

Evaluación del efecto de enzimas lignocelulolíticas de origen fúngico sobre la cáscara de mazorca de cacao en la producción de jarabes fermentables

Yarileny Castellanos Villamizar

Trabajo de Grado para Optar el título de
Magíster en Microbiología

Director

Daniel Ricardo Molina Velasco

Doctor en Química

Codirector

Andrés Mauricio Rueda Rueda

PhD. Biotecnología, PhD Biología

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Salud

Escuela de Microbiología

Maestría en Microbiología

Bucaramanga

2020

Dedicatoria

A mi madre por su amor ilimitado, por llevarme de la mano hasta convertirme en la persona que soy ahora. Gracias a mamá por acompañarme en mis sueños hasta que se convirtieron en proyectos y ahora son toda una realidad.

Agradecimientos

Agradecimiento sincero a mis tutores, a Daniel Molina por la oportunidad, confianza y apoyo durante el desarrollo de este proyecto y agradecimiento especial a mi tutor Andrés Rueda por su paciencia, dedicación y compromiso en cada etapa de este camino. Gracias por guiarme en mi crecimiento profesional, por enseñarme que todo puede ser peor, pero aun así acompañarme hasta el final...

A la profesora Clara Inés Sánchez Suárez por confiar en mí, por darme la oportunidad de llegar al laboratorio 404 hace 7 años, por enseñarme a amar los hongos y mi profesión desde la investigación. A Inés Hernández Celi por traerme de vuelta a la ciencia, gracias por la oportunidad, la confianza y el compromiso. Gracias por enseñarme que todo se puede lograr.

A David Rueda y Lucia Saavedra, mis amigos, por permitirme aprender más de la vida y academia a su lado. Gracias por estar siempre para reír, para correr en círculos y parar llorar. Gracias Lucia por acompañarme y vivir conmigo cada aventura.

A Daniela Gamboa mi mejor amiga, por estar a mi lado, ser la principal promotora de mis sueños, por creer en mis capacidades y alentarme a cumplir mis metas. Contar contigo no tiene precio, eres mi mayor tesoro.

A Eliana Castillo, Mauricio Gil y Katerin Núñez por su aporte al desarrollo de este proyecto y por permitirme hacer parte de su formación profesional.

Al Centro de Estudios e Investigaciones Ambientales (CEIAM), al proyecto de regalías “Desarrollo de procesos y productos para la valorización de mucílago y granos de cacao en el Departamento de Santander BPIN 201600010046 – SGR” y la Universidad Industrial de Santander.

Tabla de Contenido

	Pág.
Introducción	15
1. Hipótesis.....	18
2. Objetivos	18
2.1. Objetivo General	18
2.2. Objetivos Específicos.....	18
3. Marco teórico y estado del arte	19
3.1. Lignocelulosa	19
3.1.1 Celulosa.....	20
3.1.2 Hemicelulosa.....	21
3.1.3 Lignina.	22
3.2. Industria cacaotera	23
3.3. Aprovechamiento de la biomasa lignocelulósica de CPH	23
3.4. Organismos degradadores de material lignocelulósico.....	24
3.5. Hongos división Basidiomycota	25
3.6. Enzimas Ligninocelulolíticas	26
3.6.1 Enzimas celulolíticas.	26
3.6.2 Enzimas hemicelulolíticas	29
3.6.3 Enzimas ligninolíticas.....	29
3.7. Pretratamiento y sacarificación simultáneos de biomasa lignocelulósica.....	34
3.8. Desintoxicación de inhibidores de la hidrólisis y fermentación	35

3.9. Fermentación de hidrolizados lignocelulósicos	36
3.10. Estado del arte.....	40
4. Metodología	41
4.1. Cepas de hongos y condiciones de cultivo.....	41
4.2. Evaluación semicuantitativa capacidad lignocelulolítica en placa de agar.....	42
4.2.1. Selección de hongos con actividad celulolítica	42
4.2.2. Selección de hongos con actividad ligninolítica en placa de agar.....	43
4.3. Evaluación cuantitativa de la actividad lignocelulolítica en SSF	44
4.3.1. Fermentación en sustrato lignocelulósico.....	45
4.3.2. Fermentación en sustrato celulósico.....	46
4.4. Pretratamiento y sacarificación simultáneas de cáscara de mazorca de cacao (SPS) y desintoxicación de jarabes fermentables.....	47
4.4.1. Materia prima.....	47
4.4.2. Efecto del pH, temperatura, concentración de cobre y enzimas lignocelulolíticas el en el SPS y desintoxicación.....	47
4.4.3. Mejoramiento de la producción y desintoxicación de jarabes fermentables por SPS usando CPH como sustrato.....	48
4.4.4. Análisis estadístico.....	49
4.5. Producción y desintoxicación de jarabes fermentables.....	49
4.5.1. Evaluación del efecto de las enzimas ligninolíticas en la producción y desintoxicación de jarabes.....	50
4.6. Obtención de etanol de segunda generación	50
4.6.1. Ceba y preinóculo.....	50

4.6.2. Fermentación de jarabes obtenidos por SPS de CPH.	51
4.6.3. Determinación de las condiciones que favorecen la obtención de etanol.....	51
4.6.4. Evaluación de las condiciones teóricas óptimas de fermentación.	52
4.6.5. Análisis estadístico.....	52
5. Resultados y discusión	53
5.1. Hongos basidiomicetos macromicetos.....	53
5.2. Evaluación semicuantitativa capacidad lignocelulolítica en placa de agar.....	54
5.2.1. Selección de hongos con actividad celulolítica.	54
5.2.2. Selección de hongos con actividad ligninolítica en placa de agar	57
5.3. Evaluación cuantitativa de la actividad lignocelulolítica en SSF	60
5.4. Pretratamiento y sacarificación simultáneas de cáscara de mazorca de cacao (SPS) y desintoxicación de jarabes fermentables.....	65
5.4.1. Materia prima.....	65
5.4.2. Efecto del pH, temperatura, concentración de cobre y enzimas lignocelulolíticas el en el SPS y desintoxicación.	65
5.4.3. Mejoramiento de la producción y desintoxicación de jarabes fermentables.	70
5.5. Producción y desintoxicación de jarabes fermentables.....	76
5.5.1. Evaluación del efecto de las enzimas ligninolíticas en la producción y desintoxicación de jarabes.	77
5.6 Obtención de etanol de segunda generación	79
5.6.1. Fermentación de jarabes obtenidos por SPS de CPH.....	79
5.6.2. Determinación de las condiciones que favorecen la obtención de etanol.....	81
5.6.3. Validación de las condiciones teóricas óptimas de fermentación.	85

6. Conclusiones	88
7. Recomendaciones.....	90
8. Divulgación.....	91
Referencias bibliográficas.....	92
Apéndices.....	110

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. <i>Fuentes de biomasa agrícola lignocelulósica.....</i>	20
Tabla 2. <i>Evaluación de actividad celulolítica en placas de MCMC.....</i>	56
Tabla 3. <i>Evaluación de actividad ligninolítica en placas de MB con ABTS al 0,1% y guayacol al 0,04 %.....</i>	57
Tabla 4. <i>Variables independientes y niveles empleados en el diseño de cribado 2³.....</i>	70
Tabla 5. <i>Variables independientes y niveles empleados en el diseño multifactorial 4².....</i>	72
Tabla 6. <i>Variables independientes y niveles empleados en el diseño multifactorial 3².....</i>	83
Tabla 7. <i>Combinación de las variables independientes pH, temperatura y concentración de enzimas en el diseño de cribado para la obtención de jarabes por SPS de CPH.....</i>	118
Tabla 8. <i>Combinación de las variables independientes pH y temperatura en el diseño multinivel para la obtención de jarabes por SPS de CPH.....</i>	118
Tabla 9. <i>Combinación de las variables independientes en el diseño multinivel 3² para obtención de etanol.....</i>	120

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. <i>Estructura de las microfibrillas presentes en la lignocelulosa.</i>	19
Figura 2. <i>Estructura de la celulosa.</i>	21
Figura 3. <i>Estructura de la hemicelulosa</i>	21
Figura 4. <i>Estructura de la lignina.</i>	22
Figura 5. <i>Reacción de inversión y retención realizada en el ciclo catalítico las celulasas.</i>	27
Figura 6. <i>Representación esquemática de la hidrólisis enzimática de celulosa.</i>	28
Figura 7. <i>Ciclo catalítico lacasa.</i>	30
Figura 8. <i>Ciclo catalítico lignina peroxidasa.</i>	31
Figura 9. <i>Ciclo catalítico manganeso peroxidasa.</i>	32
Figura 10. <i>Ciclo catalizado por lacasa.</i>	34
Figura 11. <i>Principales rutas de formación de inhibidores.</i>	36
Figura 12. <i>Vía metabólica utilizada por K. marxianus para la fermentación de hexosas (glucosa) y pentosas (xilosa y arabinosa).</i>	39
Figura 13. <i>Diagrama de flujo para la obtención de jarabes fermentables y etanol a partir de cáscara de mazorca de cacao.</i>	41
Figura 14. <i>Cepas reactivadas colección biológica LMMA-UIS.</i>	53
Figura 15. <i>Características macroscópicas hongos basidiomicetos macromicetos.</i>	54
Figura 16. <i>Evaluación de actividad celulolítica en placa de agar en medio MCMC.</i>	55
Figura 17. <i>Evaluación de actividad ligninolítica en placa de agar.</i>	59
Figura 18. <i>Actividad lacasa y concentración de proteína total en los extractos enzimáticos.</i>	61
Figura 19. <i>Fermentación SSF por 24 días usando como sustrato celulosa.</i>	63

Figura 20. <i>Efecto del pH, temperatura, concentración de unidades enzimáticas y concentración de cobre CuSO₄ sobre el SPS.</i>	68
Figura 21. <i>Gráfico de Pareto del diseño de experimentos de cribado.</i>	71
Figura 22. <i>Gráfico de Pareto del diseño de experimentos multinivel.</i>	72
Figura 23. <i>Gráficas de superficie de respuesta 3D para el SPS de cáscara de mazorca de cacao y desintoxicación de compuestos fenólicos en jarabes fermentables.</i>	75
Figura 24. <i>Producción y desintoxicación de jarabes obtenidos por SPS de CPH.</i>	77
Figura 25. <i>Producción y desintoxicación de jarabes obtenidos por SPS y sacarificación sin pretratamiento</i>	79
Figura 26. <i>Fermentación alcohólica de jarabes obtenidos por SPS de CPH.</i>	80
Figura 27. <i>Efecto de la agitación y temperatura en la producción de etanol.</i>	82
Figura 28. <i>Gráfica de Pareto y superficie de respuesta de pH y temperatura para producción de etanol por fermentación de jarabes usando la levadura K. marxianus DSM 5418.</i>	84
Figura 29. <i>Fermentación alcohólica de jarabes y medio control a condiciones óptimas calculadas.</i>	87
Figura 30. <i>Prueba de múltiples rangos (Tukey, HSD) para la producción de azúcares.</i>	115
Figura 31. <i>Prueba de múltiples rangos (Tukey, HSD) para la desintoxicación de jarabes.</i>	116
Figura 32 . <i>Producción de azúcares por SPS durante 192 horas.</i>	117
Figura 33. <i>Superficies de respuesta SPS usando enzimas comerciales.</i>	121

Lista de Apéndices

	Pág.
Apéndice A. Cuantificación de actividades enzimáticas lignocelulolíticas.....	110
Apéndice B. Cuantificación de proteína, glucosa, azúcares reductores, compuestos fenólicos y etanol.....	112
Apéndice C. Prueba de múltiples rangos, Tukey para el análisis de varianza de SPS de CPH....	115
Apéndice D. Análisis de varianza para SPS de CMC por 192 horas.....	117
Apéndice E. Combinaciones de las variables independientes en los diseños de experimento.....	118
Apéndice F. Optimización SPS de CMC usando enzimas comerciales.....	121

Lista de símbolos y abreviaturas

ABTS	ácido 2,2'-azino-Bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)]
ANOVA	análisis de varianza
AST	agar extracto de salvado de trigo
ATCC	American Type Culture Collection
CBH	celobiohidrolasa
CPH	cáscara de mazorca de cacao
DNS	ácido 3,5 dinitrosalicílico
DS	desviación estándar
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (Colección alemana de Microorganismos)
EG	endoglucanasa
LiP	lignina Peroxidasa
LMMA-UIS	Cepario del Laboratorio de Microbiología y Mutagénesis Ambiental de la Universidad Industrial de Santander
MB	Medio Base
MCMC	medio Carboximetilcelulosa
MCS	medio estándar Czapek suplementado
MnP	manganeso peroxidasa
RSM	metodología de superficie de respuesta
SPS	pretratamiento y sacarificación simultáneos
SSF	fermentación en estado sólido
UPF	unidades de papel de filtro.

Resumen

Título: Evaluación del efecto de enzimas lignocelulolíticas de origen fúngico sobre la cáscara de mazorca de cacao en la producción de jarabes fermentables.*

Autor: Yarileny Castellanos Villamizar**

Palabras clave: *Dictyopanus pusillus*, enzimas lignocelulolíticas, pretratamiento, sacarificación, cáscara de mazorca de cacao.

Descripción:

El cacao (*Theobroma cacao L*) es uno de los cultivos más importantes procedentes de regiones tropicales, alcanzando una producción de 5,25 mil toneladas/año de granos secos a partir del fruto en 2018. Sin embargo, la cosecha de cacao tiene como consecuencia negativa la acumulación de residuos lignocelulósicos, siendo necesario buscar alternativas para el manejo de la biomasa lignocelulósica generada. El presente estudio utilizó cáscara de mazorca de cacao (CPH) para la producción de jarabes fermentables a través del pretratamiento y sacarificación simultáneas (SPS) utilizando enzimas lignocelulolíticas de origen fúngico. Se utilizaron hongos de la colección LMMA-UIS, los cuales fueron seleccionados por su capacidad enzimática lignocelulolítica en ensayos de agar en placa. Los hongos seleccionados fueron usados para la obtención de extractos enzimáticos por fermentación en estado sólido y medir las actividades enzimáticas ligninolíticas. *Dictyopanus pusillus* LMB4 fue el aislamiento que presentó la mayor actividad ligninolítica y fue seleccionado para el proceso de SPS; permitiendo evaluar el efecto del pretratamiento sobre la eliminación parcial de lignina en la CPH y desintoxicación de jarabes fermentables. Las variables que influyeron en la obtención de jarabes fermentables a partir de CPH fueron pH, temperatura y concentración de unidades enzimáticas lacasas:celulasas obteniendo concentraciones de glucosa de $6,4 \pm 0,33 \text{ g.L}^{-1}$ y de azúcares reductores de $13,12 \pm 0,3 \text{ g.L}^{-1}$, con aumentos del 19,56% y 21,71% respectivamente utilizando SPS en comparación con la sacarificación sin pretratamiento. Adicionalmente se observó una desintoxicación del 40,8%, en los compuestos fenólicos presentes en los jarabes fermentables en la SPS de CPH usando el extracto enzimático de LMB4. Finalmente, se postula el pretratamiento de CPH utilizando extractos enzimáticos con actividad lacasa de *D. pusillus* LMB4, para mejorar el proceso de pretratamiento y sacarificación; aumentar la producción de azúcares y de favorecer la desintoxicación de compuestos fenólicos en los jarabes fermentables obtenidos.

* Trabajo de grado

** Universidad Industrial de Santander, Facultad de salud, Escuela de microbiología. Director: Daniel Ricardo Molina Velasco PhD en Química. Codirector: Andrés Mauricio Rueda Rueda PhD en Biotecnología y PhD en Biología.

Abstract

Title: Evaluation of the effect of lignocellulolytic enzymes of fungal origin on the cocoa pod husk in the production of fermentable syrups. *

Author: Yarileny Castellanos Villamizar**

Keywords: *Dictyopanus pusillus*, ligninolytic enzymes, pretreatment, saccharification, cocoa pod husk.

