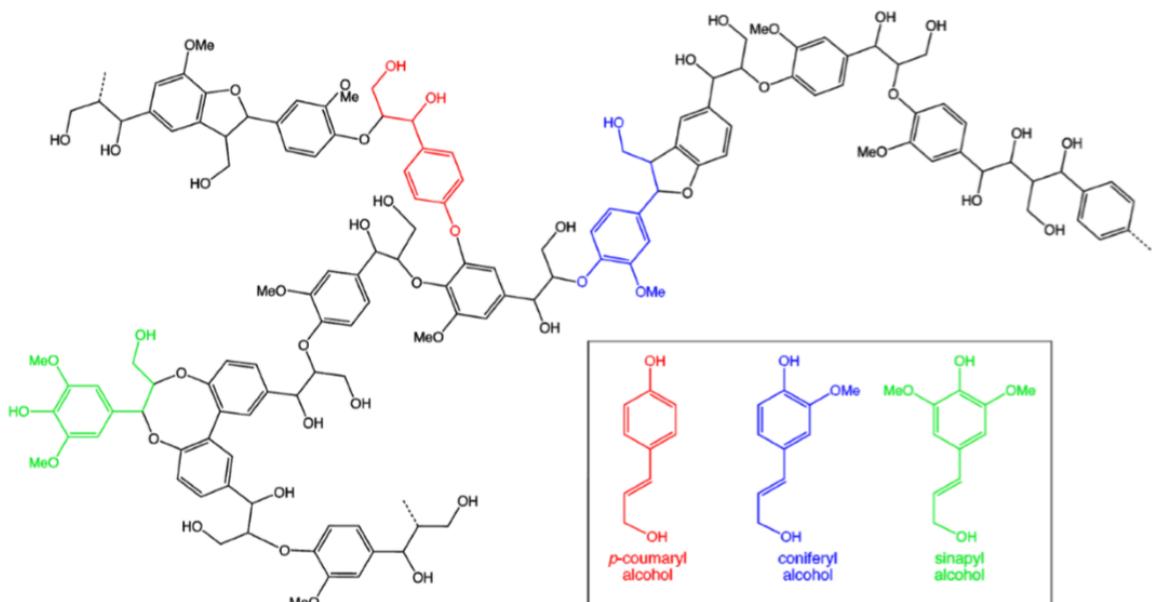


Figura 2. Estructura y composición de la lignina (Boerjan et al., 2003)

1.1.2.1. Biomasa lignocelulósica en el Ecuador.

La biomasa de origen lignocelulósico está constituida fundamentalmente por celulosa, hemicelulosas y lignina, tienen la ventaja de ser biodegradables y renovables. Posee amplias aplicaciones y constituye la base de muchas industrias como la de la celulosa y papel, industria química y de producción de derivados de gran importancia y valor agregado (Abril & Navarro, 2012).

Ecuador es un país fundamentalmente agrícola. Registró en 2010 una superficie dedicada a la agricultura de 7'303.674 hectáreas según encuestas del Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (Cedeño, Quijije, & Lozano, 2018). Los cultivos de cacao (*Theobroma cacao L.*), arroz (*Oryza sativa*), maíz (*Zea mays*) y caña de azúcar (*Saccharum spp. híbrido*) son de alta importancia económica para el país y cubren una extensión de suelo agrícola representativa de 1'387.453 hectáreas. (Instituto Nacional de Preinversión, 2014).

Los residuos agroindustriales utilizados presentan una composición mencionada en la Tabla 1 la que indica que el residuo con mayor cantidad de hemicelulosa es la cáscara de cacao.

Tabla 1: Composición química de los diferentes residuos agroindustriales

<i>Residuos</i>	<i>% Celulosa</i>	<i>% Hemicelulosa</i>	<i>% Lignina</i>	<i>Referencia</i>
Cáscara de cacao	35,4	37	14,7	(Daud et al., 2013)
Rastrojos de Maíz (tallos, hojas)	37,69	ND	18,59	(Carroll & Somerville, 2008)
Bagazo de caña	40-50	20-30	18-25	(Andrade & Colodette, 2014)
Salvado de arroz	19,74	ND	6,27	(Vargas, Alvarado, Vega Baudrit, & Porras, 2013)

*ND: No determinada

El cacao ecuatoriano es apreciado internacionalmente por las características únicas y calidad de sus almendras. Por tal motivo es un producto de exportación económicamente relevante para el país (Sánchez. et al., 2015). La cáscara de cacao constituye el 80% del fruto y es un producto de desecho utilizado principalmente en la

fertilización de suelos (**Camacho, 2015**). La producción anual de cacao en el año 2012 fue de 160.242,21 (TM/año) con un total de 1'986.314,08 (TM/año) de residuos (**Instituto Nacional de Preinversión, 2014**).

El arroz es la semilla de la planta *Oryza sativa*. Después del maíz, el arroz es el segundo cereal en producción mundial es decir que el arroz es el cereal más importante en la alimentación humana actual (**Martínez & Jiménez, 2016**). La producción de arroz en el año 2012 fue de 1'538.111,64 (TM/año) con un total de 2'099.527,92 (TM/año) de residuos (**Instituto Nacional de Preinversión, 2014**). El salvado, uno de los subproductos del arroz, se obtiene como resultado de pulir o blanquear el arroz integral para producir el arroz blanco; el cual representa el 10% del peso del grano (**Díaz, 2014**).

El maíz (*Zea mays*) es una gramínea anual originaria de México. Actualmente es el cereal más sembrado y volumen de producción en el mundo, superando al trigo y el arroz. Este cuenta con una producción anual de 920.280,42 (TM/año) en el año 2012. En cuanto a sus residuos, estos representan un total de 414.126,17 (TM/año) (**Instituto Nacional de Preinversión, 2014**).

La caña de azúcar (*Saccharum spp. híbrido*), es un cultivo emparentado con el sorgo y el maíz en cuyo tallo se forma y acumula un jugo rico en sacarosa. Constituye el cultivo de mayor importancia en la producción azucarera, además de poseer varios subproductos; entre ellos la producción de energía eléctrica derivada de la combustión del bagazo y alcohol de diferentes grados como carburante o farmacéutico (**Arellano et al., 2009; Instituto Nacional de Preinversión, 2014**).

En el 2012 existió una producción de 4'958.804,13 (TM/año) de caña de azúcar con un total de desperdicio de 798.966,16 (TM/año) (**Instituto Nacional de Preinversión, 2014**) del cual, el 16,112% representa el total de los residuos agrícolas que genera la caña de azúcar.

Así la biomasa es una de las fuentes de energía renovable más importante, porque posee polisacáridos que pueden ser aprovechables, ya que proviene de los residuos de la materia orgánica. Dichos residuos se originan principalmente de actividades agropecuarias, forestales y foresto industriales, residuos urbanos y además cultivos con fines energéticos (**Instituto Nacional de Preinversión, 2014**).

1.1.3. Hemicelulosa.

Las hemicelulosas son polisacáridos más heterogéneos y son la segunda estructura orgánica más abundante en la pared celular. (Vries, 2001). La composición de la hemicelulosa varía entre especies y tejidos (Valenzuela, 2012). Entre los carbohidratos poliméricos que constituyen la hemicelulosa, se incluyen manano, glucomanano, galactoglucomanano, calosa, xiloglucano y xilano; al ser este último, el principal componente de la hemicelulosa y constituye el segundo polímero más abundante en la tierra después de la celulosa. Representa aproximadamente un tercio del carbono orgánico renovable del planeta (Collins, Gerday, & Feller, 2005).

1.1.3.1.Xilano.

Es la principal hemicelulosa en maderas duras de las angiospermas y menos abundante en las maderas blandas de las gimnospermas, representando aproximadamente el 15-30 % y el 7-12 % de sus pesos secos totales, respectivamente (Wong, Tan, & Saddler, 1988). Los xilanos son las hemicelulosas dominantes en las plantas de todas las especies de *Gramineae* (Wilkie, Kennet, & Swee.-Leng, 1977).

Están compuestos por una cadena principal de residuos de xilopiranosos unidos con enlaces β -1,4 sustituidos de forma variable. Una modificación común de los xilanos es la sustitución con residuos α -1,2-glucuroxilano y 4-O-metil glucuroxilano (Valls, Diaz, Pastor, & Valenzuela, 2016).

1.1.3.2.Xilanasas.

Las xilanasas son glucosidasas (O-glucosidos hidrolasas, EC 3.2.1.x), las que catalizan la endohidrólisis de los enlaces 1,4- β -D-xilosídicos en xilano. Son un grupo extendido de enzimas, involucradas en la producción de xilosa, la cual es una fuente primaria de carbono para el metabolismo celular (Prade, 1995). Son producidas por bacterias, algas y hongos, en su gran mayoría estas enzimas son de origen fúngico o bacteriano, extracelulares o unidas a membrana, mesofílicas, y de actividad óptima a pH neutro o ligeramente ácido (Montoya, 2012). Las xilanasas bacterianas tienen diferentes características en comparación con enzimas fúngicas como en el pH óptimo o su especificidad del sustrato, el cual puede ser beneficioso en diferentes aplicaciones

(Poutanen, 1987). Dentro de este contexto, las xilanasas junto con otras enzimas como celulasas, son enzimas claves en la degradación del material de desecho lignocelulósico, el cual se emplea como materia prima en este proceso (Polo, 2016).