Description:

Cocoa (*Theobroma cacao* L) is one of the most important crops from tropical regions, reaching a production of 5.25 thousand tons / year of dry beans from the fruit for the year 2018. However, the cocoa harvest has as a negative consequence, the accumulation of lignocellulosic waste, being necessary to look for alternatives for the management of the generated lignocellulosic biomass. The present study used cocoa pod husk (CPH) for the production of fermentable syrups through simultaneous pretreatment and saccharification (SPS) using lignocellulolytic enzymes of fungal origin. Mushrooms from the LMMA-UIS collection were used, which were selected for their lignocellulolytic enzyme capacity in plate agar assays. The selected fungi were used to obtain enzyme extracts by solid state fermentation and to measure ligninolytic enzyme activities. *Dictyopanus pusillus* LMB4 was the isolate that presented the highest ligninolytic activity and was selected for the SPS process; allowing to evaluate the effect of pretreatment on the partial elimination of lignin in the CPH and detoxification of fermentable syrups. The variables that influenced the obtaining of fermentable syrups from CPH were pH, temperature and concentration of enzymatic units laccase: cellulases, obtaining glucose concentrations of 6.4 ± 0.33 gL⁻¹ and reducing sugars of 13.12 ± 0.3 gL⁻¹, with increases of 19.56% and 21.71% respectively using SPS compared to saccharification without pretreatment. Additionally, a detoxification of 40.8% was observed in the phenolic compounds present in the fermentable syrups in the CPH SPS using the LMB4 enzyme extract. Finally, the pretreatment of CPH is postulated using enzymatic extracts with laccase activity of *D. pusillus* LMB4, to improve the pretreatment and saccharification process; increase the production of glucose and reducing sugars and promote the detoxification process of phenolic compounds in the fermentable syrups obtained.

* Graduation project

** Universidad Industrial de Santander, Facultad de salud, Escuela de microbiología. Director: Daniel Ricardo Molina Velasco PhD en Química. Codirector: Andrés Mauricio Rueda Rueda PhD en Biotecnología y PhD en Biología.

Introducción

La producción mundial de granos de cacao (*Theobroma cacao* L.) fue estimada en 5,25 millones de toneladas para el año 2018 (FAO, 2020). En el mundo, entre los mayores productores de granos de cacao se encuentra Costa de Marfil (37.4 %) y Ghana (18 %); Colombia ocupa el décimo lugar con un 1% de la producción (FAO, 2020). El fruto del cacao está compuesto principalmente por los granos y la cáscara de mazorca (CPH), representando en promedio un 22% y 72% del peso total del fruto de cacao, respectivamente (Campos, Nieto, & Oomah, 2018). La CPH es el principal subproducto lignocelulósico de la industria cacaotera, alcanzando 10 toneladas de CPH por cada tonelada de grano de cacao generada. La CPH está compuesta principalmente por lignocelulosa (lignina 38.8%, celulosa 35.3% y hemicelulosa 6.0%), biomasa residual empleada para la fabricación de papel, carbón activado, piensos animales y etanol de segunda generación. (F. Lu et al., 2018; Okiyama, Navarro, & Rodrigues, 2017).

El proceso para el aprovechamiento y conversión de la biomasa lignocelulósica a etanol se desarrolla en tres etapas: i) pretratamiento, remoción de la lignina para la liberación de la celulosa y hemicelulosa; ii) sacarificación, hidrólisis de la celulosa y hemicelulosa, para la liberación de azúcares fermentables; y iii) fermentación de los azúcares fermentables por bacterias o levaduras para la producción final de etanol (Campos et al., 2018). El pretratamiento es la etapa de mayor relevancia en la producción de etanol de segunda generación, especialmente en biomasa con un alto porcentaje de lignina como es el caso de la CPH (Masran et al., 2016). Un eficiente pretratamiento debe favorecer la obtención de celulosa y hemicelulosa, disminuir la cristalinidad de los polisacáridos obtenidos y la formación de inhibidores para las etapas de hidrólisis y fermentación (Kumari & Singh, 2018). Los procesos de pretratamiento y sacarificación simultáneos son considerados como alternativa promisoría para la conversión de lignocelulosa. El

desarrollo en un solo paso para las dos etapas (pretratamiento y sacarificación) permite una disminución en los tiempos de procesamiento, con altos rendimientos y reducción en los costos de producción durante la obtención de azúcares fermentables a partir de lignocelulosa (Sudha et al., 2015).

Las metodologías más usadas de pretratamiento e hidrólisis de la lignocelulosa, están basadas en procesos físicos que requieren equipos de alto consumo de energía y químicos con soluciones químicas de pH ácidos y/o básicos, generando contaminantes para el medio ambiente. Adicionalmente las metodologías fisicoquímicas para el pretratamiento de la lignocelulosa, favorecen la formación de inhibidores para la hidrólisis y la fermentación (Jönsson, Alriksson, & Nilvebrant, 2013). Una alternativa eficiente y ecológica para el pretratamiento de la lignocelulosa, es el uso de herramientas biotecnológicas como los son microorganismos y/o sus enzimas, herramientas que necesitan un menor consumo de energía, disminuyen la formación de inhibidores y no realizan descarga de efluentes tóxicos (Sherpa, Ghangrekar, & Banerjee, 2018); sin embargo se debe tener en cuenta que su implementación incluye un mayor costo y tiempo de incubación (Masran et al., 2016).

La degradación de biomasa lignocelulósica en ambientes naturales es un proceso que involucra bacterias y hongos que usan como fuente de energía los compuestos orgánicos presentes en el material lignocelulósico en descomposición (Behera, Sethi, Mishra, Dutta, & Thatoi, 2017). Los organismos más estudiados en la degradación de lignocelulosa son principalmente hongos pertenecientes a las divisiones Ascomycota y Basidiomycota (Janusz et al., 2017). Siendo los hongos de la podredumbre blanca de la división Basidiomycota, los organismos que evolutivamente han especializado su metabolismo para la degradación eficiente de la lignina y el aprovechamiento de la celulosa y hemicelulosa como fuente principal de carbono, a través de

enzimas oxidoreductasas e hidrolasas, respectivamente (Peralta, Polacchine, Carvalho, Côrrea, & Kato, 2017).

Las enzimas oxidoreductasas (catalasas y peroxidasas) como lacasas (Lac, EC 1.10.3.2), lignina peroxidasa (LiP, EC 1.11.1.14) y manganeso peroxidasa (MnP, EC 1.11.1.13) catalizan la oxidación de unidades fenólicas y no fenólicas de la lignina, en el proceso de descomposición y reciclaje de la lignocelulosa en la naturaleza. La degradación de celulosa y hemicelulosa a hexosas y pentosas requiere la acción de diferentes enzimas hidrolíticas: endo-1,4- β -glucanasas (EC.3.2.1.4), glucanohidrolasas (EC 3.2.1.74), celobiohidrolasas (CBH, EC 3.2.1.91), β -glucosidasas (EC.3.2.1.21) y endo - β -1,4-xilanasas (EC 3.2.1.8) y β -xilidasas (EC 3.2.1.37) (Behera et al., 2017; Gutiérrez, Moreno, & Montoya, 2018; Peralta et al., 2017; Sánchez, 2009).

Basados en las ventajas que poseen las maquinarias enzimáticas de los hongos basidiomicetos para la degradación de material lignocelulósico sobre la producción y desintoxicación de jarabes fermentables, el objetivo del presente estudio fue implementar extractos enzimáticos ligninolíticos de hongos basidiomicetos de la colección biológica LMMA-UIS como herramienta biotecnológica y eficiente para el pretratamiento y sacarificación de CPH tipo CCN-51. Se evaluaron diferentes variables del proceso, como, pH, temperatura, concentración de unidades enzimáticas, concentración de cobre y tiempo de incubación mediante análisis de varianza, diseños de experimentos. Obteniendo superficies de respuesta (RSM) que permitieron establecer la máxima producción de glucosa y azúcares reductores en simultaneidad con la desintoxicación de los jarabes fermentables.

El presente trabajo se desarrolló bajo el marco del proyecto de regalías “Desarrollo de procesos y productos para la valorización de mucílago y granos de cacao en el Departamento de Santander” (BPIN 201600010046), cuyo objetivo general es fortalecer la cadena productiva del cacao en el

departamento de Santander mediante el aprovechamiento integral del fruto de cacao, dando un valor agregado a las cadenas productivas.

1. Hipótesis

Es viable la producción de jarabes fermentables a partir de cáscara de mazorca de cacao utilizando enzimas lignocelulolíticas obtenidas de hongos Basidiomicetos.

2. Objetivos

2.1. Objetivo General

Evaluar extractos enzimáticos fúngicos con actividad lignocelulolítica en el pretratamiento y sacarificación de cáscara de mazorca de cacao para la producción de jarabes fermentables.

2.2. Objetivos Específicos

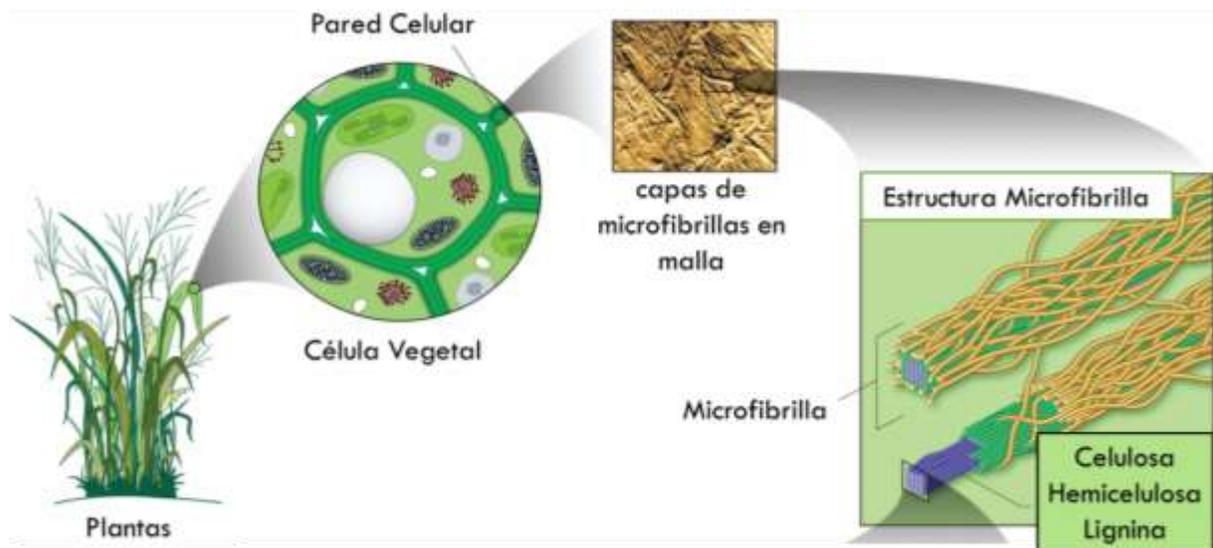
- Seleccionar cepas de hongos Basidiomicetos con capacidad enzimática lignocelulolítica.
- Determinar las actividades enzimáticas celulolíticas y lignolíticas en extractos de hongos Basidiomicetos.
- Obtener jarabes fermentables a partir de cáscara de mazorca de cacao usando extractos enzimáticos de hongos Basidiomicetos

3. Marco teórico y estado del arte

3.1. Lignocelulosa

La lignocelulosa es el compuesto orgánico más abundante en la tierra, siendo el componente principal de la pared celular de las plantas (Baldrian & Valášková, 2008). La pared celular de las plantas está constituida por capas de microfibrillas en malla. Cada microfibrilla es de aproximadamente 10 a 20 nm de diámetro y puede consistir en hasta 40 cadenas de celulosa, rodeada de hemicelulosa y lignina, además de otros materiales como proteínas, pectinas y cenizas (extractivos orgánicos y minerales inorgánicos) **Figura 1** (Kumari & Singh, 2018; Robak & Balcerek, 2018). En el mundo las principales fuentes de lignocelulosa son la madera, residuos sólidos urbanos y la agroindustria. La biomasa agrícola es una categoría de biomasa que incluye las fracciones de cultivos basadas en alimentos (maíz, caña de azúcar, remolacha, frutas, etc.) y fracciones no basadas en alimentos (hojas, tallos, mazorcas de maíz, poda de huerta, paja de arroz, cascarilla de arroz, cáscara de cacao, etc.) **Tabla 1**. (Zabed, Sahu, Suely, Boyce, & Faruq, 2017).

Figura 1. Estructura de las microfibrillas presentes en la lignocelulosa.



Nota: Adaptado de (U.S Department of energy Office of Science, 2005).

Tabla 1. Fuentes de biomasa agrícola lignocelulósica.

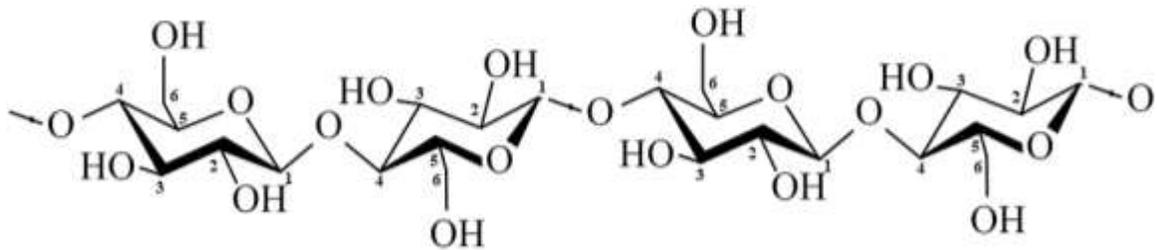
Biomasa lignocelulósica	% celulosa	% hemicelulosa	% lignina
Cáscaras de nuez	25-30	25-30	30-40
Cáscara de arroz	25-35	18-21	26-31
Bagazo de caña de azúcar	42-48	19-25	20-42
Paja de arroz	28-36	23-28	12-14
Paja de trigo	33-38	26-32	17-19
Tallo de maíz	39-47	26-31	3-5
Maderas duras	40-50	24-40	18-30
Cáscara de mazorca de cacao	20-26	9-13	14-28

Nota: Adaptado de (Zabed et al., 2017)

3.1.1 Celulosa

Es un homopolímero lineal compuesto por unidades repetitivas de D -glucosa unidos por enlaces β -1,4-glucosídicos que forman cadenas poliméricas lineales entre 500-14000 unidades de glucosa (Baldrian & Valášková, 2008; Kumari & Singh, 2018). La celulosa contiene regiones cristalinas y amorfas donde las cadenas individuales están unidas entre sí por enlaces de hidrógeno y fuerzas de *van der Waals*. En las regiones cristalinas las cadenas individuales están altamente empaquetadas; contrario a las regiones amorfas, donde las cadenas individuales poseen un menor grado de empaquetamiento y afinidad entre sus enlaces (Sánchez, 2009). Las moléculas de glucosa están orientadas con una rotación de 180° entre cada molécula permitiendo la formación del enlace β -1,4-glucósido entre el carbono 1 (C1) de la primera glucosa, extremo no reductor y el carbono 4 (C4) de la segunda glucosa, extremo reductor de la glucosa. (Houfani, Anders, Spiess, Baldrian, & Benallaoua, 2020) **Figura 2.**

Figura 2. Estructura de la celulosa.