1.1.3.3. Degradación enzimática del xilano.

La degradación completa del xilano depende de la cooperación de toda una batería enzimática. Dentro de este grupo se destacan las siguientes enzimas: β -1,4 endoxilanasas (EC 3.2.1.8), que hidrolizan los enlaces β -1,4 que unen las xilosas del esqueleto de xilano de manera aleatoria, produciendo xilooligosacáridos de tamaños variables y las β -xilosidasas (EC 3.2.1.37) que hidrolizan los xilooligosacáridos formados por las endoxilanasas (Figura 3). Las cadenas laterales presentes en el xilano se hidrolizan por la acción de α -L-arabinofuranosidasas (EC 3.2.1.55), α -D-glucuronidasas (EC 3.2.1.139), acetilxilano esterasas (EC 3.1.1.72) y feruloil esterasas (EC 3.1.1.73) (Cerda, 2016) y p-cumárico esterasas (Figura 3). (Sainz, 2015).

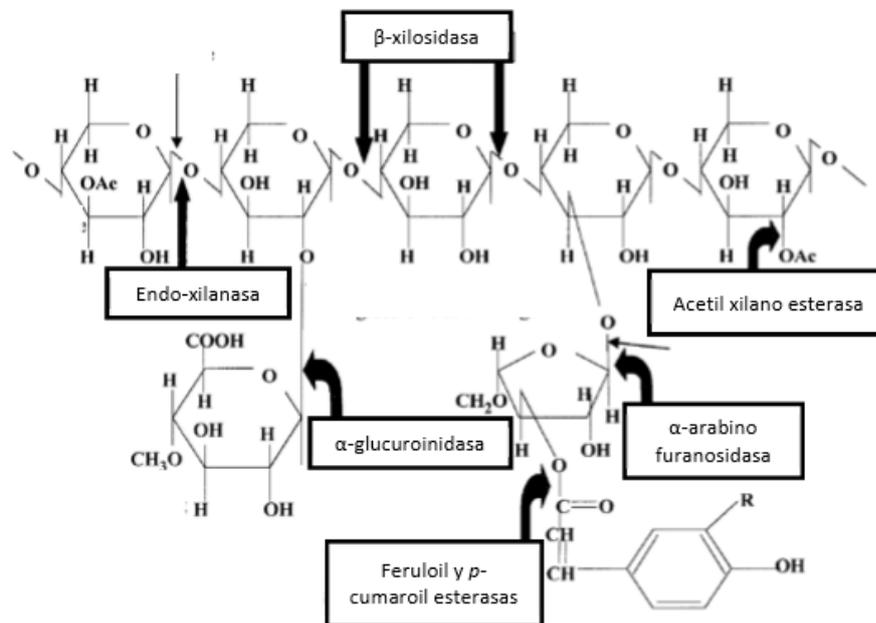


Figura 3. Estructura hipotética del xilano indicando sus ramificaciones y los diferentes sitios de corte de las enzimas del sistema xilanolítico. (Beg, Kapoor, Mahajan, & Hoondal, 2001)

1.2. *Paenibacillus barcinonensis*.

P. barcinonensis es una bacteria grampositiva, endosporulada identificada como una nueva especie. (Sánchez et al., 2005), fue aislada a partir de suelos de arrozal provenientes del Delta del Ebro (España) y seleccionada en función de su elevado poder xilanolítico, determinado por la producción de numerosas xilanasas tanto extracelulares como intracelulares (Blanco & Pastor, 1993). Por otra parte, *Paenibacillus* es un nuevo género de bacterias escindidas del género *Bacillus*, definido en 1993 (Ash, Priest, & Collins, 1993).

P. barcinonensis fue seleccionada como una especie productora de alto nivel de xilanasas en un medio suplementado con paja de arroz, demostrando la presencia de complejos sistemas de enzimas para degradación de xilano (Sánchez et al., 2005).

1.3. Xyn30D

Esta enzima multidominio compuesta por un módulo catalítico que pertenece a la familia GH30 y un módulo de unión a carbohidratos perteneciente a la familia CBM35, es una enzima xilanolítica proveniente de *Paenibacillus barcinonensis*, posee un peso molecular aparente de 59 kDa y un punto isoeléctrico de 6. El sustrato preferido por Xyn30D fue xilano de madera de haya y en sustratos que contengan glucoroxilanos y ácido metil glucónico, mostrando parámetros cinéticos con un K_m de 14,72 mg/mL y un valor de K_{cat} de 1,510 min^{-1} (Valenzuela, Diaz, & Pastor, 2012). Las condiciones óptimas de termoestabilidad para Xyn30D permanecieron altas a 50 °C después de 3 horas de incubación en buffer fosfato 150 mM a pH 6,5. (Valenzuela, 2012).

1.4. Cel6D

Enzima celobiohidrolasa proveniente de *Paenibacillus barcinonensis*, presenta un peso molecular aparente de 84 kDa. Tiene especificidad hacia el sustrato celulósico PASC (Celulosa hinchada) con un total de 0,66 U/mg proteína. (Cerdeja, 2016). El análisis del modo de acción de Cel6D indicó que libera celobiosa como el único producto de hidrólisis de la celulosa, mostrando parámetros cinéticos determinados en PASC con un K_m de 68,73 mg/mL y V_{max} de 1,73 U/mg. La enzima mostró actividad máxima a 47 °C en buffer acetato 50mM a pH 4. (Cerdeja-Mejía et al., 2017)

1.5. Aplicaciones biotecnológicas de las xilanasas.

Las xilanasas son usadas como aditivos para el mejoramiento de la digestibilidad de los alimentos, es usada también en la industria de la panadería para el mejoramiento de la calidad del pan, siendo también su uso para la obtención de xilooligosacáridos, para ser utilizados como prebióticos, es uno de los más recientes y prometedores usos de estas enzimas (**Valenzuela, Diaz, & Pastor, 2010**). La aplicación de las enzimas xilanolíticas está en aumento y de gran importancia en la industria en el preblanqueado de la pulpa Kraft, ya que disminuye el gasto de material químico (**Cooper, 2013**).

Recientemente, las xilanasas, están siendo utilizadas para incrementar la recuperación de azúcares de los residuos agrícolas para la producción de biocombustibles (**Mori, Noda, Tanaka, Ichinose, & Kamiya, 2015**).

1.6. Objetivos

1.6.1. Objetivo General

- Producir la enzima recombinante Xyn30D de *Paenibacillus barcinonensis* para la degradación de residuos agroindustriales.

1.6.2. Objetivos Específicos

- Analizar la actividad enzimática de Xyn30D en sustrato específico y residuos agroindustriales.
- Seleccionar y transformar diferentes líneas celulares con el plásmido que contienen el gen para la expresión de la enzima recombinantes Xyn30D.
- Analizar la actividad enzimática de Xyn30D sobre residuos agroindustriales.
- Evaluar la efectividad sinérgica de Xyn30D y Cel6D sobre residuos agroindustriales.
- Determinar la actividad enzimática de Xyn30D mediante HPTLC (Cromatografía de capa fina de alta rendimiento) en sustrato proveniente de residuos agroindustriales.

- Identificar la actividad enzimática de Xyn30D y Cel6D mediante HPTLC (Cromatografía de capa fina de alta rendimiento) en sustrato proveniente de residuos agroindustriales.

1.7.Hipótesis

1.7.1. Hipótesis nula

Ho: La enzima recombinante Xyn30D de *Paenibacillus barcinonensis* no tiene la capacidad de degradar sustratos xilanolíticos provenientes de residuos agroindustriales.

1.7.2. Hipótesis alternativa

Hi: La enzima recombinante Xyn30D de *Paenibacillus barcinonensis* tiene la capacidad de degradar sustratos xilanolíticos provenientes de residuos agroindustriales.

1.8.Señalamiento de variables de la hipótesis

1.8.1. Variable independiente

Enzima recombinante Xyn30D de *Paenibacillus barcinonensis*.