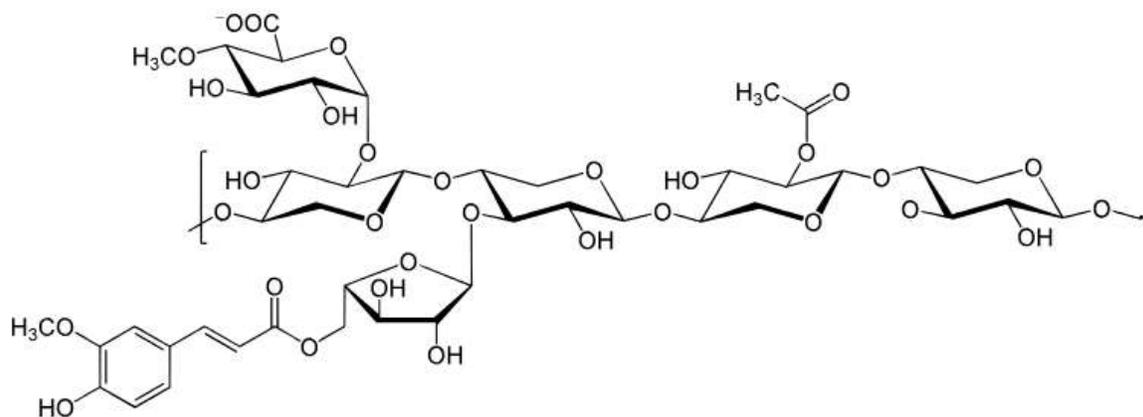


Nota: Adaptado de Kumari & Singh, 2018

3.1.2 Hemicelulosa

Las hemicelulosas son un grupo heterogéneo de polisacáridos ramificados, que incluyen xiloglucanos, xilanos, mananos, glucomananos, y glucanos. La estructura y abundancia de las hemicelulosas varían entre las diferentes especie y tipos celulares de las plantas (Scheller & Ulvskov, 2010). Los monosacáridos que constituyen la hemicelulosa son D-xilosa, L-arabinosa, D-glucosa, D-galactosa y D-manosa y ácidos orgánicos como el ácido acético y ácido glucurónico. Los azúcares están unidos entre sí por enlaces β -1,4-glicosídicos y β -1,3-glicosídicos que forman cadenas ramificadas con 50-300 unidades de azúcar aproximadamente **Figura 3** (Kumari & Singh, 2018). La hemicelulosa también está estrechamente unida a la celulosa a través de enlaces de hidrógeno y a la lignina por los ésteres aromáticos, formando así el enlace entre la celulosa y la lignina (Houfani et al., 2020)

Figura 3. Estructura de la hemicelulosa

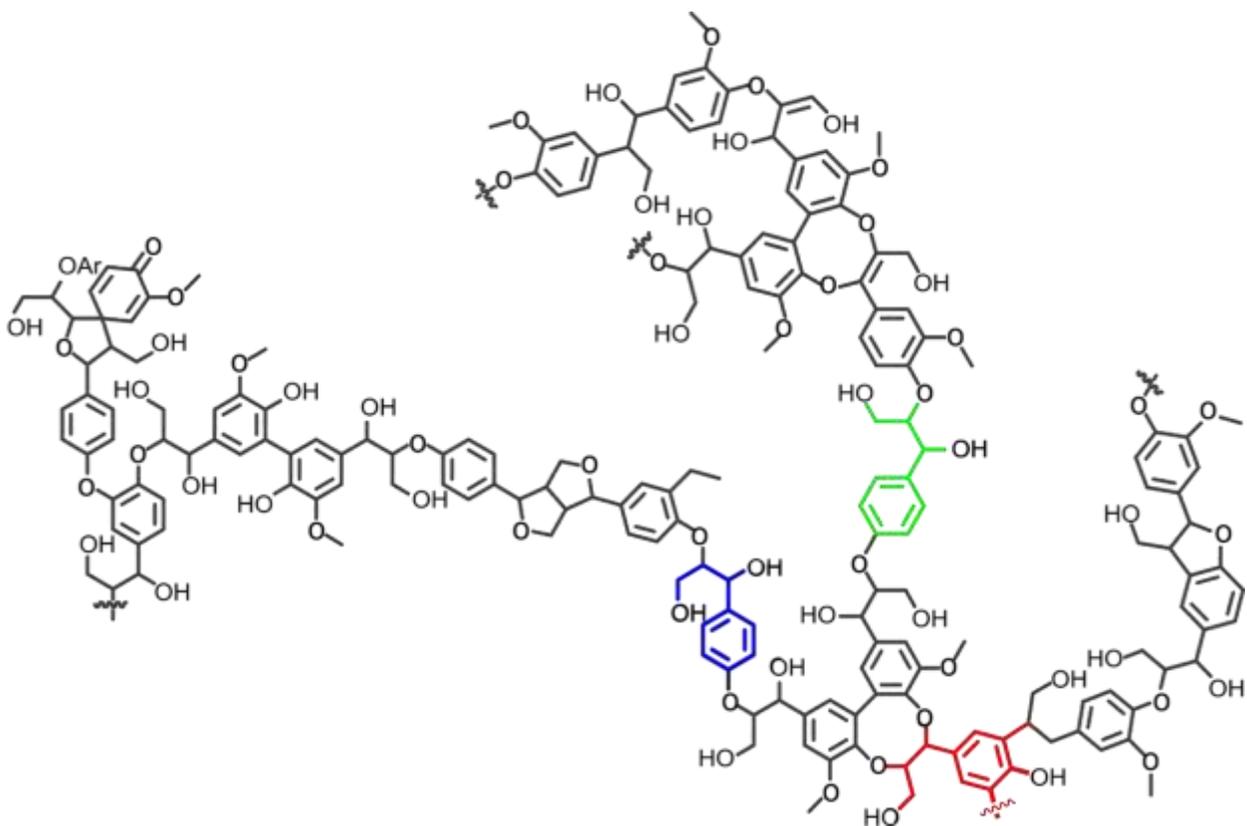


Nota: Adaptado de Kumari & Singh, 2018.

3.1.3 Lignina

Es la fuente renovable de polímeros aromáticos más abundante en la tierra y su degradación es importante para el reciclaje de carbono (Pollegioni, Tonin, & Rosini, 2015). La lignina es un polímero aromático heterogéneo formado principalmente por los compuestos fenólicos *p*-cumaril alcohol (azul), coniferil alcohol (verde) y sinapil alcohol (rojo) y no fenólicos **Figura 4** (Robak & Balcerek, 2018; Wong, 2009). Los alcoholes están unidos por enlaces C-C y C-O-C entre carbonos de dos anillos de benceno o de un radical fenólico y un anillo de benceno (Pollegioni et al., 2015). La lignina está asociada con la hemicelulosa y la celulosa mediante enlaces covalentes, éster e hidrógeno (Houfani et al., 2020)

Figura 4. Estructura de la lignina.



Nota: La lignina está formada por compuestos fenólicos *p*-cumaril alcohol (azul), coniferil alcohol (verde) y sinapil alcohol (rojo) y no fenólicos. Adaptado de Pollegioni, Tonin, & Rosini, 2015.

3.2. Industria cacaotera

El cacao (*Theobroma cacao*) es uno de los cultivos más importantes procedentes de regiones tropicales (Acosta, Vrieze, Sandoval, Sinche, & Wierinck, 2018), a nivel mundial se generan aproximadamente 5,25 millones de toneladas/año de semillas secas a partir del aprovechamiento de fruto (FAO, 2020), generando como subproductos: cáscara de la vaina de cacao (10 toneladas por tonelada de semillas), mucílago de cacao (50 L por tonelada de semilla fresca) y cascarilla de cacao en grano (12% de semilla seca) (Balladares, Chóez, García, Sosa, & Pérez, 2016; Mansur, Tago, Masuda, & Abimanyu, 2014). La cáscara de mazorca de cacao (CPH), principal subproducto (aprox. 70–75% en peso del fruto) de la cosecha de cacao, está compuesta principalmente por fibras de celulosa 9,7–26,1%, hemicelulosa 8,7–12,8%, lignina 14–28% y pectina 6–12,6%, además de minerales, antioxidantes, proteínas y grasas. La CPH se compone de tres capas con diferentes proporciones de fibra: epicarpio, mesocarpio y endocarpio (Campos et al., 2018). Actualmente para aprovechar la CPH se ha implementado su uso en la fabricación de papel, jabón, carbón activado, piensos animales y biocombustibles (F. Lu et al., 2018; Okiyama et al., 2017). La producción de biocombustibles a partir de CPH es una alternativa para el manejo de este residuo, ya que permite la generación de energía dando un valor agregado a la cadena de producción de cacao (Campos et al., 2018).

3.3. Aprovechamiento de la biomasa lignocelulósica de CPH

La producción de jarabes fermentables a partir de la biomasa lignocelulósica del cacao y posterior conversión en biocombustibles requiere de varias etapas, entre ellos el pretratamiento para remover la lignina, sacarificación para hidrolizar la celulosa y hemicelulosa, fermentación de azúcares por microorganismos, separación y purificación del etanol obtenido (F. Lu et al., 2018; Sánchez, 2009). El pretratamiento permite mejorar la accesibilidad a la celulosa y la hemicelulosa

para que en el proceso de sacarificación se generen azúcares simples. El pretratamiento es un paso clave para la sacarificación hidrólisis de polímeros, ya que permite despolimerizar la lignina y disminuir la cristalinidad de la celulosa y hemicelulosa (Kumari & Singh, 2018). Los mecanismos de pretratamiento e hidrólisis más usados están basados en procesos físicos y químicos. Entre los tratamientos físicos se incluyen: mecánico (disminución de tamaño de partícula), irradiación de microondas, irradiación con ultrasonido de baja frecuencia, explosión de vapor y con agua caliente (V. Kumar, Duc, Dharmaraja, & Shobana, 2018) y entre los pretratamientos químicos se incluyen: ácidos fuertes (HCl, H₂SO₄ y HNO₃), bases (NaOH, KOH, Ca(OH)₂ y amoníaco), solventes orgánicos (benceno, éter, ciclohexano, hexano, etanol y metanol) y oxidativo (H₂O₂ y O₃) (Chen et al., 2017; V. Kumar et al., 2018; Kumari & Singh, 2018). Todos estos pretratamientos son efectivos, pero los requisitos de los equipos son específicos, generan contaminación y formación de inhibidores de la fermentación, además de un alto consumo de energía. Por el contrario, el método biológico que puede ser realizado por una variedad de organismos, a través de su maquinaria enzimática, degradando la lignina, a la vez que se hidroliza la celulosa y hemicelulosa, proceso que requiere un menor consumo de energía, disminuye la generación de contaminantes del ambiente e inhibidores de la fermentación, sin embargo, su uso en procesos industriales es de alto costo, debido al precio actual de las enzimas y el tiempo necesario para el pretratamiento (Chen et al., 2017).

3.4. Organismos degradadores de material lignocelulósico

La degradación de la biomasa lignocelulósica ocurre en ambientes naturales y es un proceso que involucra organismos saprófitos que incluyen bacterias y hongos (Behera et al., 2017). Dentro de las bacterias se encuentran los géneros: *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Thermomonospora*, *Ruminococcus*, *Bacteriodes*, *Erwinia*, *Acetovibrio*, *Microbispora*, y

Streptomyces (Howard, Abotsi, Jansen Van Rensburg, & Howard, 2003; Sun & Cheng, 2002), sin embargo los organismos predominantes en la degradación de lignocelulosa son los hongos pertenecientes a la división Ascomycota (entre ellos *Trichoderma* spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp.) y Basidiomycota (entre ellos *Phanerochaete* spp., *Pleurotus* spp., *Trametes* spp., *Pycnoporus* spp.) (Sánchez, 2009; Yoon, Ang, Ngho, Seak, & Chua, 2014) ya que desempeñan un papel esencial en el ciclo del carbono como descomponedores de la materia orgánica. Basados en la morfología de descomposición de la madera, los hongos capaces de degradar lignocelulosa se dividen en tres grupos principales: i.) hongos de la podredumbre marrón (modifican la lignina y degradan celulosa y hemicelulosa); ii) hongos de la podredumbre blanca (degradan la lignina, celulosa y hemicelulosa) realizadas principalmente por basidiomicetos y iii.) hongos de la podredumbre blanda (degradan celulosa) provocada principalmente por ascomicetos (Peralta et al., 2017).

3.5. Hongos división Basidiomycota

Los hongos basidiomicetos contienen aproximadamente 32000 especies (Bronz, 2014) que pertenecen a tres subfilos: *Agaricomycotina*, *Puccinimycotina* y *Ustilagimycotina*, el primero contiene aproximadamente el 70% de los basidiomicetos conocidos, en este se encuentra el orden de los Agaricales del cual hacen parte los hongos de la podredumbre blanca y marrón, que poseen mecanismos enzimáticos y no enzimáticos que intervienen en el proceso de degradación de la lignocelulosa (Taylor, Krings, & Taylor, 2015). Los hongos de la podredumbre marrón tienen mecanismos enzimáticos para hidrolizar la celulosa y hemicelulosa y para modificar la lignina por reacciones de desmetilación, sus especies más conocidas son *Gloeophyllum trabeum*, *Serpula lacrymans*, *Coniophora puteana*, *Schizophyllum commune*, *Postia placenta* y *Fomes paraferius*. Los hongos de la podredumbre blanca poseen enzimas hidrolasas y oxidorreductasas capaces de

hidrolizar la celulosa/hemicelulosa y degradar completamente la lignina, sus especies más conocidas son *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Pycnoporus sanguineus*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus pulmonarius*, *Phellinus igniarius* y *Ganoderma lucidum* (Peralta et al., 2017).

3.6. Enzimas Ligninocelulolíticas

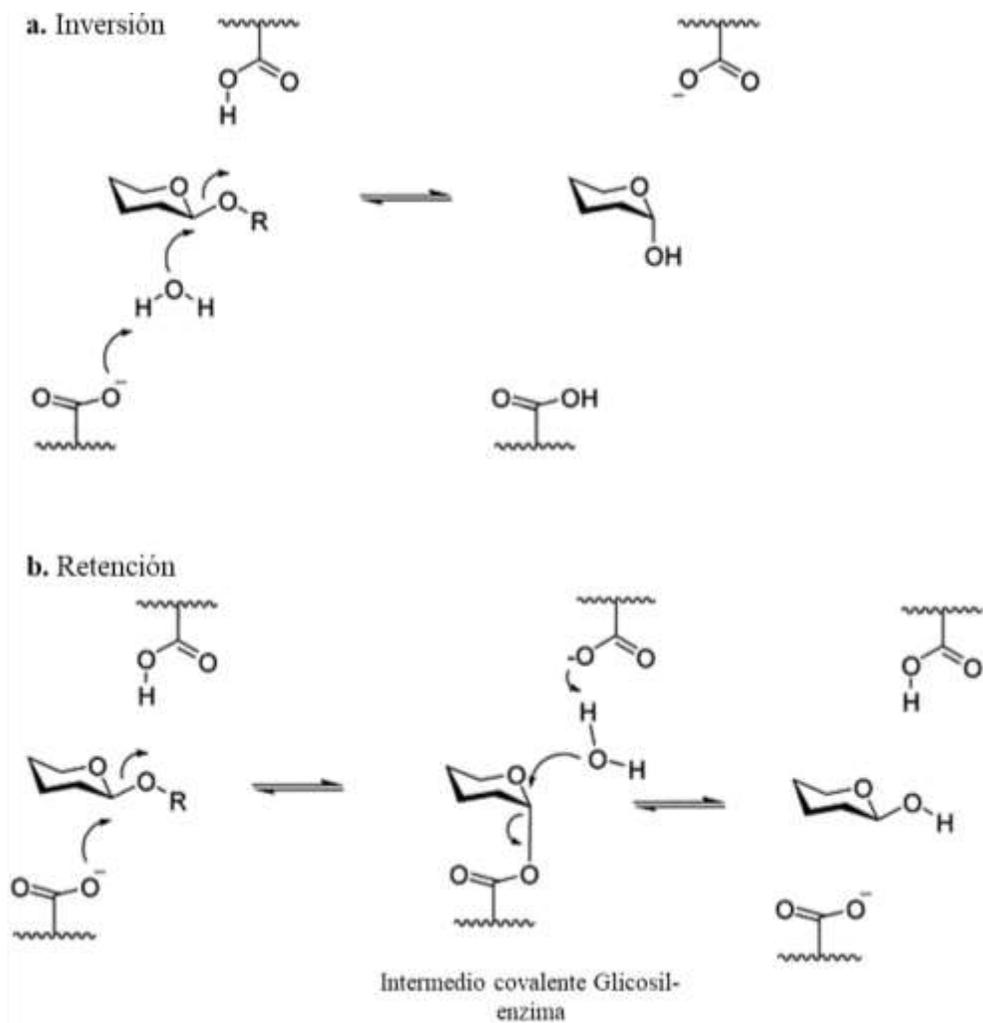
3.6.1 Enzimas celulolíticas

Las celulasas fúngicas contienen en su estructura un dominio catalítico (CD) y un dominio de unión a celulosa (CBD). El CD está conectado al CBD por medio de un enlazador interdominios o péptido conector el cual consiste en una secuencia bisagra altamente glicosilada, su presencia protege a las celulasas del ataque proteolítico (Juturu & Wu, 2014; Rabinovich, Melnick, & Bolobova, 2002). El CBD se ancla al sustrato de celulosa permitiendo que el CD realice su función catalítica (Juturu & Wu, 2014). Las celulasas hidrolizan los enlaces glicosídicos del sustrato usando catálisis ácido-base específica. La distancia entre los dos residuos carboxílicos presentes en el centro activo de la enzima, determina el mecanismo de catálisis empleado por las enzimas celulolíticas, si la distancia es de alrededor de 7–13 Å, se usa el mecanismo de inversión y si es de 5-6 Å, las celulasas emplean el mecanismo de retención (Schülein, 2000).