1.8.2. Variable dependiente

Residuos agroindustriales, cáscara de cacao, rastrojo de maíz, bagazo de caña y salvado de arroz.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

La parte experimental se desarrolló en los laboratorios de Alimentos funcionales BIOPROPEPTI, laboratorio de Análisis de Alimentos y en el laboratorio de Análisis Instrumental (UODIDE-ICIA, Proyecto de Canje de Deuda) de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

2.1. Materiales

2.1.1. Materiales de laboratorio

- Botellas con tapa azul
- Cajas Petri
- Asas Bacteriológicas
- Piseta
- Guantes de látex
- Guantes de nitrilo
- Mascarillas
- Gafas de protección
- Gradillas
- Papel Filtro
- Papel Parafilm
- Papel Aluminio
- Papel Industrial
- Toallas absorbentes
- Puntas para micropipetas
- Micropipetas 2-20 μL ; 20-200 μL ; 100-1000 μL y 10 mL
- Frascos de orina
- Vasos de precipitación
- Matraces Erlenmeyer
- Cubetas UV plásticas

- Cubetas de cuarzo
- Varillas de agitación
- Probetas
- Microtubos de 1,5 mL
- Cajas para microtubos de 1,5 mL
- Rack para tubos Falcón
- Tubos de ensayo con rosca
- Tubos cónicos para centrifuga Falcón de 15 y 50 mL
- Magnetos
- Rotuladores
- Cinta de autoclave
- Jabón
- Cloro
- Fundas celofán

2.1.2. Reactivos

- Alcohol 70%
- Alcohol industrial 96%
- Agua destilada
- Agua bidestilada
- Xilano de la madera de haya
- Triptona
- Extracto de Levadura (Becton, Dickinson)
- Bacto agar (Becton, Dickinson)
- Cloruro de Sodio (NaCl)
- Cloruro de Calcio (CaCl₂)
- Fosfato ácido de potasio (KH₂PO₄)
- Fosfato di ácido de potasio (K₂HPO₄)
- Ácido acético glacial (CH₃COOH)
- Carbón activado
- Hidróxido de sodio (NaOH)

- Glicerol 100% ($C_3H_8O_3$)
- Tris-HCl ($NH_2C(CH_2OH)_3 \cdot HCl$)
- SDS (Dodecilsulfato sódico) ($NaC_{12}H_{25}SO_4$)
- IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido) ($C_9H_{18}O_5S$)
- Lisozima
- TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina)
- Acrilamida (C_3H_5NO)
- Bis-acrilamida (N,N'-metilenbisacrilamida) ($C_7H_{10}N_2O_2$)
- Persulfato amónico ($(NH_4)_2S_2O_8$)
- β -mercaptoetanol (C_2H_6OS)
- Glicina ($C_2H_5NO_2$)
- Marcador de Proteína
- DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico)
- Ácido sulfúrico 96% (H_2SO_4)
- Etanol absoluto (CH_3CH_2OH)
- Cloroformo ($CHCl_3$)

2.1.3. Equipos

- Cámara de flujo laminar (ESCO/ACB-4 A2)
- Estufa (ESCO/LFA-110-2)
- Incubadora con agitación (Benchmark/CAT.H1001-M-E)
- Incubadora (ESCO/Isotherm)
- Balanza analítica (Adventurer Pro/OHAUS)
- Balanza analítica (Metler Toledo)
- Refrigerador (LG/GS65SPP1)
- Plancha de agitación (IK.C-MAG HS7)
- pH metro (Metler Toledo/SevenCompact)
- Ultracongelador (Binder)
- Autoclave (Hirayma/HV-110)
- Caja miniprep kit
- Vortex (Labnet/Mixer/VX200)

- Sonicador (Mrc/Sonic)
- Plancha de calentamiento para eppendorf (Labnet)
- Centrifuga (Hettich)
- Cámara de electroforesis
- Espectrofotómetro microplacas multiscan (Thermo Scientific)
- Nanodrop (Thermo Scientific)
- HPTLC (CAMAG)

2.2.Métodos

2.2.1. Microorganismos utilizados.

La cepa utilizada en el proyecto de investigación es *Escherichia coli BL21 (DE3)* adecuadas para la transformación y expresión de proteínas recombinantes (**Jeong, Kim, & Lee, 2015**).

El plásmido con el gen de codificación para la enzima recombinante Xyn30D, la cual pertenece a un grupo de xilanasas que produce el microorganismo *Paenibacillus barcinonensis*, fue proporcionado por la Dra. Liliana Cerda de la Universidad de Barcelona/Universidad Técnica de Ambato. Esta enzima fue seleccionada para este estudio, puesto que tiene una gran efectividad en la degradación de xilano (**Cerda, 2016**).

2.2.2. Medio de cultivo de células bacterianas.

Para el crecimiento de las diferentes células bacterianas en medio líquido y sólido se utilizó medio de cultivo LB (Luria Berthani) (**Gallardo, 2007**). La composición del medio líquido es 10 g/L de bactotripton, 5 g/L de extracto de levadura y 10 g/L de NaCl y más 1,5% de agar para el medio sólido, se prepararon con agua destilada. La utilización de medios y material de vidrio o de plástico que se utilizaron durante el trabajo de investigación, se esterilizo por calor húmedo en autoclave (Hirayma/HV-110) por 15 minutos a 121 °C.

2.2.3. Antibióticos e inductor.

Según lo establecido por **Gallardo, (2007)**, se prepararon las concentraciones de los siguientes los antibióticos:

Cloranfenicol (Cho⁺). Se preparó una solución concentrada de 20 mg/mL en etanol y se guardó a -20 °C. Se utilizó para el medio una concentración de 20 µg/mL.

Ampicilina (Amp). Se preparó una solución concentrada de 500 mg en 5 mL de agua bidestilada, a la que se añadieron NaOH 10 N hasta la completa solubilización de la ampicilina y separando los excipientes por filtración y guardándolos a -20 °C. Se utilizó a una concentración de 100 µg/mL.

IPTG (isopropil-B-tiogalactopiranosido). Se preparó a una concentración de 1 M en agua bidestilada y se guardó a -20 °C. Se utiliza a una concentración de 1 mM para la inducción de la expresión genética.

2.2.4. Inoculación y cultivo de microorganismos.

La siembra de microorganismos se realizó en medio líquido y en medio sólido. En medio sólido para evidenciar el crecimiento de las cepas *E. coli BL21(DE3)* se sembró en placas de LB (20 mL) con su respectivo antibiótico y se incubó a 37 °C por 18 horas. Transcurrido el tiempo se guardó a 4 °C, refrescándolas cada mes para conservar su viabilidad. En medio líquido (primer overnight) se inoculó 200 µL de células *E. coli BL21(DE3)* en 2 mL de LB con 2 µL de antibióticos y se incubó a 37 °C por 18 horas con agitación a 200 rpm (incubador Benchmark).

2.2.5. Preparación de las células competentes.

Se utilizó el cultivo nocturno y se agregó 20 mL de medio LB líquido con la cantidad requerida de antibióticos y se dejó en la incubadora a 37 °C durante una hora a 200 rpm. Se utilizaron 2 mL del overnight para hacer células competentes y el resto se mezcló con 35% de glicerol y se guardaron alícuotas de 200 µL de cultivo en tubos eppendorf a -80 °C. Para la preparación de células competentes se utilizó el método **CaCl₂ (Cohen, Chang, & Hsu, 1972)**. Para la metodología de CaCl₂ se realizó un overnight que contenía 5 mL de medio LB, se tomaron 2 mL del cultivo nocturno y se inoculó en 20 mL de medio fresco se incubó a 37 °C a 200 rpm hasta cuando el cultivo

se encuentra en una fase exponencial temprana de crecimiento (DO_{600} 0,3 – 0,4). A continuación, se reposó en hielo por 20 minutos y se centrifugó a 3000 rpm por 5 minutos, transcurrido ese tiempo se descartó el sobrenadante y en el pellet se agregará 2 mL de $CaCl_2$ 50 mM, luego se reposó en hielo por una hora. Nuevamente se centrifugó por 15 minutos a 3000 rpm, se descartó el sobrenadante, se agregó 2 mL de $CaCl_2$ 50 mM 15% de glicerol y se incubó a 4°C durante 4 horas. Finalmente se realizó una alícuota de 100 μ L y se guardó a -80 °C.

2.2.6. Transformación de células competentes con plásmido de interés.

Para proceder a la transformación; se mezcló una alícuota de 100 μ L de células competentes con 2 μ L del ADN a introducir y se mantuvo en hielo por un minuto. Luego se sometió las células a un choque térmico a 42 °C por 45 segundos en baño termostático y de inmediato se colocó en hielo y se añadió un mL de medio LB. Se incubó a 37 °C por una hora a 200 rpm y se enfrió por un minuto. Seguidamente se realizó un overnight con 400 μ L de células transformadas en 20 mL de LB con su respectivo antibiótico, posterior se incubó a 37 °C durante toda la noche junto con una siembra en placa de LB con los 200 μ L de células restantes transformadas. Transcurrido el tiempo descrito; en el cultivo nocturno líquido se añadió 30% de glicerol y se guardó en alícuotas de 200 μ L en tubos eppendorf a -80 °C y las placas sembradas a 4 °C.

2.2.7. Extracción de ADN plasmídico.

El plásmido con que se trabajó en el proyecto de investigación provino del plásmido Xyn30D transformado en células competentes de *E. coli* DH5 α . Posteriormente se extrajo el ADN plasmídico utilizando S.N.A.P. Miniprep, se siguió el protocolo del kit comercial. Se comprobó la pureza del plásmido extraído mediante nanodrop.