El mecanismo de inversión es una reacción simple de desplazamiento único, en el que el residuo enzimático ácido reacciona con el oxígeno del enlace β -1,4, y el residuo enzimático básico con una molécula de agua, rompiendo el enlace β -1,4 del sustrato **Figura 5a** (Davies & Henrissat, 1995). El mecanismo de retención consiste en un desplazamiento doble: en el primer paso, el residuo enzimático forma un intermediario covalente con el sustrato, el otro residuo enzimático funciona como un ácido, reaccionando con el oxígeno del enlace β -1,4; en el segundo paso, el ahora desprotonado carboxilato ácido se une a la molécula de agua para hidrolizar la enzima

intermediaria, generando el producto hidrolizado, volviendo la enzima a su estado catalítico inicial **Figura 5b** (Schülein, 2000). Dado a que el mecanismo catalítico depende de la ubicación de los residuos carboxílicos presentes en el centro activo de la enzima, el mecanismo de catálisis entre celulasas depende de las similitudes de secuencia de aminoácidos (Schülein, 2000).

Figura 5. Reacción de inversión y retención realizada en el ciclo catalítico las celulasas.

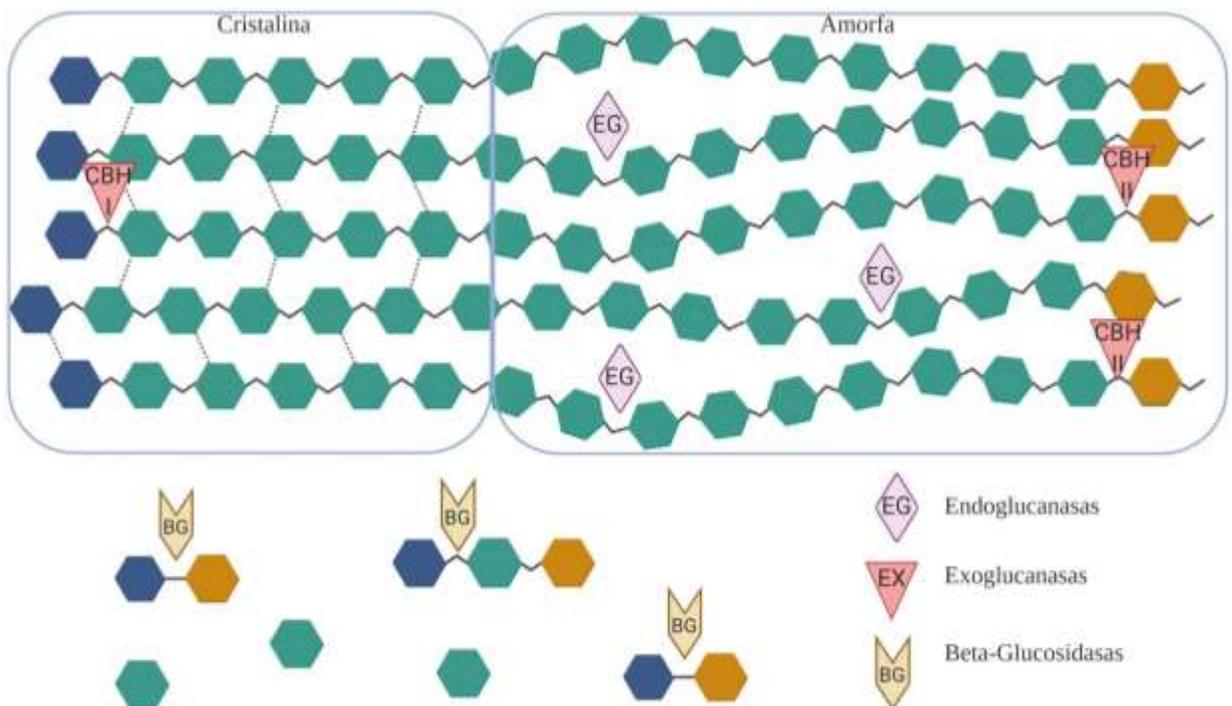


Nota: Tomado de Schülein, 2000.

Para la degradación de celulosa a glucosa se requiere de la acción cooperativa de diferentes enzimas hidrolíticas (Peralta et al., 2017): i) endoglucanasas o 1,4- β -D-glucano-4-glucanohidrolasas (EC.3.2.1.4); ii) exoglucanasas, que incluyen glucanohidrolasas o 1,4- β -D-

glucano-glucanohidrolasas (EC 3.2.1.74) y celobiohidrolasas (CBH I y II) o 1,4-β-D-glucano-celobiohidrolasas (EC 3.2.1.91 y EC 3.2.1.176), y iii) β-glucosidasas o β -glucosidasa hidrolasas (EC.3.2.1.21) (Gutiérrez, Moreno, & Montoya, 2018; Peralta et al., 2017; Sánchez, 2009). Las endoglucanasas cortan al azar enlaces β -1,4- glicosídicos en el interior de la celulosa amorfa, generando oligosacáridos de varias longitudes y en consecuencia nuevos extremos no reductores y reductores en la cadena. Las exoglucanasas actúan de una manera progresiva en los extremos no reductores (CBH II y glucanohidrolasas) y reductores (CBH I) de las cadenas del polisacárido, liberando glucosa (glucanohidrolasas) o celobiosa (celobiohidrolasas). Las betaglucosidasas hidrolizan las celodextrinas solubles y la celobiosa a glucosa (Behera et al., 2017; Gutiérrez et al., 2018; Sánchez, 2009), (Panchapakesan & Shankar, 2016) **Figura 6.**

Figura 6. Representación esquemática de la hidrólisis enzimática de celulosa.



Nota: Glucosa (verde) con extremos no reductores (Azul) y reductores (naranja). Adaptado de Behera et al., 2017

3.6.2 *Enzimas hemicelulolíticas*

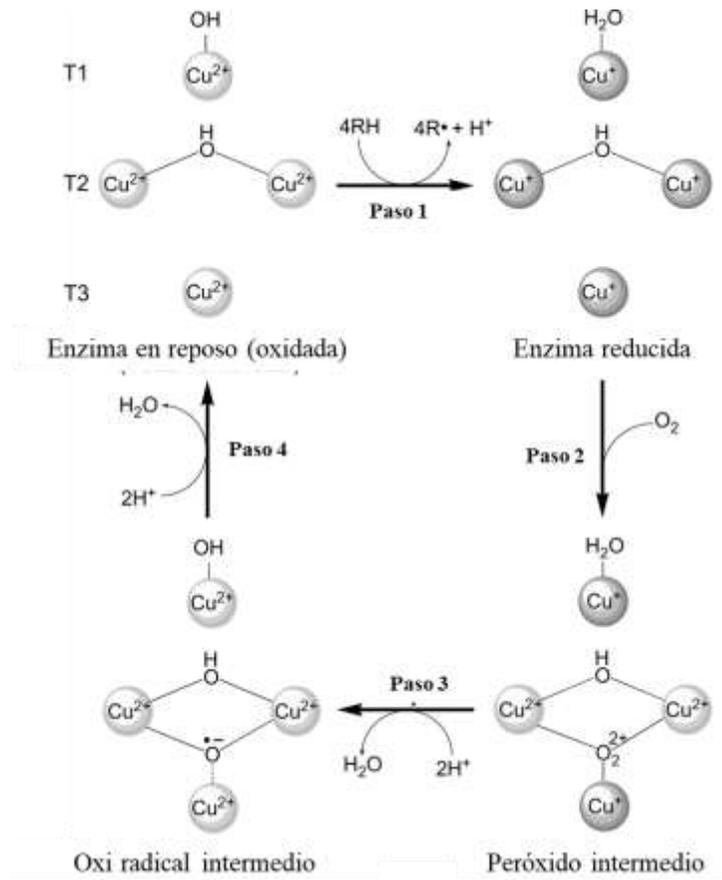
La hidrólisis de hemicelulosa involucra diferentes enzimas cuya acción en conjunto logra hidrolizar enlaces glucosídicos, enlaces éster y eliminar cadenas sustituyentes o laterales (Peralta et al., 2017). Las enzimas incluidas en este grupo se clasifican frecuentemente según su acción sobre distintos sustratos: endo-1,4 β - xilanasas (EC 3.2.1.8), β - xilosidasas (EC 3.2.1.37), β - mananasa (EC3.2.1.78), β - manosidasas, (EC 3.2.1.25), α -glucuronidasas (EC 3.2.1.1), α -L-arabinofuranosidasas (EC 3.2.1.55), acetilxilanasas esterasas (EC 3.1.1.72), esterasas del ácido p-cumárico y ferúlico (EC 3.1.1.1), y esterasas de feruloilo (EC3.1.1.73). Estas enzimas generan azúcares monoméricos (xilosas, arabinosas y glucosas) y ácidos débiles (acético, levulínico y fórmico). (Peralta et al., 2017; Sánchez, 2009)

3.6.3 *Enzimas ligninolíticas*

3.6.3.1 Lacasas. (Lcc, EC 1.10.3.2) Es una enzima extracelular que contiene tres dominios consecutivos y cuatro átomos de cobre en el sitio activo, su estructura es estable debido a que posee dos puentes disulfuro localizados entre los dominios I y II, y los dominios I y III. Los dominios I y II poseen un átomo de cobre y el dominio III posee dos átomos de cobre (Kumar & Chandra, 2020). El mecanismo de catálisis ocurre en cuatro pasos: i) En el dominio I, T1 se reduce de Cu^{2+} a Cu^+ por acción del sustrato reductor, el electrón extraído del sustrato reductor se transfiere al sitio trinuclear formado por los átomos T2/T3, lo que resulta en la conversión de la forma de reposo (completamente oxidada) de la enzima a un estado completamente reducido; ii) La molécula de dióxigeno se une a los átomos T2 / T3, y dos electrones son transferidos rápidamente de los cobres del T3, lo que resulta en la formación de un peróxido intermedio; iii) El peróxido intermedio se descompone en un radical oxigenado y sufre una escisión reductora del enlace O - O con la

liberación de una molécula de agua; y iv) Finalmente la enzima vuelve a su forma de reposo **Figura 7** (Pollegioni et al., 2015; Wong, 2009).

Figura 7. *Ciclo catalítico lacasa.*

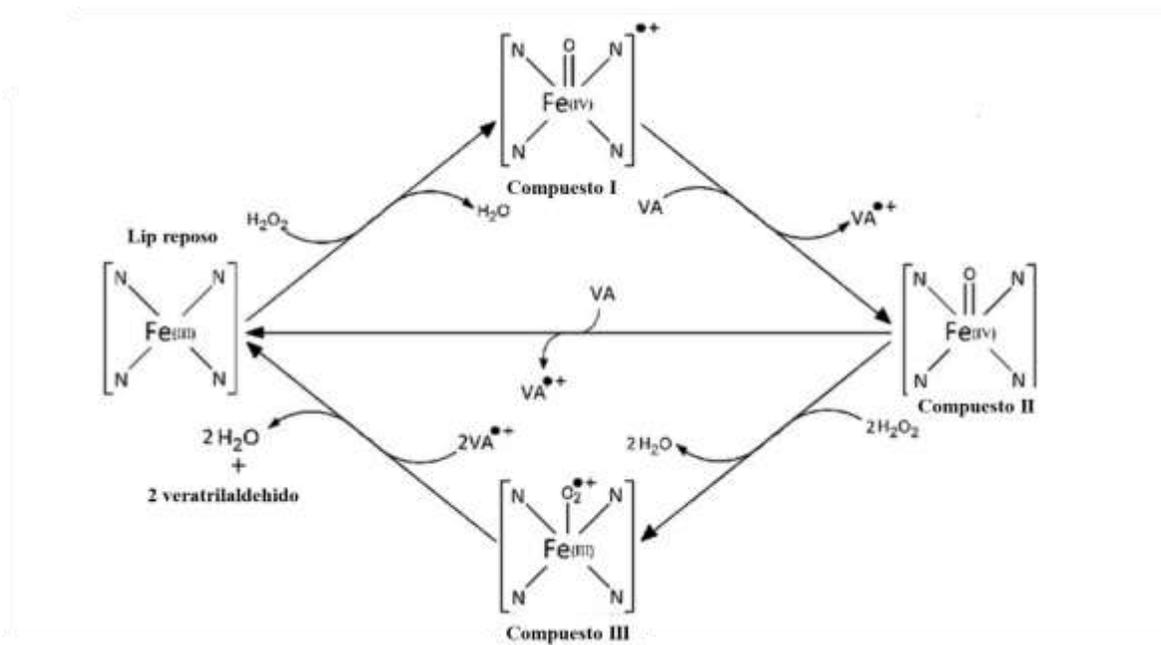


Nota: Tomado de Pollegioni *et al.*, 2015.

3.6.3.2 Lignina peroxidasa. (LiP, EC 1.11.1.14) Está compuesta por dos dominios (proximal y distal) unidos por un grupo hemo que conectan la proteína por puentes de hidrógeno (Kumar & Chandra, 2020). El mecanismo de catálisis ocurre en tres pasos: i) El hierro se oxida y pasa de Fe^{3+} a Fe^{4+} por acción del peróxido de hidrógeno, formando el compuesto I; ii) El compuesto I se reduce por acción de un sustrato no fenólico donador de electrones, formando el compuesto II; y iii) finalmente una segunda reducción del compuesto II devuelve la LiP al estado

de oxidación férrica finalizando el ciclo catalítico. **Figura 8.** El compuesto II en presencia de un exceso de H_2O_2 y la ausencia de un sustrato reductor, puede producir una forma catalíticamente inactiva de la enzima, conocida como compuesto III y finalmente el compuesto III por autooxidación espontánea vuelve a LiP al estado de oxidación férrica (Pollegioni et al., 2015).

Figura 8. Ciclo catalítico lignina peroxidasa.

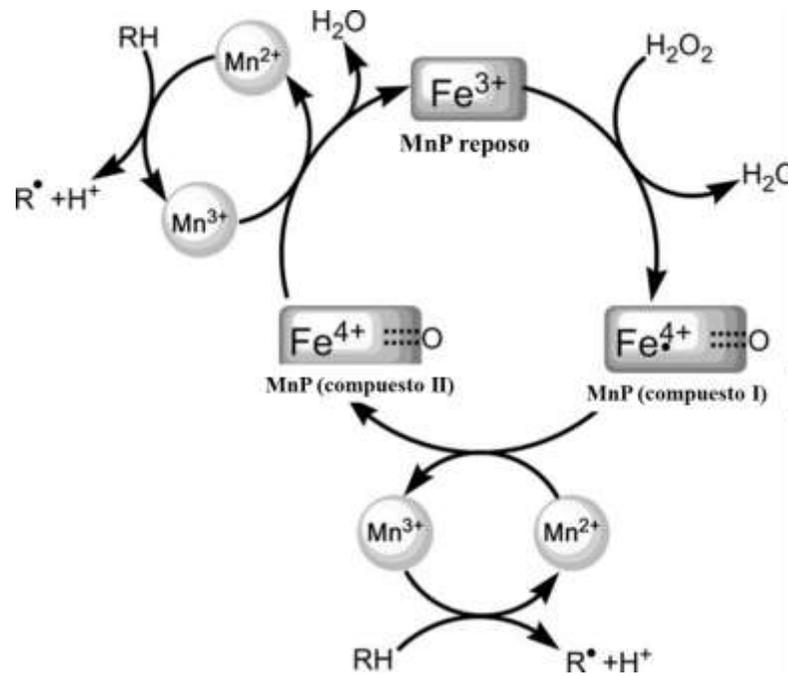


Nota: Tomado de Pollegioni et al., 2015.

3.6.3.3 Manganeso peroxidasa. (MnP, EC 1.11.1.13) Es una enzima hemo glicosilada compuesta por dos dominios (proximal y distal) unidos por un grupo hemo. (Kumar & Chandra, 2020). Su estructura molecular contiene dos iones Ca^{2+} y cinco puentes disulfuro, (uno con el sitio de unión a Mn^{2+}) que son responsables de mantener la estructura del sitio activo de la enzima. El mecanismo de catálisis es similar al de LiP: i) El hierro se oxida y pasa de Fe^{3+} a Fe^{4+} por acción del peróxido de hidrógeno, formando el compuesto I; ii) El compuesto I se reduce por acción de un donador de electrones (Mn^{2+} a Mn^{3+}), formando el compuesto II; y iii) finalmente una segunda

reducción del compuesto II por acción de un donador de electrones (Mn^{2+} a Mn^{3+}) devuelve la MnP al estado de reposo finalizando el ciclo catalítico **Figura 9**. El compuesto II en presencia de un exceso de H_2O_2 y la ausencia de un sustrato reductor, puede producir una forma catalíticamente inactiva de la enzima, conocida como compuesto III, y finalmente el compuesto III por autooxidación espontánea vuelve a MnP al estado de oxidación férrica.(Pollegioni et al., 2015)

Figura 9. *Ciclo catalítico manganeso peroxidasa.*



Nota: Tomado de Pollegioni et al., 2015.

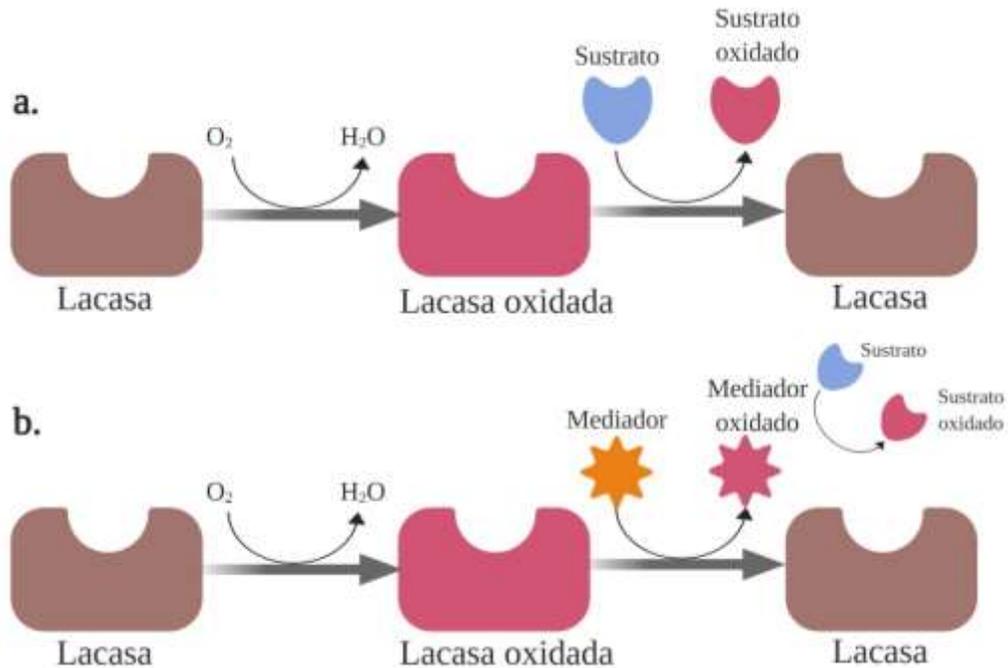
3.6.3.4 Degradación de lignina. Las enzimas involucradas en la degradación de lignina pueden dividirse principalmente en dos grupos principales: las enzimas auxiliares de degradación y las enzimas modificadoras de la lignina (Kumar & Chandra, 2020). Las enzimas auxiliares son incapaces de degradar la lignina por sí mismas, pero son necesarias para completar el proceso de degradación, en este grupo se encuentran: aril-alcohol deshidrogenasa (AAD, EC 1.1.1.90), glioxal oxidasa (GLOX, EC 1.2.3.5), quinona reductasa (QR, EC 1.1.5.1), celobiosa deshidrogenasa

(CDH, EC 1.1.99.18), superóxido dismutasa (SOD, EC 1.15.1.1), glucosa 1-oxidasa (GOX, EC 1.1.3.4), piranosa 2-oxidasa (P2Ox, EC 1.1.3.4), metanol oxidasa (EC 1.1.3.13) y citocromo P450 monooxigenasas (CYPs, EC 1.14.14.1) (Janusz et al., 2017; Peralta et al., 2017).

Las enzimas modificadoras de la lignina incluyen: i) Enzima lacasa (Lcc, EC 1.10.3.2) que cataliza la oxidación de compuestos fenólicos por reducción de un electrón de los grupos hidroxilo de las fracciones fenólicas de lignina para generar radicales fenoxi, estos conducen a la escisión del anillo aromático, escisión alquil-arilo, $C\alpha$ oxidación, $C\alpha$ - $C\beta$ escisión **Figura 10a**; las enzimas lacasas también catalizan la oxidación de compuestos no fenólicos de la lignina en presencia de un mediador, el cual se oxida a un intermediario y luego el intermediario genera la oxidación del sustrato no fenólico llevando a la escisión $C\alpha$, $C\alpha$ - $C\beta$, escisión de β -éter y escisión de anillo aromático **Figura 10b** (Wong, 2009); ii) La enzima lignina peroxidasa (LiP, EC 1.11.1.14) degrada las unidades no fenólicas de lignina a cetonas o aldehídos homólogos, y las unidades fenólicas de lignina a radicales fenoxi dando como resultado la escisión de $C\alpha$ - $C\beta$ (Kumar & Chandra, 2020); iii) La enzima manganeso peroxidasa (MnP, EC 1.11.1.13) genera Mn^{3+} que oxida unidades fenólicas de lignina llevando a la escisión de enlaces β -aril éter, $C\alpha$ - $C\beta$, diarilpropano y β -O-4, en presencia de un mediador puede degradar unidades no fenólicas de lignina en sus respectivas cetonas y aldehídos. (Wong, 2009) (Pollegioni et al., 2015).

La presencia de mediadores en el proceso de despolimerización de la lignina es importante ya que un mediador actúa como un portador de electrones entre la enzima y el sustrato (**Figura 10b**). La capacidad de mejorar el proceso de degradación de lignina esta dado principalmente gracias a que el mediador puede difundirse fácilmente a través de las fibras de lignina después de ser activado por la enzima permitiendo la degradación de unidades no fenólicas de la lignina (Masran et al., 2016).

Figura 10. *Ciclo catalizado por lacasa.*



Nota: **a.** oxidación directa del sustrato: El sustrato se oxida por acción de la enzima y **b.** oxidación in-directa: el sustrato se oxida en presencia de un mediador. El mediador (naranja) se oxida a un intermediario (rojo) que después oxida al sustrato (azul). Adaptado de Kumar & Chandra, 2020.

3.7. Pretratamiento y sacarificación simultáneos de biomasa lignocelulósica

Debido a la maquinaria enzimática (celulolítica, ligninolítica y hemicelulolítica) que poseen los hongos basidiomicetos para degradar material lignocelulósico, actualmente se ha proyectado utilizar cócteles de enzimas lignocelulolíticas de origen fúngico como una de las formas más prometedoras de pretratamiento y sacarificación simultáneos de biomasa lignocelulósica para la obtención de azúcares fermentables (Xu, Lin, Zang, & Shi, 2018). Actualmente, se llevan a cabo dos procesos separados para el pretratamiento y la hidrólisis de la biomasa (Sudha et al., 2015). El desarrollo de un solo paso para las etapas de pretratamiento y sacarificación, permite una disminución en los tiempos de procesamiento, con altos rendimientos y reducción en los costos de producción para la obtención de azúcares fermentables a partir de

lignocelulosa (Althuri, Gujjala, & Banerjee, 2017). La optimización del pretratamiento y sacarificación simultáneas (SPS) permite que el proceso sea más eficiente al reducir el tiempo de tratamiento y la pérdida de carbohidratos. La eficiencia del proceso de producción de azúcares fermentables depende de la optimización de condiciones de temperatura, tiempo, pH, carga enzimática, concentración de sustrato y presencia de mediadores (Mohd Azhar et al., 2017).

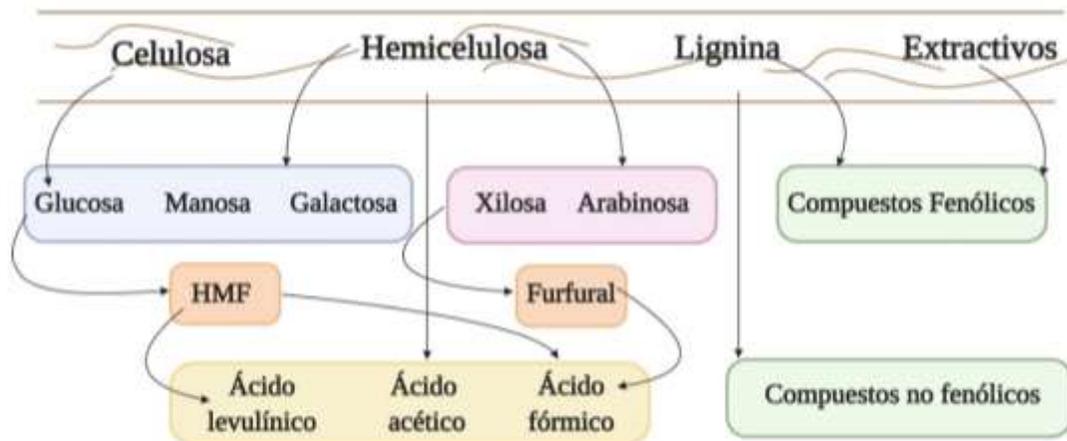
3.8 Desintoxicación de inhibidores de la hidrólisis y fermentación

El pretratamiento e hidrólisis de la biomasa lignocelulósica genera diversos subproductos por la descomposición parcial de celulosa, hemicelulosa y lignina, incluyendo derivados de furano como el 5-hidroximetil-2-furaldehído (HMF) y el 2-furaldehído (furfural), ácidos orgánicos débiles (ácido fórmico, acético y levulínico), y compuestos fenólicos (vainillina, siringaldehído, coniferil aldehído) (Robak & Balcerek, 2018) *Figura 11*. La concentración y el tipo de subproductos depende de factores como la naturaleza de la biomasa y las condiciones de tratamiento (temperatura, tiempo, pH) y el tipo de tratamiento (físico, químico o biológico) (Zabed et al., 2017). Los subproductos actúan como inhibidores tanto de enzimas que degradan la celulosa en el proceso de sacarificación, como de los microorganismos fermentadores en la producción de etanol (Jönsson & Martín, 2016), dado que pueden aumentar la fase de adaptación, disminuir la densidad celular y reducir la tasa de crecimiento, llevando a menores rendimientos y producción de etanol. (Robak & Balcerek, 2018).

La desintoxicación de jarabes es una de las formas más eficaces para contrarrestar los problemas de inhibición en los procesos de sacarificación y fermentación. Las estrategias de desintoxicación incluyen el uso de productos químicos, extracción líquido-líquido, extracción líquido-sólido, calentamiento y evaporación, y tratamientos con enzimas (Jönsson et al., 2013). El uso de enzimas ligninolíticas (lacasas y peroxidasas) es una estrategia prometedora, debido a que

no se necesita de un paso adicional para integrarlo al proceso de sacarificación para la producción de jarabes ya que se puede realizar a condiciones similares de la hidrólisis enzimática y además tienen afinidad por el sustrato a eliminar (compuestos fenólicos) (Jönsson et al., 2013; Jönsson & Martín, 2016).

Figura 11. Principales rutas de formación de inhibidores.



Nota: Los derivados del furano y los ácidos alifáticos son productos de degradación de hexosas y pentosas, mientras que compuestos fenólicos son derivados principalmente de la lignina. Adaptado de Jönsson et al., 2013.

3.9 Fermentación de hidrolizados lignocelulósicos

Los jarabes fermentables son una mezcla de soluciones concentradas de azúcares, compuesta por monosacáridos, disacáridos y oligosacáridos, que contienen una proporción diferente de azúcares dependiendo del método de hidrólisis y grado de conversión del sustrato lignocelulósico (Gerena, 2015; Hull, 2010). Los jarabes se obtienen por hidrólisis parcial o total a partir de polisacáridos complejos como almidón, hemicelulosa y celulosa (Hull, 2010). Los hidrolizados se caracterizan de acuerdo al equivalente de dextrosa (ED), el cual se define como el

porcentaje en peso de glucósidos reductores presentes en el jarabe con respecto al peso de los sólidos totales de oligosacáridos (Gerena, 2015)

$$ED = (Wgr/Wst) * 100$$

Dónde: Wgr: Peso de glucósidos reductores presentes en el jarabe.

Wst: Peso de los sólidos totales en el jarabe

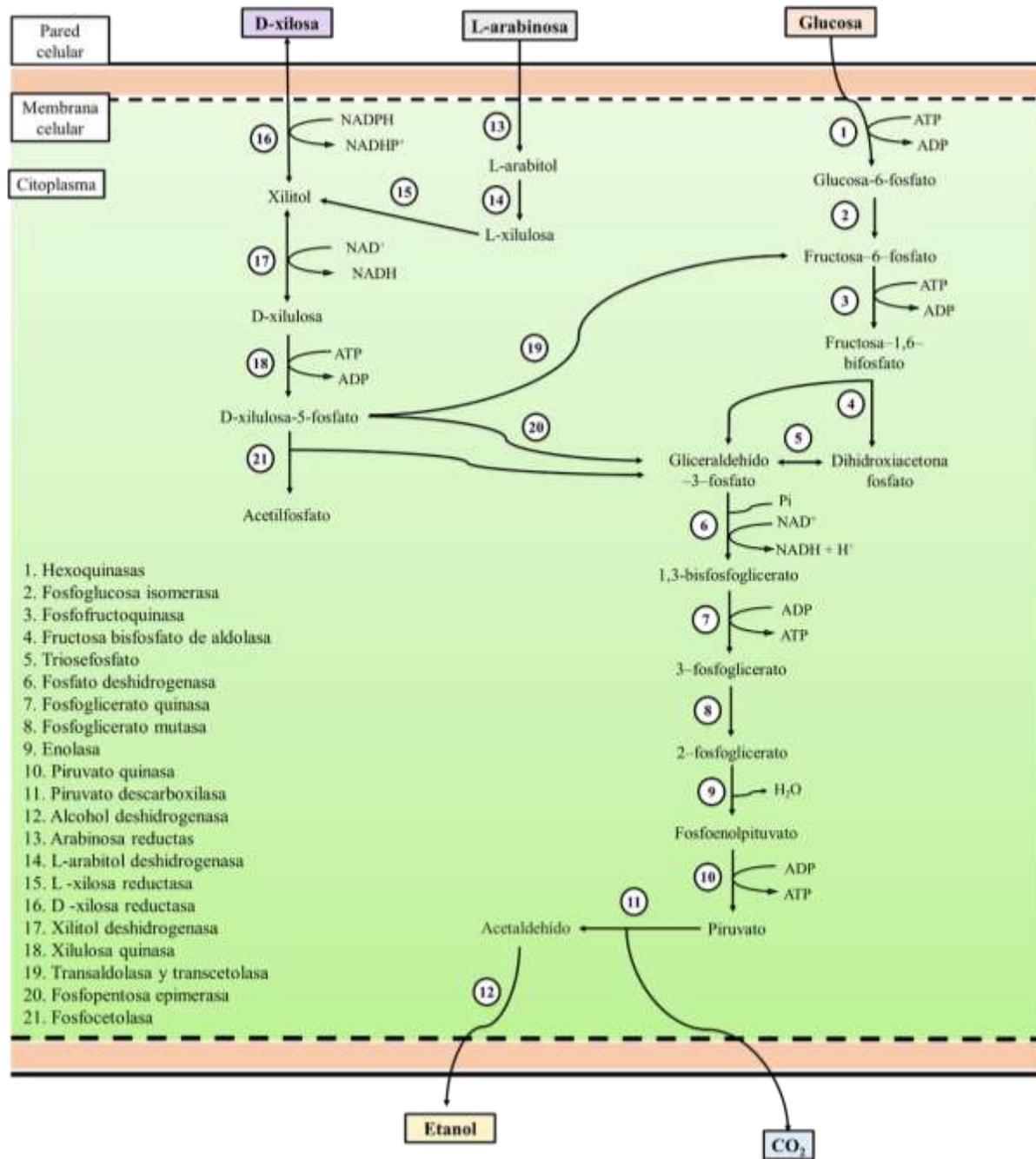
Los jarabes provenientes de materias primas lignocelulósicas contienen principalmente hexosas y pentosas (Zabed et al., 2017), una gran variedad de microorganismos tienen la capacidad de fermentar uno o los dos azúcares para la producción de etanol, entre ellos se incluyen bacterias (*Aerobacter* spp., *Bacillus* spp., *Klebsiella* spp., *Thermoanaerobacter* spp., *Aeromonas* spp.) y levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis*, *Kluyveromyces marxianus* y *Candida shehatae*) (Rastogi & Shrivastava, 2017; Zabed et al., 2017).