2.2.8. Extracción de ADN plasmídico mediante el uso del kit comercial S.N.A.P. Miniprep.

Se resuspendió el contenido de 1,55 mg de RNasa en 200 μ L de buffer de resuspensión y se lo almacenó a 4 °C, para luego añadir 25 mL de solución lavado final 4x en 75 mL de etanol al 95% y se realizó una solución de 100 mL de lavado final 1x. Se

resuspendió el pellet de células en 150 μ L de buffer resuspensión pipeteando con cuidado de arriba hacia abajo para luego añadir 150 μ L de buffer lisis, invirtiendo el tubo suavemente de 5 a 6 veces para su mezclado, incubar 3 minutos a temperatura ambiente y se añadieron 150 μ L de sal de precipitación, invirtiendo de 6 a 8 veces para que se mezcle homogéneamente, finalmente se centrifugó a 25 °C por 5 minutos a 14000 rpm.

Se removió el sobrenadante y se lo transfirió a un tubo de microcentrifuga estéril, añadiendo 600 μ L de buffer de unión, invirtiendo de 5 a 6 veces para su correcto mezclado, dejándolo reposar por 3 minutos a temperatura ambiente; pasado el tiempo antes mencionado se centrifugo a 25 °C por 30 segundos a 3000 rpm y se desechó el sobrenadante.

Para el lavado se añadió 500 μ L de buffer de lavado y se centrifugo a 3000 rpm por 30 segundos, con descarte del sobrenadante; 900 μ L de la solución 1x lavado final se añadieron al spin de la columna que luego se centrifugo a 3000 rpm por 30 segundos, desechando de igual manera el sobrenadante y volviendo a centrifugar a 13000 rpm por un minuto; la columna del SNAP Miniprep se transfirió a tubos viales en donde se añadió 50 μ L de agua estéril en el centro de la columna, la cual se centrifugo a 13000 rpm por un minuto, para luego desechar la columna antes mencionada.

2.2.9. Expresión de proteínas.

Las cepas recombinantes se cultivaron en 20 mL de medio LB y Amp⁺ 100 μ g/mL a 37 °C por 16:30 horas con agitación de 200 rpm, tras su crecimiento; se escaló a 500 mL de medio LB con los antibióticos correspondientes y se incubó hasta llegar a una fase exponencial (DO_{600} 0,6 – 0,8). Esta densidad corresponde al crecimiento exponencial de las células, el cual será el instante clave para inducir la sobreexpresión de la proteína. Entonces se indujo la expresión del gen y producción de la proteína recombinante con IPTG 1 mM y una incubación de 37 °C por 3 horas. Se colectaron las células por centrifugación a 4000 rpm durante 20 minutos a una temperatura de 4 °C, se añadió 12,5 mL de buffer Tris 20 mM pH 7 y se guardó a -80 °C.

2.2.10. Obtención de los extractos celulares.

Para la ruptura de células se utilizó el sonicador Ultrasonic cell crusher, por tres ciclos durante 9 minutos con pausas de 10 segundos. Se centrifugó a 15000 rpm por 15 minutos a 4 °C y se guardó el sobrenadante a -20 °C en alícuotas de 1,5 mL en tubos viales eppendorf.

2.2.11. Análisis de expresión de proteína recombinante Xyn30D.

Para el análisis de proteínas se aplicó electroforesis en geles de acrilamida (SDS-PAGE). (Laemmli, 1970). Esta técnica separa las proteínas según su peso molecular de manera que se comprobara si la expresión que se llevó a cabo es correcta. Para la visualización de las bandas; en primer lugar, se tiñó con azul de Coomassie por 15 minutos, se removió y se añadió la solución destaining por 24 horas.

2.3.Preparación de sustrato específico y xilanolíticos.

2.3.1. Sustrato específico.

Para la enzima Xyn30D se usó como sustrato xilano de madera de haya (Valenzuela, 2012), el cual fue proporcionado por la Dra. Cerda de la Universidad de Barcelona/Universidad Técnica de Ambato. Luego se procedió a la determinación de los azúcares reductores empleando el método de DNS.

2.3.2. Sustrato rico en xilosa.

Los residuos agroindustriales seleccionados para este estudio fueron: salvado de arroz, caña de maíz, cáscara de cacao y bagazo de caña de azúcar, los cuales se obtuvieron en Santo Domingo, Baños (Sector Totoras Km 5 1/2) y Latacunga, respectivamente. Los residuos fueron sometidos a un pretratamiento de reducción de tamaño mecánico. Para lo cual se procedió a la molienda y esterilización en el autoclave (Hirayma/HV-110) por 2 horas a 121°C.

2.4. Determinación de la actividad enzimática en sustrato específico y residuos agroindustriales.

Para conocer la sinergia entre Xyn30D y Cel6D se realizaron diferentes pruebas de la reacción enzimática que se detallan en la Tabla 2.

Tabla 2. Pruebas de sinergia entre Xyn30D y Cel6D

<i>Prueba</i>	<i>Método</i>	
1	Se pesaron 10 mg de residuo al que se le añadieron 600 µL de buffer acetato pH 5,4 150 mM y 200 µL de Xyn30D. Se incubaron todas las muestras a 50 °C por 15 minutos a 200 rpm, posteriormente colocándolas en hielo; se añadió 400 µL de Cel6D a cada tubo y se incubó a 47 °C por 30 minutos a 200 rpm y se inactivo el coctel enzimático a 95 °C por 5 minutos.	Todos los procedimientos fueron realizados en hielo y contaron con un blanco para cada residuo.
2	Se pesaron 10 mg de residuo al que se le añadieron 600 µL de buffer acetato pH 5,4 150 mM, 400 µL de Cel6D y 200 µL de Xyn30D. Se incubaron todos los tubos a 48 °C por 30 minutos a 200 rpm y se inactivo el coctel enzimático a 95 °C por 5 minutos.	
3	Se pesaron 10 mg de residuo al que se le añadieron 600 µL de buffer acetato pH 5,4 150 mM y 200 µL de Xyn30D. Se incubaron todas las muestras los tubos a 50 °C por 15 minutos a 200 rpm y se hirvió a 95 °C por 5 minutos, colocando los tubos en hielo. Se añadió 400 µL de Cel6D; se incubó a 47 °C por 30 minutos a 200 rpm y se inactivo el coctel enzimático a 95 °C por 5 minutos.	

La actividad enzimática se estableció por la cuantificación de la producción de los azúcares reductores producidos en la reacción enzimática. Se determinó por el método de DNS (Miller, 1959), que es un método colorimétrico que emplea ácido 3,5 dinitrosalicílico con el objetivo de hidrolizar los polisacáridos presentes en la muestra y se lo determinó por espectrofotometría a una absorbancia de 540 nm.

2.5. Análisis de azúcares reductores mediante cromatografía de capa fina de alto rendimiento (HPTLC).

Para el análisis de cromatografía HPTLC, se activaron las placas de sílica a una temperatura de 100 °C por una hora para guardarlas posteriormente en el desecador. Las muestras preparadas fueron colocadas en tubos viales de cristal, pasándolas por un filtro para eliminar impurezas. Como patrones se utilizaron dos soluciones de xilosa y glucosa diluidas en agua bidestilada a una concentración de 10 mg/mL, para la identificación de los productos generados por la hidrólisis y sinergia de los diferentes residuos agroindustriales.

2.6. Análisis estadístico.

Para el análisis de resultados se utilizó un diseño factorial AxB, donde los factores son los diferentes residuos agroindustriales y el tiempo. Los datos fueron analizados en el programa estadístico STATGRAPHICS, utilizando un ANOVA multifactorial con un 95% de confianza, usando pruebas de significancia como Tukey y Duncan.

Tabla 3. Diseño experimental usado en el experimento.

<i>Factor A: Tiempo de reacción enzimático (horas)</i>	<i>Factor B: Tipo de desechos agroindustriales</i>
A1. 0,25	B1. Salvado de arroz B2. Cáscara de cacao B3. Bagazo de caña B4. Rastrojo de maíz
A2. 0,50	
A3. 1	
A4. 2	
A5. 4	
A6. 12	
A7. 24	
A8. 48	
A9. 72	

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis y discusión de datos

3.1.1. Expresión de la enzima Xyn30D de *Paenibacillus barcinonensis* en *E. coli* BL21 (DE3) y *E. coli* TF(H2).

Para la expresión de la enzima recombinante Xyn30D se utilizaron cepas de *E. coli* BL21 (DE3) y *E. coli* (TF2), para evidenciar su crecimiento estas fueron transformadas con el plásmido pET101Xyn30D y se incubó durante toda la noche. Para la inducción del plásmido se trabajó con cultivos en fase exponencial (OD_{600} 0,6 – 0,8), se realizó la expresión con IPTG 1 mM a 37 °C por 2 horas con agitación a 200 rpm para la cepa recombinante obtenida con *E. coli* BL21 (DE3). Mientras que con *E. coli* (TF2) no se observó crecimiento al realizar las mediciones de absorbancia, presumiendo que al no haber expresión esto puede deberse a varios factores como la temperatura al inicio y durante la expresión, la concentración del inductor (IPTG) o de la presencia de una chaperona, sin embargo, son numerosas las variables que pueden afectar el sistema de expresión, por lo que lo hace difícil de identificar y controlar (**Papaneophytou & Kontopidis, 2014**). Por lo que se optó a realizar la transformación y el crecimiento de la cepa recombinante *E. coli* BL21 (DE3)/pET101Xyn30D como se observa en la Figura 4, ya que esta cepa mejora la estabilidad del mRNA, por lo que al expresar la proteína esta puede incrementarse hasta diez veces (**Valenzuela, 2012**).



Figura 4: (A) Extracto celular de *E. coli* BL21 (DE3) que contiene a la enzima Xyn30D y (B) Pellet de células (no se evidencia presencia de la enzima), electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

3.1.2. Análisis de la actividad enzimática de Xyn30D en sustrato específico.

La enzima Xyn30D mostró actividad enzimática sobre sustrato específico (xilano de madera de haya) que se detalla en la Tabla 4, el cual fue determinado mediante cuantificación de azúcares reductores. (Valenzuela et al., 2012). menciona que la actividad de Xyn30D sobre xilano de madera de haya es de 30,3 U/mg de proteína, siendo este el sustrato específico de la enzima. Al realizar una comparación de la actividad enzimática relativa se observa que las unidades enzimáticas reportadas bibliográficamente pertenecen a la enzima pura (100%), sin embargo, la actividad de la enzima proveniente del extracto celular aumenta un 286,04% al ser esta más estable. Esto puede deberse a que el experimento realizado por (Valenzuela et al., 2012) utilizaron el método IMAC (cromatografía de afinidad con metal inmovilizado) como procedimiento de purificación, utilizando columnas HisTrap HP de 1 mL, eluyendo en buffer fosfato 20mM (pH 7,4) con un gradiente de imidazol entre 0 a 500 mM. Por lo que el imidazol actúa como un desnaturizante suave que interrumpe las interacciones de proteínas y, por lo tanto, facilita la liberación de proteínas unidas a ligandos de afinidad. (Seed, 1998), señalando de igual manera al buffer utilizado, ya que este tampón inhibe muchas enzimas, incluidas la carboxipeptidasa, la ureasa, así como muchas quinasas y deshidrogenasas. (Stoll & Blanchard, 2009). Y al comparar la altitud de las ciudades en las que se realizaron los experimentos, teniendo la ciudad de Barcelona una altitud de 13 metros sobre el nivel del mar (CNIG, 2015) y Ambato con

2580 metros sobre el nivel del mar. (Mart, Fern, Grande, & Vela, 2009). Siendo estas algunas causas de que las unidades enzimáticas bibliográficas sean menores a las reportadas en este trabajo de investigación, ya que no se trabajó con la enzima pura sino con el extracto celular para los diferentes tratamientos.

Tabla 4. Actividad enzimática de Xyn30D en sustrato específico

<i>Temperatura</i> (°C)	<i>Tiempo</i> (minutos)	<i>U/mg proteína</i>	<i>U/mg proteína</i> <i>bibliográfico</i>
50	15	86,67	30,3
	30	57,46	

3.1.3. Análisis de la actividad enzimática de Xyn30D en diferentes residuos agroindustriales.

La actividad enzimática de Xyn30D fue evaluada en diferentes residuos agroindustriales como se describe en la Figura 5. En la Figura 5B se muestra la actividad enzimática sobre cáscara de cacao; se observa que a las 0,25 horas tiene una actividad enzimática de 468,3 U/mg proteína y que esta actividad se reduce en 61,5% al realizar la reacción durante 0,5 horas y después de 72 horas de incubación la actividad de Xyn30D es nula, **Valenzuela 2012**, menciona que Xyn30D en periodos largos de incubación presenta inhibición de actividad por efecto de la temperatura y por producto. El mismo comportamiento se evidencia sobre bagazo de caña (Fig5C), rastrojo de maíz (Fig5D) ya que la enzima tiene una actividad de 311,7 y 157,1 U/mg proteína respectivamente y posee el mismo comportamiento descrito anteriormente; presentando un porcentaje promedio de 58,5%. Sin embargo, no se observó actividad sobre salvado de arroz (Fig5A), que puede deberse a que el contenido de lignina (20-25%) y celulosa (35-40%), es superior a la hemicelulosa (15-20%) (**Castro, Macías, & Otalvaro, 2010**).

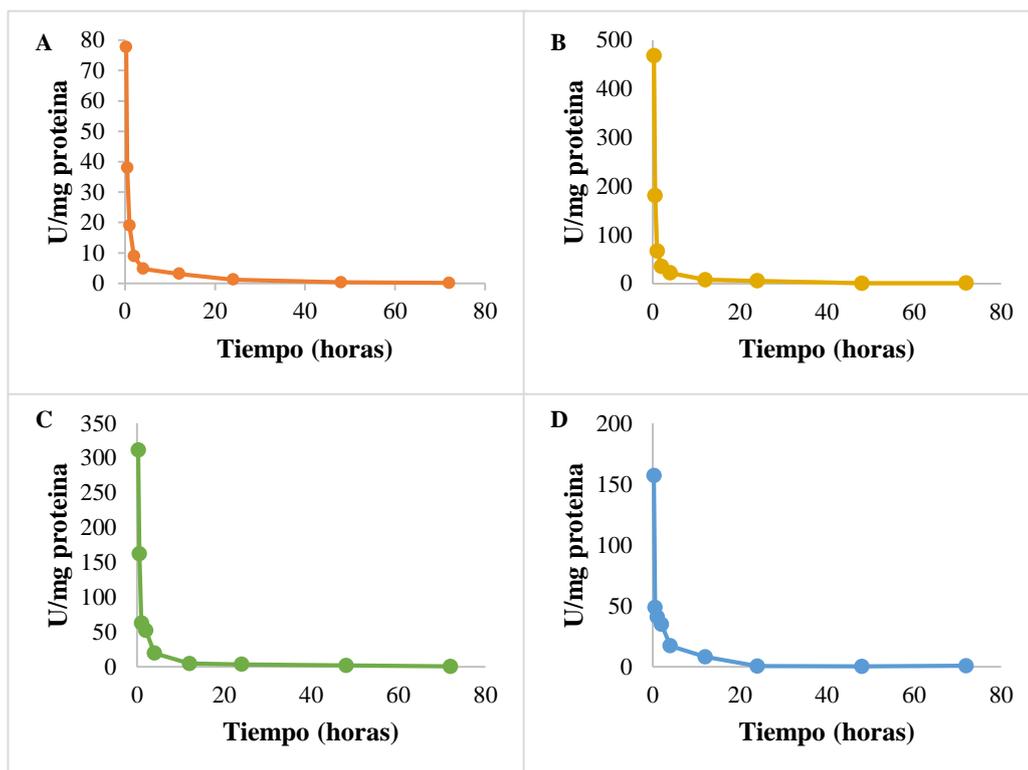


Figura 5. Actividad enzimática de Xyn30D evaluada en diferentes residuos agroindustriales: Salvado de arroz (A), cascara de cacao (B), bagazo de caña (C), rastrojo de maíz (D).

3.1.4. Evaluación de la actividad sinérgica de Xyn30D y Cel6D sobre residuos agroindustriales.

En la Figura 6, se detalla la actividad enzimática producida por la sinergia entre las enzimas Xyn30D y Cel6D expresada en la absorbancia medida a 540 nm, debido a que es difícil conocer la proporción de los productos de la degradación de la xilanas (xilooligosacáridos y xilosa) (Valls et al., 2018) y la celulasa (celobiosa) (Cerdeña-Mejía et al., 2017)