Los microorganismos utilizados en la industria del bioetanol basados en hidrolizados lignocelulósicos deben presentar las siguientes características: i) mostrar alto rendimiento de etanol (> 90% del teórico), ii) tolerar altas concentraciones de etanol (> 40 g.L⁻¹), iii) poseer una buena productividad de etanol (> 1.0 g / L / h), iv) tener bajos requerimientos nutricionales en el medio, v) alta resistencia a la presencia de inhibidores en el medio, fluctuaciones de pH ácido y a temperaturas hasta de 52°C (Robak & Balcerek, 2018; Zabed et al., 2017). *Saccharomyces cerevisiae* es la levadura más utilizada para la fermentación y producción debido a su tolerancia a altas concentraciones de etanol y eficiencia en la conversión de azúcares a etanol, sin embargo, solo puede fermentar hexosas y además tiene menor tolerancia a inhibidores en comparación con cepas de *Pichia stipitis* y *Kluyveromyces marxianus* (Robak & Balcerek, 2018). *K. marxianus* es capaz de fermentar conjuntamente hexosas y pentosas dando una mayor productividad en la producción de etanol (Mohd Azhar et al., 2017), además de tener la capacidad de crecer hasta

temperaturas de 52 °C. La vía metabólica utilizada por las levaduras para la fermentación de glucosa es la glucólisis de Embdem-Meyerhof. La glucólisis se lleva a cabo en el citoplasma de la célula, donde cada mol de glucosa, genera dos moles de piruvato, el cual en ausencia de oxígeno se reduce y forma una mol de etanol y una mol de dióxido de carbono y dos moléculas de ATP (Zabed et al., 2017). En la vía de las pentosas fosfato, la D-xilosa se convierte a D-xilosa-5-fosfato y esta a su vez por reordenamiento no oxidativo se convierte en gliceraldehído-3-fosfato y fructosa-6-fosfato que conduce a la fermentación de azúcares a etanol por la vía de Embdem-Meyerhof.

Figura 12 (Rastogi & Shrivastava, 2017).

Figura 12. Vía metabólica utilizada por *K. marxianus* para la fermentación de hexosas (glucosa) y pentosas (xilosa y arabinosa).



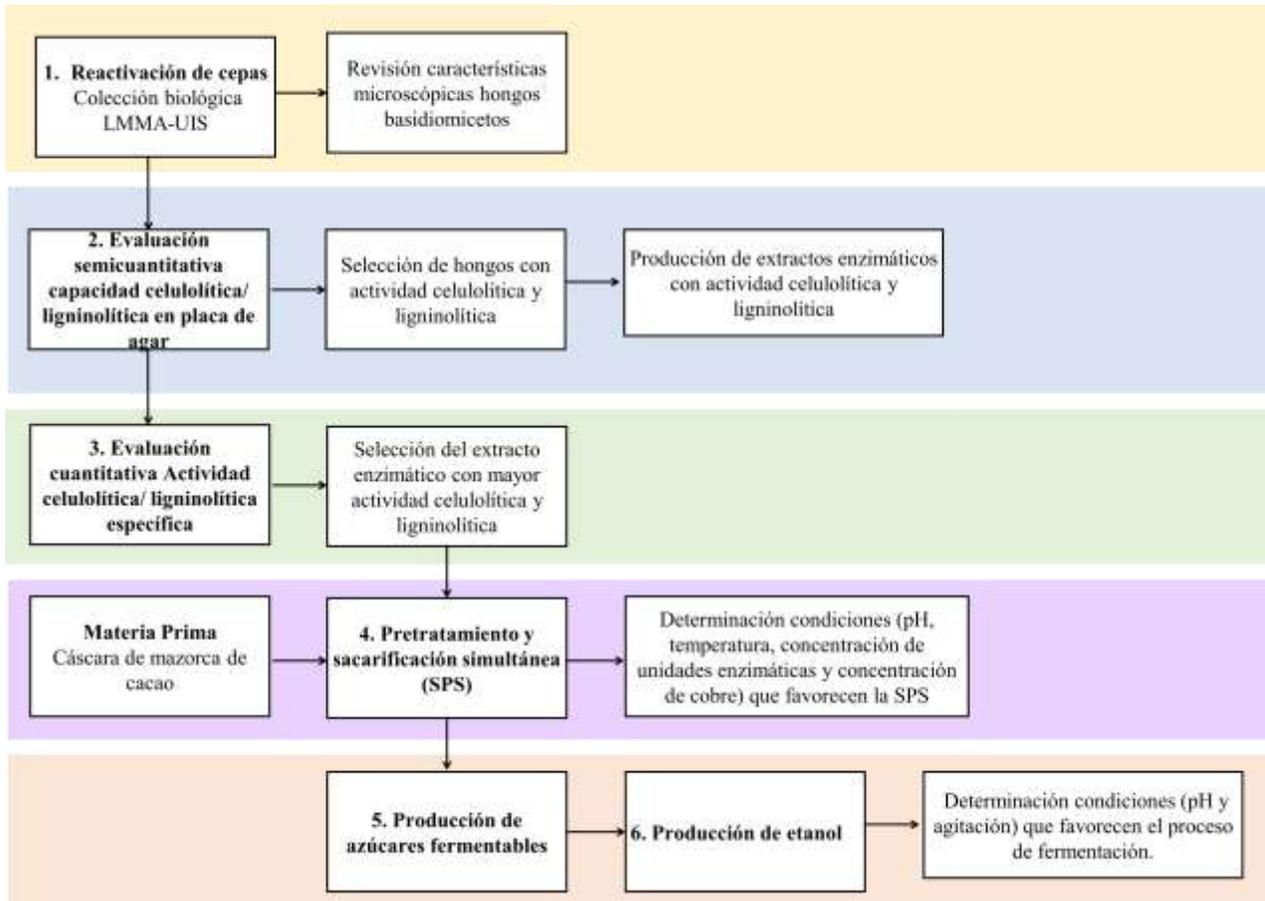
Nota: En ausencia de oxígeno el piruvato se reduce y forma un mol de etanol y un mol de dióxido de carbono y dos moléculas de ATP. Adaptado de Rastogi & Shrivastava, 2017 y Zabed et al., 2017.

3.10. Estado del arte

La primera hidrólisis enzimática de cáscara de cacao usando cepas de *Trichoderma reesei* fue realizada por Simposon y Oldham en 1984 (Simpson & Oldham, 1984). Posteriormente se adelantaron estudios sobre la viabilidad de utilizar *Pleurotus ostreatus* para la deslignificación de cáscara de cacao y optimizar el proceso de fermentación con el producto de la deslignificación (Alemawor, Dzogbefia, Oddoye, & Oldham, 2009); Samah y colaboradores en 2011, hidrolizaron cáscara de mazorca de cacao con HCl 1 M, 4 h, 75 ° C, y obtuvieron un jarabe con una cantidad de glucosa máxima (30,7% p/v) y una producción de etanol del 17,3%, v/v en fermentación durante 26 h con *Saccharomyces cerevisiae* (Samah, Sias, Hua, & Hussin, 2011). (Schmidt & Thomsen, 2014), estimaron teóricamente la producción de bioetanol a partir de cáscara de mazorca de cacao, basándose en su composición lignocelulósica y varios factores de bioconversión como el factor de hidrólisis y el factor de conversión de etanol e informaron que el rendimiento de bioetanol teórico a partir de cáscara de mazorca de cacao podría ser de alrededor de 0,28 L etanol (kg ST)⁻¹, más bajo que el de las mazorcas de maíz (~0,1 L etanol (kg ST)⁻¹) y de la paja de arroz (~0,49 L etanol (kg ST)⁻¹). Adicionalmente, (OlugbengaOlufemi & Sanjo Oyetuji, 2015) realizaron el mejoramiento en la producción de bioetanol a partir de cáscara de cacao, obteniendo que las mejores condiciones de hidrólisis con H₂SO₄ fueron a concentraciones de 0,5 M, 150 minutos y 80 °C, y las de fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* fueron a una concentración de 0,05 mg/L de levadura a pH 8 y 144 horas de fermentación. (Nazir, Novelina, Juita, Amelia, & Fatli, 2016) obtuvieron jarabe usando cáscara de mazorca de cacao, realizando pretratamiento con H₂SO₄ al 1.5%, por un tiempo de reacción de 120 minutos y sacarificación con H₂SO₄ al 3%, la concentración total de azúcares fue 20.49% v/v. A la fecha no existen reportes de SPS de cáscara de mazorca de cacao por métodos enzimáticos para la producción de etanol.

4. Metodología

Figura 13. Diagrama de flujo para la obtención de jarabes fermentables y etanol a partir de cáscara de mazorca de cacao.



4.1. Cepas de hongos y condiciones de cultivo

Se utilizaron cinco cepas de los géneros, *Byssomerulius* sp. LMB1, *Pleurotus* sp. LMB2, *Dictyopanus pusillus* LMB4, *Hyphodontia* sp. LMB7, *Trametes* sp. LMB15 del Cepario del Laboratorio de Microbiología y Mutagénesis Ambiental de la Universidad Industrial de Santander (LMMA-UIS), registrado bajo el número 241 en el Registro Nacional de Colecciones Biológicas del Instituto Humboldt.

El crecimiento de las cepas fúngicas se realizó en agar extracto de salvado de trigo (AST): 10 g.L⁻¹ glucosa, 0,3 g.L⁻¹ urea, 1,4 g.L⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 2,0 g.L⁻¹ K₂HPO₄, 0,3 g.L⁻¹ CaCl₂, 0,3 g.L⁻¹ MgSO₄*7H₂O, 0,75 g.L⁻¹ peptona, 0,25 g.L⁻¹ extracto de levadura, elementos traza en 5,0 mg.L⁻¹ FeSO₄*7H₂O, 1,56 mg.L⁻¹ MnSO₄*H₂O, 1,4 mg.L⁻¹ ZnSO₄*7H₂O y 2,0 mg.L⁻¹ CoCl₂*6H₂O, el agua fue reemplazada por extracto de salvado de trigo (175 g.L⁻¹ de salvado de trigo remojado por 1 hora y posteriormente filtrado con filtro de tela) (Corre, Lorenci, Carlos, Soccol, & Rigon, 2016; Mandels & Reese, 1956; Mandels & Weber, 1969).

Las cepas fueron incubadas por 15 días a 25°C. La pureza de los cultivos fúngicos se evaluó verificando las características microscópicas de hongos basidiomicetos macromicetos como lo es la presencia de hifas hialinas, septos, clamps o fíbulas y ausencia de conidios y conidióforos (Peralta et al., 2017). Adicionalmente en el Laboratorio de Nicolas Doucet, INRS Institut Armand-Frappier, University of Quebec, Laval, Canadá se comprobó la identidad de los aislamientos por PCR, usando los primers universales para identificación fúngica ITS1/ITS4 para amplificar el ADN ribosómico por el kit de ADN polimerasa (Bio-Rad, Canadá) (Gardes & Bruns, 1993; Izzo & Mazzola, 2009). Los productos de PCR se secuenciaron por el método de Sanger y mediante la Herramienta de (BLAST) en el Servidor del National Center for Biotechnology Information (NCBI) se realizó la búsqueda de secuencias similares (Rueda et al., 2020).

4.2. Evaluación semicuantitativa capacidad lignocelulolítica en placa de agar

4.2.1 Selección de hongos con actividad celulolítica

Los hongos de la colección LMMA-UIS con la mayor actividad celulolítica fueron seleccionados semicuantitativamente en cajas de Petri por medio de la hidrólisis de carboximetilcelulosa. Para el ensayo se utilizó un medio carboximetilcelulosa (MCMC) compuesto por 3 g.L⁻¹ urea, 1,4 g.L⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 2,0 g.L⁻¹ K₂HPO₄, 0,3 g.L⁻¹ CaCl₂, 0,3 g.L⁻¹

MgSO₄*7H₂O, 0,75 g.L⁻¹ peptona, 0,25 g.L⁻¹ extracto de levadura, elementos traza en 5,0 mg.L⁻¹ FeSO₄*7H₂O, 1,56 mg.L⁻¹ MnSO₄*H₂O, 1,4 mg.L⁻¹ ZnSO₄*7H₂O y 2,0 mg.L⁻¹ CoCl₂*6H₂O, suplementado con 10 g.L⁻¹ de carboximetilcelulosa como única fuente de carbono (Barreto & Anaguano, 2014; Mandels & Weber, 1969). El medio MCMC fue inoculado usando discos de 8 mm de agar AST con micelio de los hongos con 15 días de crecimiento (Yoon et al., 2014). Todos los ensayos se realizaron por triplicado y se incubaron por 15 días a 28°C. Transcurrido el tiempo de incubación, la hidrólisis de carboximetilcelulosa en el medio MCMC, se evaluó por la adición de 3 mL de rojo de congo al 0,1%, las cajas se agitaron durante 15 min a 150 rpm, se retiró el exceso de la solución y se hicieron dos lavados agregando una solución de NaCl 1M y agitando durante 15 minutos a 150 rpm (McDonald, Rooks, & McCarthy, 2012; Teather & Wood, 1982). La división entre el diámetro de la zona de aclaramiento (Diámetro ZA) y el diámetro de crecimiento de la colonia, permitió determinar la capacidad de hidrólisis de carboximetilcelulosa (CH) **Ecuación 1** para cada aislamiento (Fen et al., 2014; W. Lu, Wang, Yang, Wang, & Nie, 2005; Sarsaiya et al., 2018). Las cepas con mayor CH fueron seleccionadas para la producción de extractos con actividad celulolítica.

Ecuación 1

$$CH = \frac{\text{Diámetro ZA}}{\text{Diámetro crecimiento}}$$

4.2.2. Selección de hongos con actividad ligninolítica en placa de agar

Los hongos de la colección LMMA-UIS con la mayor actividad ligninolítica fueron seleccionados semicuantitativamente en cajas de Petri por medio de la oxidación del [ácido 2,2'-azino-Bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)] (ABTS) (Madhavan, Patel, Vyas, & Ganesh, 2017; Sidhu, Darade, Bhavsar, Gaikwad, & Patil, 2017) y guayacol (Alfarra, Hasali, & Omar, 2013; Li

et al., 2016; Raj, Kumar, Haq, & Kumar, 2014). Para el ensayo se utilizó como control un medio de cultivo base (MB) compuesto por: 3 g.L⁻¹ urea; 1,4 g.L⁻¹ (NH₄)₂SO₄; 2,0 g.L⁻¹ K₂HPO₄; 0,3 g.L⁻¹ CaCl₂; 0,3 g.L⁻¹ MgSO₄*7H₂O; 0,75 g.L⁻¹ peptona; 0,25 g.L⁻¹ extracto de levadura; y elementos traza: 5,0 mg.L⁻¹ FeSO₄*7H₂O; 1,56 mg.L⁻¹ MnSO₄*H₂O; 1,4 mg.L⁻¹ ZnSO₄*7H₂O; y 2,0 mg.L⁻¹ CoCl₂*6H₂O, suplementado con glucosa 10 g.L⁻¹ y 2,5 mM de CuSO₄* 5 H₂O (Corre et al., 2016; Kajita et al., 2004; Mandels & Weber, 1969). ABTS al 0,1% (Thiribhuvanamala, Kalaiselvi, Parthasarathy, Madhavan, & Prakasam, 2017) o guayacol al 0,04% (Li et al., 2016) fueron agregados al MB separadamente para la evaluación semicuantitativa. Los medios con MB, MB con ABTS (MBA) y MB con guayacol (MBG) fueron inoculados con un disco de 8 mm con crecimiento previo de 15 días en AST (Sergentani, Gonou-Zagou, Kapsanaki-Gotsi, & Hatzinikolaou, 2016; Yoon et al., 2014). Todos los ensayos se realizaron por triplicado y se incubaron por 15 días a 28°C. La oxidación se estimó por la presencia de un halo de color verde o marrón-rojizo en los MBA y MBG, respectivamente. La división entre el área del halo de coloración (oxidación) y el área de crecimiento de la colonia, determinó la eficiencia enzimática (EE) *Ecuación 2* para cada aislamiento (Ang, Ngoh, Seak, & Chua, 2011). Las cepas con mayor EE fueron seleccionadas para la producción de extractos con actividad ligninolíticas.