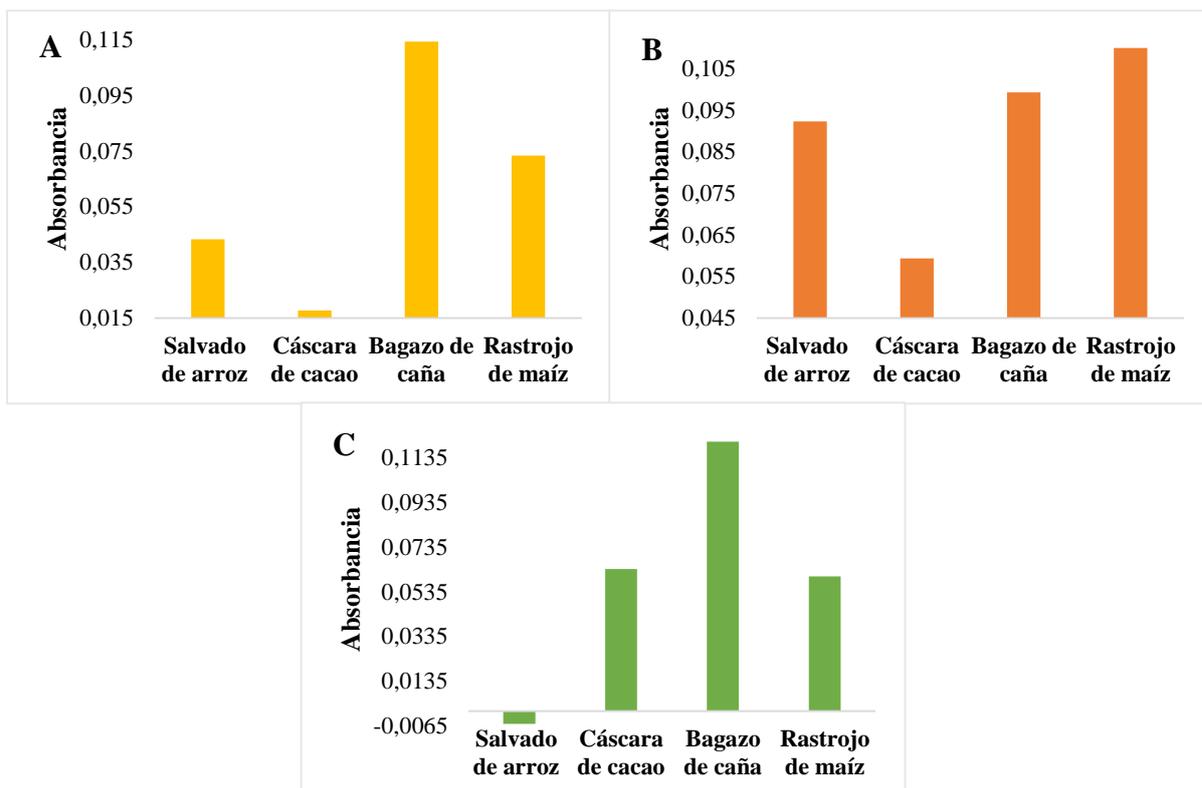


Figura 6. Sinergia de Xyn30D y Cel6D sobre residuos agroindustriales: Prueba 1 (A), prueba 2 (B) y prueba 3 (C). Las pruebas de sinergia son detalladas en el capítulo 2 en la Tabla 2).

3.1.5. Determinación de la actividad enzimática de Xyn30D mediante el uso de cromatografía HPTLC de los diferentes residuos agroindustriales.

En la Figura 7 se observa los productos resultantes de la degradación enzimática de Xyn30D con respecto a los residuos agroindustriales, mediante el uso de cromatografía de capa fina de alta resolución, en donde se utilizó como fase estacionaria placas de sílice más una mezcla de solventes los cuales permitieron la separación de los componentes de las muestras analizadas.

Se presume que al momento de la hidrólisis se obtuvo xilobiosa y xilooligosacáridos, por lo que las xilanasas actúan sobre los enlaces β -1,4 en las cadenas de xilano formando los compuestos antes mencionados (Martins, 2017). Al no poseer un equipo MALDI-TOF no se pudo realizar la comprobación de los productos generados en la reacción enzimática, ya que el equipo nos ayuda a detectar la relación masa/carga con el que podemos caracterizar los productos de reacción de las enzimas al perfilar proteínas bacterianas a partir de extractos celulares (Carbonnelle et al., 2011).

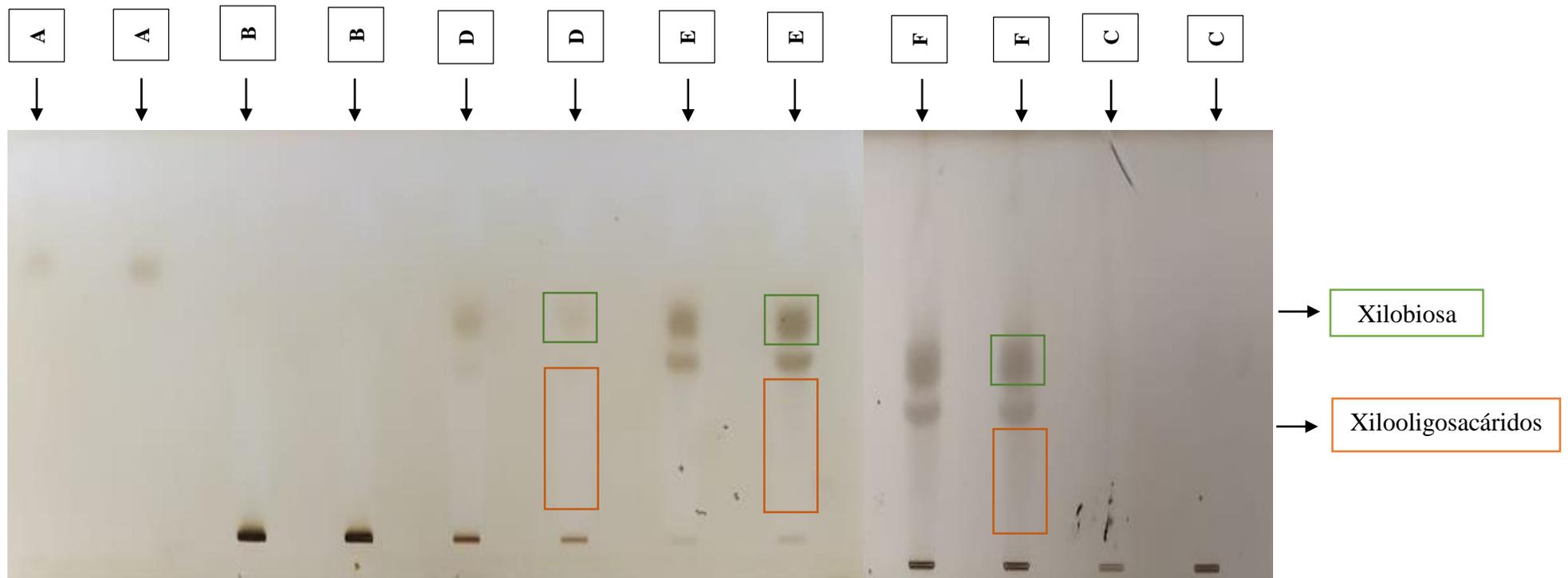


Figura 7. Análisis mediante cromatografía de HPTLC de los productos generados mediante la reacción enzimática de Xyn30D en sustratos agroindustriales. De estándar se utilizó xilosa (A) y las muestras a analizar fueron, xilano de madera de haya (B), salvado de arroz (C), cáscara de cacao (D), bagazo de caña (E), rastrojo de maíz (F), teniendo cada una un control que contenía la enzima inactivada.

3.1.6. Determinación de azúcares reductores provenientes de la actividad sinérgica entre Xyn30D y Cel6D mediante cromatografía HPTLC.

En la **Figura 8** se puede observar la reacción enzimática producida por la sinergia entre las enzimas Xyn30D y Cel6D, en donde se muestran los diferentes azúcares producidos, en el que se asume existió formación de celobiosa por parte de Cel6D, al ser esta una enzima celobiohidrolasa (**Cerda, 2016**). Por parte de Xyn30D puede haber producción de xilooligosacáridos, mencionados en el apartado 3.1.5.

Al comparar las muestras con el estándar de xilosa, se puede observar que no existe presencia de azúcares reductores, por lo que se asume que la actividad catalítica de Xyn30D no fue la mejor a comparación de Cel6D, en donde se observa productos de hidrólisis con respecto al estándar de glucosa.

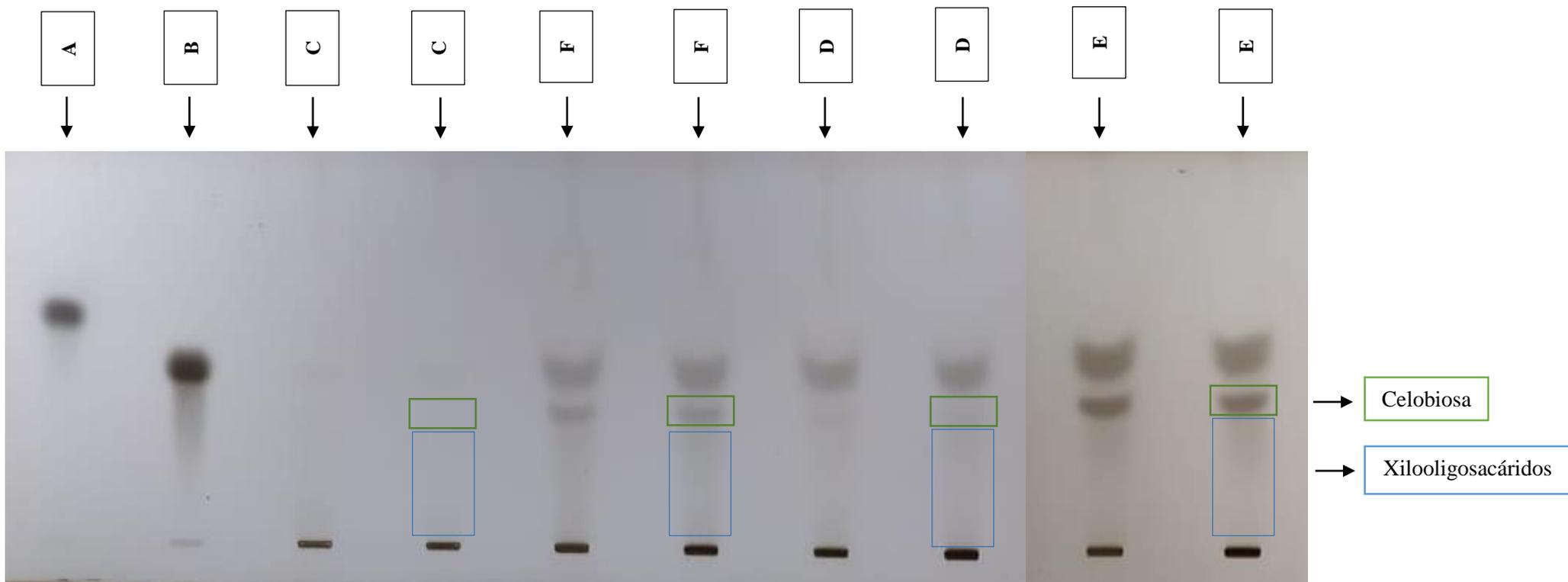


Figura 8. Análisis mediante cromatografía de HPTLC de los productos generados mediante la sinergia entre Xyn30D y Cel6D en sustratos agroindustriales. De estándar se utilizó xilosa (**A**) y glucosa (**B**), las muestras a analizar fueron, salvado de arroz (**C**), cáscara de cacao (**D**), bagazo de caña (**E**), Rastrojo de maíz (**F**), teniendo cada una un control con las enzimas inactivadas.

3.1.7. Análisis estadístico

Se aplicó un ANOVA multifactorial como se indica en la Tabla 5 para evaluar la influencia que existe entre el tiempo de incubación de la reacción enzimática con los diferentes residuos agroindustriales. Se estableció que el Factor A (Tiempo de incubación) con respecto del Factor B (Residuos agroindustriales) existe diferencia significativa en el cálculo de unidades enzimáticas (U/mg proteína) al ser el valor de p igual a 0.05

Tabla 5. Análisis de varianza en relación a la actividad enzimática (U/mg proteína) de Xyn30D sobre residuos agroindustriales a diferentes tiempos de incubación.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Efectos Principales					
A: Tiempo	440882,	8	55110,2	101992,73	0,0000
B: Residuos agroindustriales	55268,7	3	18422,9	34095,36	0,0000
INTERACCIONES					
AB	162270,	24	6761,24	12513,05	0,0000
RESIDUOS	19,4521	36	0,540335		
TOTAL (CORREGIDO)	658440,	71			

Tabla 6. Prueba de comparación Tukey en relación al tiempo de incubación

Tiempo (horas)	Casos	Media	Sigma	Grupos Homogéneos
72	8	0,37775	0,259888	X
48	8	0,479125	0,259888	X
24	8	2,34012	0,259888	X
12	8	5,46925	0,259888	X
4	8	15,5961	0,259888	X
2	8	32,1711	0,259888	X
1	8	46,6888	0,259888	X
0,5	8	106,664	0,259888	X
0,25	8	253,067	0,259888	X

Tabla 7. Prueba de comparación Duncan en relación al tiempo de incubación

Tiempo (Minutos)	Casos	Media	Sigma	Grupos Homogéneos
72	8	0,37775	0,259888	X
48	8	0,479125	0,259888	X
24	8	2,34012	0,259888	X
12	8	5,46925	0,259888	X
4	8	15,5961	0,259888	X
2	8	32,1711	0,259888	X
1	8	46,6888	0,259888	X
0,5	8	106,664	0,259888	X
0,25	8	253,067	0,259888	X

En las Tablas 6 y 7 se observa que las pruebas de comparación Tukey y Duncan donde señalan que los tiempos de incubación a 48 y 72 horas el comportamiento estadístico es igual, ya que la enzima comienza a perder efectividad.

Tabla 8. Prueba de comparación Tukey en relación a los residuos agroindustriales

Residuos agroindustriales	Casos	Media	Sigma	Grupos Homogéneos
Salvado de arroz	18	16,6455	0,173259	X
Rastrojo de maíz	18	33,8219	0,173259	X
Bagazo de caña	18	68,1784	0,173259	X
Cáscara de cacao	18	87,0666	0,173259	X

Tabla 9. Prueba de comparación Duncan en relación a los residuos agroindustriales

Residuos agroindustriales	Casos	Media	Sigma	Grupos Homogéneos
Salvado de arroz	18	16,6455	0,173259	X
Rastrojo de maíz	18	33,8219	0,173259	X
Bagazo de caña	18	68,1784	0,173259	X
Cáscara de cacao	18	87,0666	0,173259	X

En las Tablas 8 y 9 las pruebas de comparación indican que estadísticamente existe mayor actividad enzimática en cáscara de cacao y muy poca actividad en salvado de arroz.

3.1.8. Verificación de la hipótesis

Al realizar y analizar los datos mediante un ANOVA multifactorial con un nivel de confianza de 95%, se acepta la hipótesis alternativa, debido a que la enzima recombinante Xyn30D de *Paenibacillus barcinonensis* tiene la capacidad de degradar sustratos xilanólicos con excepción del salvado de arroz. La mejor actividad enzimática fue con cáscara de cacao a partir de los 15 minutos de incubación.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- Se produjo la enzima recombinante Xyn30D proveniente de *Paenibacillus barcinonensis*, la cual manifestó un enorme potencial en la degradación de residuos agroindustriales.
- Se analizó la actividad enzimática de Xyn30D sobre sustrato específico (xilano de madera de haya), la cual reportó una alta actividad de degradación al encontrarse la enzima en sus óptimas condiciones de hidrólisis, generando valores de U/mg de proteína mayores a las reportadas bibliográficamente.
- Se seleccionó y transformó el plásmido de la enzima recombinante Xyn30D en *E.coli (BL21 DE3)*, mostrando un efectivo crecimiento y expresión de la misma.
- Se analizó la actividad enzimática de Xyn30D en residuos agroindustriales, indicando mayor actividad en cacao, seguido de bagazo de caña y maíz; pero no mostró actividad en salvado de arroz, al presentar este último una gran cantidad de material lignocelulósico en su estructura, por lo que le resultó imposible a la enzima degradarlo.
- Se evaluó la actividad sinérgica entre Xyn30D y Cel6D por cromatografía de HPTLC, donde se observó productos de hidrólisis de Cel6D, pero de Xyn30D con respecto a su estándar de xilosa no se observaron productos.
- Se determinó que la actividad enzimática de Xyn30D fue mayor en residuos que contenían grandes cantidades de xilano en su estructura, pudiendo sustentar mediante el uso del cromatógrafo HPTLC, en donde nos indicó las diferentes separaciones de los azúcares producidos por la hidrólisis del xilano,

pero se asumió los productos generados en la reacción ya que no se comprobó mediante el uso del equipo MALDI-TOF.

4.2. Recomendaciones

- Trabajar en condiciones estériles para poder realizar de manera correcta la siembra de la enzima en su medio de cultivo.
- Realizar resiembras del medio de crecimiento de Xyn30D, ya que si se la deja mucho tiempo esta comienza su fase de muerte lo que nos dificulta al momento de expresar la enzima.
- Para una mejor degradación de residuos agroindustriales, trabajar con más enzimas como celulasas y xilanasas.

MATERIAL DE REFERENCIA

5.1. Referencias bibliográficas

- Abril, A., & Navarro, E. (2012). Etanol a partir de biomasa lignocelulósica. Aleta ediciones. Ecija, España. 101, 18.
- Andrade, M. F., & Colodette, J. L. (2014). Dissolving pulp production from sugar cane bagasse. *Industrial Crops and Products*, 52, 58–64.
- Arellano, A. C., Korneva, S. B., Fischer, F. C., Cabanilla, L., Tola, N., Leal, M. R., & Pincay, A. (2009). Micropropagación de caña de azúcar en Ecuador. *Biotecnología ambiental*, 9(4), 235–238.
- Ash, C., Priest, F. G., & Collins, M. D. (1993). Molecular identification of rRNA group 3 bacilli. *Antonie van Leeuwenhoek*, 64(3–4), 253–260.
- Baramee, S., Teeravivattanakit, T., Phitsuwan, P., Waeonukul, R., Pason, P., Tachaapaikoon, C., Ratanakhanokchai, K. (2017). A novel GH6 cellobiohydrolase from *Paenibacillus curdlanolyticus* B-6 and its synergistic action on cellulose degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(3), 1175–1188.
- Beg, Q. K., Kapoor, M., Mahajan, L., & Hoondal, G. S. (2001). Microbial xylanases and their industrial applications: A review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56(3–4), 326–338.
- Blanco, A., & Pastor, F. I. J. (1993). Characterization of cellulase-free xylanases from the newly isolated *Bacillus sp.* strain BP-23. *Canadian Journal of Microbiology*, 39(12), 1162–1166.
- Boerjan, W., Ralph, J., & Baucher, M. (2003). Lignin Biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*, 54(1), 519–546.
- Camacho, G. (2015). Elaboración de un tablero de partículas a partir de la cáscara de cacao y su aplicación para cielos rasos y paredes, (tesis de pregrado) Universidad Particular de Loja, Ecuador. 115, 1.
- Carbonnelle, E., Mesquita, C., Bille, E., Day, N., Dauphin, B., Beretti, J. L., Nassif,