Ecuación 2

$$EE = \frac{\text{Área del halo de coloración}}{\text{Área de crecimiento}}$$

4.3. Evaluación cuantitativa de la actividad lignocelulolítica en SSF

Los extractos enzimáticos lignocelulolíticos se obtuvieron por fermentación en estado sólido (SSF) para cada uno de los hongos seleccionados en el ensayo en placa de agar en la sección 4.2.

4.3.1. Fermentación en sustrato lignocelulósico

La SSF se realizó usando cuarenta y cinco erlenmeyers de 250 mL, con 2,5 g de sustrato (raquis de palma con tamaño de partícula de 1 a 2 cm) (Rueda et al., 2020), 15 mL de medio de cultivo Mandels (Mandels & Weber, 1969) suplementado con glucosa para estimular el crecimiento micelial (Hailei, Ping, Yuhua, & Yufeng, 2015), $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ a 5 mM (Kajita et al., 2004; Li et al., 2016) y ácido gálico a 3mM como inductores en la actividad de enzimas ligninolíticas (Ming et al., 2019; Mishra, Jana, Jana, & Gupta, 2017; Wang, Liu, Ning, Liao, & Jia, 2017) y avicel® 1 g.L^{-1} como inductor de la actividad de enzimas celulolíticas (Kobakhidze, Asatiani, Kachlishvili, & Elisashvili, 2016). Cada erlenmeyer fue inoculado con 10 discos de micelio de 8 mm de diámetro obtenido de un cultivo en agar AST con crecimiento previo de 15 días. Los erlenmeyers fueron incubados durante 30 días a 25°C, 60% de humedad, sin agitación (Rueda et al., 2020; Sergentani et al., 2016; Xu et al., 2018; Yoon et al., 2014).

El extracto enzimático fue obtenido por extracción liquido-sólido, se agregaron 30 mL de buffer sodio-fosfato pH 7 (60 mM) a cada erlenmeyer, incubando en agitación a 150 rpm, 28°C durante 24 horas (Deswal, Khasa, & Kuhad, 2011; Rueda et al., 2020). Posteriormente el contenido de cada erlenmeyer se transfirió a tubos falcon de 50 mL, se agitó en vórtex a 1500 rpm durante 15 minutos, se centrifugó a $8900 \times g$ a 4°C durante 15 minutos (Prajapati, Kumar Suryawanshi, Agrawal, Ghosh, & Kango, 2018; Xu et al., 2018) y se recuperaron los sobrenadantes en tubos de 50 mL. Los extractos de la SSF se obtuvieron cada dos días por 30 días, utilizando por descarte tres erlenmeyers, sobre los cuales se determinó concentración de proteína, actividad enzimática celulolítica total y específicas (endoglucanasa celobiohidrolasa, β -glucosidasa) y actividades enzimáticas ligninolíticas (lacasa, lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa) (**Apéndice A y B**).

4.3.2 Fermentación en sustrato celulósico

Se realizó una nueva SSF usando celulosa como sustrato (2 g de papel filtro whatman), 15 mL de medio de cultivo Mandels (Mandels & Weber, 1969) y 2 g.L⁻¹ de carboximetilcelulosa como inductor de la actividad celulolítica (Kobakhidze et al., 2016). Cada erlenmeyer fue inoculado con 10 discos de micelio de 8 mm de diámetro obtenido de un cultivo en agar AST con crecimiento previo de 15 días. Los erlenmeyers fueron incubados durante 24 días a 25°C, 60% de humedad, sin agitación (Sergentani et al., 2016; Xu et al., 2018; Yoon et al., 2014), se realizó seguimiento de la fermentación tomando muestras destructivas cada 3 días. Como control se usó una cepa de *Trichoderma* sp. LMA12 conocida por su actividad celulolítica (Hernández, 2015).

La obtención del extracto enzimático se realizó agregando 10 mL de buffer fosfato pH 8 (60 mM) a cada erlenmeyer y agitando a 150 rpm a 28 °C durante 24 horas (Deswal et al., 2011; Hernández, 2015). Posteriormente se agitó en vórtex a 1500 rpm durante 15 minutos, se centrifugó a 8900 xg a 4°C durante 15 minutos y se recuperaron los sobrenadantes (Prajapati et al., 2018; Xu et al., 2018). Los sobrenadantes de la SSF fueron usados para determinar la concentración de proteína, cuantificar la actividad enzimática celulolítica total (**Apéndice A y B**). Se seleccionó el extracto enzimático con mayor actividad enzimática lignocelulolítica para el pretratamiento y sacarificación simultáneas en la producción de jarabes fermentables.

El extracto enzimático con mayor actividad lignocelulolítica, fue seleccionado para el tratamiento de la cáscara de mazorca cacao y desintoxicación de jarabes fermentables. Los extractos enzimáticos fueron liofilizados en un liofilizador Labconco operado a 0.080 mbar y -87 °C por 96 horas para concentrar y preservar las enzimas.

4.4. Pretratamiento y sacarificación simultáneas de cáscara de mazorca de cacao (SPS) y desintoxicación de jarabes fermentables

4.4.1. Materia prima

Las mazorcas de cacao tipo CCN-51 fueron colectadas de un cultivo ubicado en San Vicente de Chucurí municipio del departamento de Santander, Colombia. Las mazorcas fueron sometidas a un proceso de fraccionamiento y despulpado para separar la cáscara de los granos y el mucílago. Las cáscaras de mazorca de cacao (CPHs) se lavaron con agua, se cortaron y se secaron al sol hasta un contenido de humedad de $\pm 10\%$ w/w. Posteriormente se realizó reducción del tamaño de partícula usando un molino de cuchillas, se seleccionó el material empleando un tamiz en malla número 40 con un tamaño de partícula de aproximado de 0.425 mm (Nazir et al., 2016). Las CPHs fueron esterilizadas a 121 °C por 15 minutos y finalmente almacenadas en condiciones estériles a temperatura ambiente (Lourenço et al., 2016; OlugbengaOlufemi & Sanjo Oyetuji, 2015).

La composición porcentual de lignocelulosa en las CPHs fue cuantificada por la metodología de extracción de Klason, Kurschner- Hoffer y Jayme -Wise, para determinar contenido porcentual de lignina, celulosa y hemicelulosa, el análisis porcentual fue realizado por el laboratorio del Centro de Estudios e Investigaciones Ambientales CEIAM UIS (Browning, 1967; Irbe et al., 2014; Macfarlane, Warren, White, & Adams, 1999; Tappi, 2002; Zanirun, Bahrin, Lai-Yee, Hassan, & Abd-Aziz, 2015).

4.4.2. Efecto del pH, temperatura, concentración de cobre y enzimas lignocelulolíticas el en el SPS y desintoxicación

La cáscara de mazorca de cacao (CPH) fue sometida a SPS para la obtención de jarabes fermentables utilizando celulasas comerciales de *Trichoderma reesei* ATCC 26921 (C2730

Sigma-Aldrich) junto con el extracto enzimático seleccionado (Extracto enzimático obtenido por SSF ver sección 4.3).

Las variables independientes, pH, temperatura, concentración de cobre (CuSO_4), concentración de unidades enzimáticas lacasas:celulasas, que afectan la producción y desintoxicación de jarabes fueron seleccionadas con un análisis de varianza ANOVA. Para los ensayos se evaluaron los efectos de cada variable independientes por separado en la producción de azúcares fermentables usando CPH como sustrato. (S. Kumar, Gujjala, & Banerjee, 2017).

El SPS del ANOVA se realizó en tubos de 50 mL que contenían 1,5 g CPH (0,425 mm) y 10 ml de solución ajustada a los valores de las variables independientes evaluadas: pH 4 (buffer acetato 50 mM), pH 5.5 (buffer citrato 50 mM) o pH 7 (buffer fosfato 50 mM), temperatura (30, 45 o 60 °C), concentración de CuSO_4 (2.5, 5.0 o 7.5 mM), concentración de unidades enzimáticas de lacasas y celulasas (10:5, 20:10, 30:15 UI.L⁻¹:UPF.mL⁻¹). Los experimentos fueron evaluados por 192 horas, tomando muestras cada 24 horas. Las muestras fueron centrifugadas a 5000 xg durante 10 minutos, seguido de la filtración del sobrenadante con filtro de tela (S. Kumar et al., 2017). Las variables de respuesta fueron concentración de glucosa, azúcares reductores y porcentaje de desintoxicación de compuestos fenólicos en jarabes fermentables (**Apéndice B**), los datos fueron normalizados utilizando como control negativo la solución sin la adición de enzimas lignocelulolíticas.

4.4.3. Mejoramiento de la producción y desintoxicación de jarabes fermentables por SPS usando CPH como sustrato

Las variables independientes elegidas en la sección 4.4.2 para la obtención de jarabes fermentables por SPS usando el extracto enzimático seleccionado (sección 4.3) se evaluaron por medio de dos diseños de experimentos. Un primer diseño de cribado 2^3 (pH, temperatura y

concentración de unidades enzimáticas lacasas: celulasas) y un segundo diseño multinivel 4² (pH y temperatura). Los resultados para ambos diseños fueron graficados en superficies de respuesta (RSM) que permitieron determinar el valor teórico de cada una de las variables independientes en que se obtendría las mayores concentraciones de glucosa y azúcares reductores y un mayor porcentaje de desintoxicación de compuestos fenólicos en los jarabes fermentables (**Apéndice B**), los datos fueron normalizados utilizando como control negativo la solución sin la adición de enzimas lignocelulolíticas.

4.4.4. Análisis estadístico

Statgraphics® Centurion XVI.I fue el software utilizado para el análisis estadístico de los datos del ANOVA y el diseño de experimentos por medio de la prueba de Tukey y superficie de respuesta (RSM) respectivamente. Tanto el ANOVA como el diseño de experimentos se analizaron con un intervalo de confianza del 95% y los valores fueron considerados significativos con un valor $P < 0,05$. El mejoramiento de la SPS en CPH se basó en la RSM utilizando la herramienta de optimización de *Statgraphics® Centurion XVI.I*. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

4.5. Producción y desintoxicación de jarabes fermentables

La evaluación de la producción y desintoxicación de jarabes fermentables en el tiempo se realizó con base en los resultados obtenidos de la optimización del diseño experimental (sección 4.4.4). Se cuantificó la concentración de glucosa, azúcares reductores y el porcentaje de desintoxicación de compuestos fenólicos cada 24 horas por un periodo de 196 horas, los datos fueron normalizados utilizando como control negativo la solución sin la adición de enzimas lignocelulolíticas (**Apéndice B**). Como control se utilizaron celulasas comerciales de *Trichoderma*

reesei ATCC 26921 (C2730 Sigma-Aldrich) junto con lacasas comerciales de *Trametes versicolor* (38429 Sigma-Aldrich®).

4.5.1. Evaluación del efecto de las enzimas ligninolíticas en la producción y desintoxicación de jarabes

Se evaluó el efecto del extracto enzimático seleccionado en el proceso de producción y desintoxicación de jarabes para ello se realizó el pretratamiento y sacarificación de CPH usando celulasas comerciales de *Trichoderma reesei* ATCC 26921 (C2730 Sigma-Aldrich) junto con el extracto enzimático seleccionado (sección 4.3) y sacarificación de CPH sin pretratamiento usando solo celulasas comerciales de *Trichoderma reesei* ATCC 26921 (C2730 Sigma-Aldrich). Se cuantificó la concentración de glucosa, azúcares reductores y el porcentaje de desintoxicación de compuestos fenólicos (**Apéndice B**) cada 24 horas por un periodo de 196 horas, los datos fueron normalizados utilizando como control negativo la solución sin la adición de enzimas lignocelulolíticas.

4.6. Obtención de etanol de segunda generación

4.6.1 Cepa y preinóculo

La fermentación de los jarabes obtenidos por SPS de CPH en la sección 4.5 se realizó utilizando la cepa de la levadura termotolerante *Kluyveromyces marxianus* DSM 5418. El preinóculo para la fermentación se realizó en tubos de 15 mL que contenían 10 mL de caldo Czapek compuesto por 0,5 g.L⁻¹ KCl, 1 g.L⁻¹ K₂HPO₄, 2 g.L⁻¹ NaNO₃, 0,01 g.L⁻¹ FeSO₄, 0,5 g.L⁻¹ MgSO₄, 100 g.L⁻¹ glucosa, 3 g.L⁻¹ extracto de levadura, 5 g.L⁻¹ peptona y se incubó a 28°C por 72 horas, con agitación de 150 rpm. Transcurrido el tiempo de incubación, 2 mL del preinóculo fueron transferidos a un erlenmeyer con 100 mL de caldo Czapek, se incubó bajo las mismas condiciones de agitación y temperatura hasta alcanzar su fase exponencial (18-20 horas), este

cultivo fue usado como inóculo para el proceso de fermentación de jarabes obtenidos por SPS de CPH (Moreno, Ibarra, Ballesteros, Fernández, & Ballesteros, 2013).

4.6.2 Fermentación de jarabes obtenidos por SPS de CPH

La fermentación se realizó en 27 bio-reactores de 10 mL con tapones de caucho y vacío manual con un volumen de medio de 5.4 mL de jarabe obtenido por SPS de CPH suplementado con los componentes del medio Czapek sin glucosa (sección 4.6.1). Una suspensión de 0,6 mL (aproximadamente 1.5×10^8 cel. mL⁻¹) del inóculo de la levadura *Kluyveromyces marxianus* DSM 5418 se transfirió a los biorreactores. Las células del inóculo se lavaron 3 veces con solución salina estéril al 0.9% y se re suspendieron en jarabe suplementado. El conteo celular se realizó en una cámara de Thoma por triplicado (**Apéndice B**). Los biorreactores se incubaron por 8 horas, a 28°C y 150 rpm de agitación. Se realizó seguimiento al proceso de fermentación evaluando 3 biorreactores cada hora durante 8 horas y se cuantificó la concentración de glucosa, azúcares reductores y etanol (**Apéndice B**). Todos los ensayos se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como media \pm DE.

4.6.3. Determinación de las condiciones que favorecen la obtención de etanol

Se realizó un análisis de varianza ANOVA considerando temperatura (28, 34, 40 y 46 °C) y agitación (75, 150, 225 y 300 rpm) como variables independientes que afectan la producción etanol. Se evaluó efecto de cada variable independiente por separado en la producción de etanol, usando como sustrato los jarabes obtenidos por SPS de CPH. La evaluación de la temperatura se realizó con una agitación de 150 rpm y la evaluación de la agitación se realizó a temperatura de 28 °C. La fermentación se incubó por 7 horas y se midió la concentración de etanol como variable de respuesta (**Apéndice B**). Todos los experimentos se realizaron por triplicado. De acuerdo con los datos generados en el análisis de varianza, se realizó un diseño de experimentos multinivel 3²

ajustando los rangos de temperatura y de agitación, con base a los resultados obtenidos en la sección 4.6.2, la fermentación se incubó por 7 horas. Los resultados fueron graficados por la metodología de superficie de respuesta (RSM) y se determinó el valor teórico de las variables independientes que favorecen la mayor producción de etanol usando como sustrato los jarabes obtenidos por SPS de CPH.