- X. (2011). MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clinical Biochemistry*, 44(1), 104–109.
- Carroll, A., & Somerville, C. (2008). Cellulosic Biofuels. *Annual Review of Plant Biology*, 60, 165-182, 60, 165–182.
- Castro, N. Y. P., Macías, J. J. P., & Otalvaro, A. (2010). Hidrólisis enzimática de cascarilla de arroz sometida a pre-tratamientos químicos. Ministerio de agricultura y desarrollo rural. Bogota, Colombia. 22.
- Cedeño, Quijije, & Lozano. (2018). Analysis of the participation of rice producers in family farming in the canton Samborondón - Ecuador. *Espacios*, 39(48).
- Centro Nacional de Información Geográfica (CNIG). (2015). Nomenclátor geográfico de municipios y entidades de población. Gobierno de España, Ministerio de fomento, Instituto geografico nacional. Madrid, España.
- Cerda-Mejía, L., Valenzuela, S. V., Frías, C., Diaz, P., & Pastor, F. I. J. (2017). A bacterial GH6 cellobiohydrolase with a novel modular structure. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(7), 2943–2952.
- Cerda, L. (2016). Enzimas modificadoras de la pared celular vegetal. Celulasas de interés biotecnológico papelerero. (tesis de doctorado) Universidad de Barcelona, España, 196, 21.
- Cohen, S. N., Chang, A. C., & Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 69(8).
- Collins, T., Gerday, C., & Feller, G. (2005). Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(1), 3–23.
- Cooper, B. (2013). Enzimas xilanolíticas bacterianas y sus aplicaciones industriales, 16(1), 19–22.
- Cosgrove, D. J. (2005). Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(11), 850–861.
- Daud, Z., Tun, U., Onn, H., Sari, A., Kassim, M., Tun, U. Onn, H. (2013). Chemical

- Composition and Morphological of Cocoa Pod Husks and Cassava Peels for Pulp and Paper Production. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, (September 2015), 406–411.
- Díaz, C. (2014). Efecto de la proporción de grasa de cerdo, salvado de arroz, carragenina y agua sobre la capacidad de retención de agua, textura instrumental y sensorial y aceptabilidad (tesis de pregrado) Universidad Privada Antenor Orrego. Trujillo, Peru. 88, 4.
- Gallardo, O. (2007). Caracterización de nuevas xilanasas bacterianas. Ingeniería de enzimas con la xilanasas B de *Paenibacillus Barcinonensis* (tesis de doctorado) Barcelona, España 250, 35.
- Instituto Nacional de Preinversión. (2014). Atlas bioenergético de la república del Ecuador. Esin Consultora S.A. 150(1), 21, 33, 45, 51, (87-92).
- Jeong, H., Kim, J., & Lee, J. (2015). Complete genome sequence of *Escherichia coli* strain BL21. *Genome Anno*, 3(2).
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 225, 538–539.
- Loqué, D., Scheller, H. V., & Pauly, M. (2015). Engineering of plant cell walls for enhanced biofuel production. *Current Opinion in Plant Biology*, 25, 151–161.
- Mart, A. N., Fern, C., Grande, H., & Vela, J. B. (2009). Cantón Ambato, (proyección).
- Martins, S. (2017). Inmovilización y estabilización de endoxilanasas de *Trichoderma reesei*. Producción de xilo-oligosacárido por hidrólisis enzimática de xilano. (tesis doctoral) Universidad autónoma de Madrid, España 146, 24.
- McNeil, M. (1984). Structure and function of the primary cell walls of plants. *Annual Review of Biochemistry*, 53(1), 625–663.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428.
- Montoya, M. (2012). Caracterización de una endo-xilanasas producida por *Bacillus flexus* NJY2. (tesis de maestría) Universidad Autónoma de Nuevo León, México. 84, 4.

- Mori, Y., Noda, S., Tanaka, T., Ichinose, H., & Kamiya, N. (2015). Synergistic effect and application of xylanases as accessory enzymes to enhance the hydrolysis of pretreated bagasse. *Enzyme and Microbial Technology* (1), 40.
- Nakano, Y., Yamaguchi, M., Endo, H., Rejab, N. A., & Ohtani, M. (2015). NAC-MYB-based transcriptional regulation of secondary cell wall biosynthesis in land plants. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1–18.
- O'Neill, M. A., & York, W. S. (2003). *The plant cell wall*. (Editado por Rose, J. K.C), Blackwell publishing, Oxford. 1-54
- Papaneophytou, C. P., & Kontopidis, G. (2014). Statistical approaches to maximize recombinant protein expression in *Escherichia coli*: A general review. *Protein Expression and Purification*, 94, 22–32.
- Polo, S. (2016). Mecanismos moleculares de degradación de la pared celular vegetal : estructura y especificidad de xilanasas multidominio (tesis de doctorado) Universidad Complutense de Madrid, España, 204, 43.
- Poutanen, K. (1987). Evaluation of different microbial xylanolytic systems. *Journal of Biotechnology* 6, 49–60.
- Prade, R. A. (1995). Xylanases: from biology to biotechnology, *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 13(1), 101-132
- Sainz, M. (2015). Mecanismos moleculares de degradación de la pared celular vegetal: estructura y especificidad de xilanasas multidominio, (Tesis doctoral) Universidad complutense de Madrid, España, 204.
- Sánchez., Mariela Medina-Jara, S., Díaz, Coronel, T., Ramos-Remache, A., Vera-Chang, J. F., Vásquez, Morán, V., Onofre, Nodari, R. (2015). Potencial sanitario y productivo de 12 clones de cacao en Ecuador. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 38(3), 265–274.
- Sánchez, M., Fritze, D., Blanco, A., Spröer, C., Tindall, B. J., Schumann, P., Pastor, F. (2005). *Paenibacillus barcinonensis* sp. nov., a xylanase-producing bacterium isolated from a rice field in the Ebro River delta. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(2), 935–939.

- Seed, B. (1998). *Patente EE.UU. N° 5726293*. Boston; Oficina de patentes y marcas de EE.UU.
- Showalter, A. M. (1993). Structure and function of plant cell wall proteins. *Plant Cell*, 5(1), 9–23.
- Stoll, V. S., & Blanchard, J. S. (2009). Chapter 6 buffers. Principles and practice 1. *Methods in Enzymology*, 463(C), 43–56.
- Valenzuela, Diaz, & Pastor. (2010). Recombinant Expression of an Alkali Stable GH10 Xylanase from *Paenibacillus barcinonensis*, *J. Agric. Food Chem.* 58, 4814–4818.
- Valenzuela, S. (2012). Proteómica de xilanasas de *Paenibacillus barcinonensis*. Proyecciones biotecnológicas (tesis de doctorado) Universidad de Barcelona, España, 159, 12.
- Valenzuela, S., Diaz, P., & Pastor, F. (2012). Modular glucuronoxylan-specific xylanase with a family CBM35 carbohydrate-binding module. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(11), 3923–3931.
- Valls, A., Diaz, P., Pastor, F. I., & Valenzuela, S. (2016). A newly discovered arabinoxylan-specific arabinofuranohydrolase. Synergistic action with xylanases from different glycosyl hydrolase families. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(4), 1743–1751.
- Valls, Pastor, F. I. J., Vidal, T., Roncero, M. B., Díaz, P., Martínez, J., & Valenzuela, S. V. (2018). Antioxidant activity of xylooligosaccharides produced from glucuronoxylan by Xyn10A and Xyn30D xylanases and eucalyptus autohydrolysates. *Carbohydrate Polymers*, 194, 43–50.
- Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J., & Boerjan, W. (2010). Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiology*, 153(3), 895–905.
- Vargas, J., Alvarado, P., Vega Baudrit, J., & Porras, M. (2013). Caracterización del subproducto cascarilla de arroz en búsqueda de posibles aplicaciones como materia prima en procesos. *Revista Científica*, 23(1), 87–102.
- Vries, V. (2001). *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall

polysaccharides. *Proceedings of the Third International Conference on Science Education Research in the Knowledge Based Society, Vol. 1*, 65(4), 435–437.

Wilkie, Kennet, C. B., & Swee.-Leng, W. (1977). A heteroxylan and hemicellulosic materials from bamboo leaves, and a reconsideration of the general nature of commonly occurring xylans and other hemicelluloses. *Carbohydrate Research*, 57, 145–162.

Wong, K. K., Tan, L. U., & Saddler, J. N. (1988). Multiplicity of beta-1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications. *Microbiological Reviews*, 52(3), 305–317.

York, W. S., Darvill, A. G., McNeil, M., Stevenson, T. T., & Albersheim, P. (1986). Isolation and characterization of plant cell walls and cell wall components. *Methods in Enzymology*, 118(C), 3–40.