4.6.4. Evaluación de las condiciones teóricas óptimas de fermentación

La evaluación experimental de las mejores condiciones teóricas del diseño de experimentos multinivel 3^2 se realizó por medio de una fermentación siguiendo la metodología de la sección 4.6.2. Las fermentaciones se realizaron en 33 biorreactores y se incubaron por 10 horas, empleando las condiciones teóricas de temperatura y agitación calculadas en la sección de 4.6.3. Se tomaron muestras cada hora por triplicado, evaluando la concentración de glucosa, azúcares reductores, etanol (**Apéndice B**) y biomasa por medio de conteo de células en cámara de Thoma (**Apéndice B**). El medio Czapek modificado (MCM) a la misma concentración de glucosa inicial del jarabe (obtenido por SPS de CPH en la sección 4.5) se usó como control de la fermentación.

4.6.5. Análisis estadístico

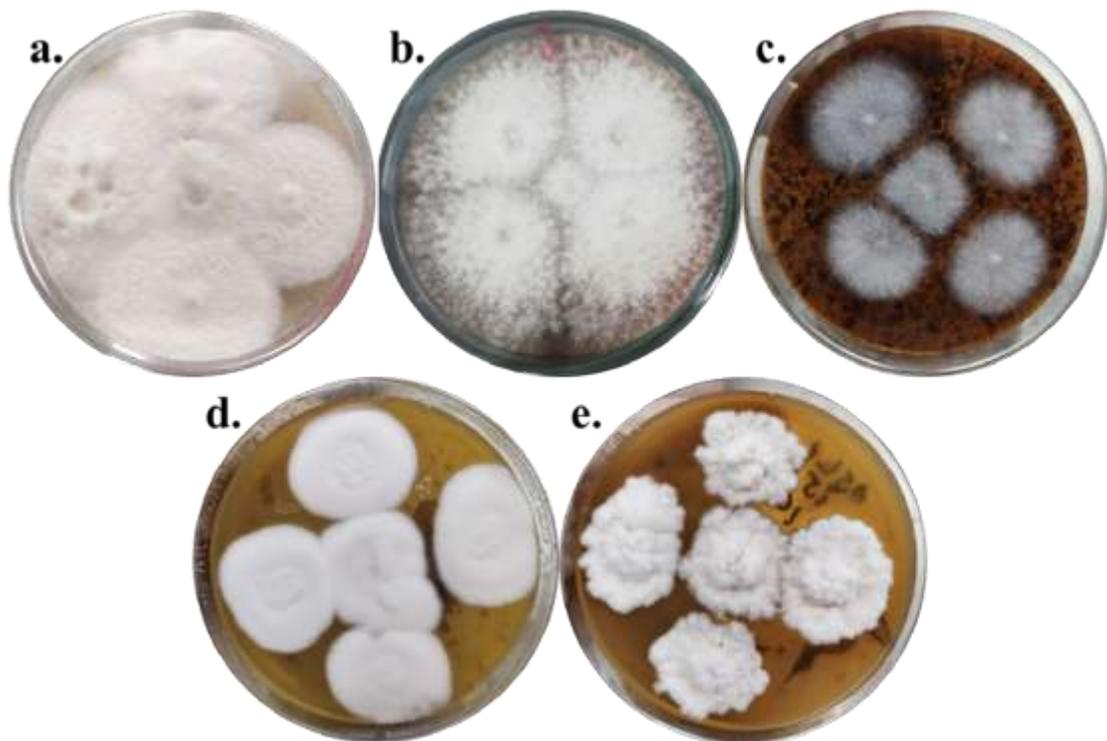
Statgraphics® Centurion XVI.I fue el software utilizado para el análisis estadístico de los datos del ANOVA y el diseño de experimentos por medio de la prueba de Tukey y superficie de respuesta (RSM) respectivamente. Tanto el ANOVA como el diseño de experimentos se analizaron con un intervalo de confianza del 95% y los valores fueron considerados significativos con un valor $P < 0,05$. El mejoramiento de la producción de etanol a partir de jarabes fermentables obtenidos por SPS usando CPH se basó en la RSM utilizando la herramienta de optimización de *Statgraphics® Centurion XVI.I*.

5. Resultados y discusión

5.1. Hongos basidiomicetos macromicetos

Se reactivaron las cinco cepas de la colección biológica LMMA-UIS de *Byssomerulius* sp. LMB1, *Pleurotus* sp. LMB2, *Dictyopanus pusillus* LMB4, *Hyphodontia* sp. LMB7, *Pleurotus* sp. LMB15 **Figura 14**. Microscópicamente se observó en los cinco aislamientos la presencia de hifas hialinas, septos, clamps o fíbulas y ausencia de conidios y conidióforos, características propias de hongos basidiomicetos macromicetos **Figura 15** (Peralta et al., 2017). La secuenciación de ADN de las regiones ITS1 y ITS4 permitió confirmar que las cepas pertenecen a los géneros *Byssomerulius* sp., *Dictyopanus pusillus*, *Hyphodontia* sp. y *Pleurotus* sp. (Rueda et al., 2020).

Figura 14. Cepas reactivadas colección biológica LMMA-UIS.



Nota: *Byssomerulius* sp. LMB1 (a), *Pleurotus* sp. LMB2 (b), *Dictyopanus pusillus* LMB4 (c), *Hyphodontia* sp. LMB7 (d), *Pleurotus* sp LMB15 (e) con 15 días de crecimiento a 25°C en AST.

Los hongos reactivados pertenecientes a colección biológica LMMA-UIS están clasificados dentro de la clase Agaricomycetes, que ha sido reportada por sus capacidades para degradar lignina, celulosa y hemicelulosas.(Peralta et al., 2017).

Figura 15. Características macroscópicas hongos basidiomicetos macromicetos.



Nota: *Dictyopanus pusillus* LMB4 hifas hialinas (flecha roja), septo (flecha azul), clamp o fíbula (flechas amarillas) (Objetivo 100X con azul de lactofenol; aumento 1000X).

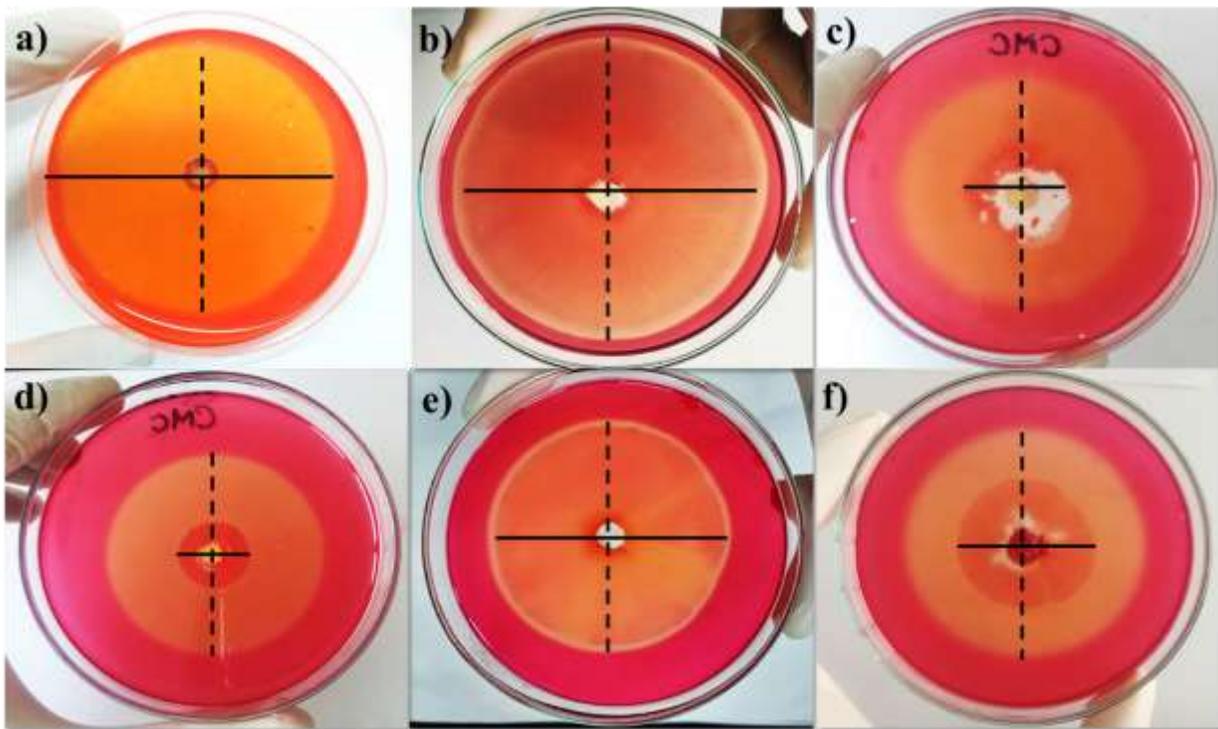
5.2. Evaluación semicuantitativa capacidad lignocelulolítica en placa de agar

5.2.1. Selección de hongos con actividad celulolítica

Teniendo en cuenta que el interés de este trabajo era evaluar aislamientos de hongos basidiomicetes macromicetos para el tratamiento de cáscara de mazorca de cacao, se realizó una selección semicuantitativa según actividad celulolítica y lignolítica de las cepas reactivadas. La evaluación de la actividad celulolítica en placa de agar se realizó como se describe en la sección 4.2.1, después del periodo de incubación se midió el diámetro de crecimiento y la zona de aclaramiento (diámetro ZA) y se determinó la capacidad de hidrólisis de carboximetilcelulosa (CH) usando la *Ecuación 1*. Todas las cepas presentaron crecimiento y zona de aclaramiento que

correspondía con halo de hidrólisis en medio MCMC a los 15 días de incubación (**Figura 16**). Los mayores valores de diámetro de la zona de aclaramiento fueron para los aislamientos *Byssomerulius* sp. LMB1 ($82,03 \pm 0,47$ mm), *Hyphodontia* sp. LMB7 ($66,03 \pm 0,90$ mm), *Pleurotus* sp. LMB15 ($64,50 \pm 1,50$ mm) (**Tabla 2**). *Pleurotus* sp. LMB15 (CH: $1,75 \pm 0,04$), *Pleurotus* sp. LMB2 (CH: $2,11 \pm 0,05$) y *Dictyopanus pusillus*. LMB4 (CH: $3,03 \pm 0,05$) fueron los aislamientos que mostraron la mayor capacidad de hidrólisis (CH), en contraste a *Byssomerulius* sp. LMB1 e *Hyphodontia* sp. LMB7 quienes tuvieron un CH cercana a 1, por lo cual el diámetro de la zona de aclaramiento apenas superó el diámetro de crecimiento en estas cepas (**Tabla 2**).

Figura 16. Evaluación de actividad celulolítica en placa de agar en medio MCMC.



Nota: Se observa la zona de aclaramiento (línea punteada) y el diámetro de crecimiento de la colonia (línea sólida) para *Trichoderma* sp. LMA12 (control positivo) (a), *Byssomerulius* sp. LMB1 (b), c. *Pleurotus* sp. LMB2 (c), *Dictyopanus pusillus* LMB4 (d), *Hyphodontia* sp. LMB7 (e), *Pleurotus* sp. LMB15 (f) crecimiento por 15 días a 25°C.

Los valores de capacidad de hidrólisis obtenidos para *Pleurotus* sp. LMB2, *Dictyopanus pusillus* LMB4 y *Pleurotus* sp. LMB15, en medio MCMC son superiores en comparación a los valores obtenidos para las cepas *Lentinus edodes*-868 (CH:1,24 ± 0,06 mm) y *Coprinus comatus* (CH:1,39 ± 0,17) (Fen et al., 2014) y lo obtenido para los aislamientos de *Trametes* sp.-017 (CH:1,61) y *Pycnoporus* sp.-0,14 (CH:0,98) (Coniglio, Fonseca, Villalba, & Zapata, 2017). Sin embargo, los valores de CH obtenidos de los cinco aislamientos son inferiores a los reportados para la cepa *Hericium erinaceus* (CH:8,16 ± 0,56) (Fen et al., 2014). Vale la pena resaltar que los resultados CH de *Dictyopanus pusillus* LMB4 son similares a lo obtenido en *Trametes* sp.-033 (CH:3,02), hongo basidiomiceto aislado de la selva tropical de Misiones, Argentina; en el que se comprobó la presencia de un complejo enzimático celulolítico con actividad celobiohidrolasa, β-glucosidasa y endoglucanasa (Coniglio et al., 2017).

Tabla 2. Evaluación de actividad celulolítica en placas de MCMC.

Género	Diámetro de Crecimiento (mm)	Diámetro de ZA (mm)	CH
<i>Aspergillus</i> sp. LMA35	51,57 ± 0,40	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
<i>Trichoderma</i> sp. LMA12	83,89 ± 1,56	77,5 ± 3,08	0,92 ± 0,02
<i>Byssomerulius</i> sp. LMB1	77,73 ± 0,87	82,03 ± 0,47	1,06 ± 0,0
<i>Pleurotus</i> sp. LMB2	29,81 ± 0,88	62,90 ± 0,44	2,11 ± 0,05
<i>Dictyopanus pusillus</i> LMB4	18,50 ± 0,36	56,13 ± 0,51	3,03 ± 0,05
<i>Hyphodontia</i> sp. LMB7	62,87 ± 1,70	66,03 ± 0,90	1,05 ± 0,01
<i>Pleurotus</i> sp. LMB15	36,90 ± 1,66	64,50 ± 1,50	1,75 ± 0,04

Nota: Valores medios (n=3) ± DE, Control Negativo: *Aspergillus* sp. LMA35 y Control positivo: *Trichoderma* sp. LMA12.

Los resultados fueron validados con la CH de *Trichoderma* sp. LMA12 (0,92 ± 0,02) usada como control positivo para la hidrólisis de celulosa y *Aspergillus* sp. LMA35 (0,0 ± 0,0) usada como control negativo. Todos los aislamientos presentaron diferente CH en medio MCMC, sin

embargo, no fue descartado ningún aislamiento para el posterior ensayo de actividad ligninolítica en placa de agar.

5.2.2. Selección de hongos con actividad ligninolítica en placa de agar

La evaluación de la actividad ligninolítica en placa de agar se realizó como se describe en la sección 4.2.2, después del periodo de incubación se midió el área del halo de coloración (oxidación) y el área de crecimiento de la colonia, con estos datos se determinó la eficiencia enzimática (EE) mediante la **Ecuación 2**. Todas las cepas presentaron crecimiento en (MB), sin embargo, solo cuatro cepas mostraron un halo de oxidación a los 15 días de crecimiento en MBA y en MBG (**Tabla 3**). Los valores más altos de área para los halos de oxidación en MBA o MBG fueron para los aislamientos *Byssomerulius* sp. LMB1 ($3916 \pm 154 \text{ mm}^2$) y *Pleurotus* sp. LMB2 ($2320 \pm 21 \text{ mm}^2$), respectivamente.

Los valores de los halos de oxidación obtenidos para los cuatro aislamientos de la colección LMMA-UIS en MBA son superiores en comparación a los halos de oxidación de ABTS obtenidos usando la misma técnica para los aislamientos *Hericium erinaceus* ($1472,5 \text{ mm}^2$), *Lentinus edodes* ($1527,5 \text{ mm}^2$), *Pleurotus nebrodensis* ($881,4 \text{ mm}^2$) y *Coprinus comatus* ($804,2 \text{ mm}^2$) (Fen et al., 2014). Sin embargo, los resultados observados en los halos de oxidación de MBG, son inferiores a los halos de oxidación con guayacol encontrados para los aislamientos de *Phanerochaete chrysosporium* (5672 mm^2), *Pleurotus sajor-caju* (2563 mm^2), *Pycnoporus sanguineus* (4265 mm^2), y *Phlebia radiata* (2401 mm^2) (Ang et al., 2011).

Tabla 3. Evaluación de actividad ligninolítica en placas de MB con ABTS al 0,1% y guayacol al 0,04 %.

Género	Medio	Área de Crecimiento (mm ²)	Área de oxidación (mm ²)	EE
(Control negativo)	MB	4858 ± 262	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	MBA	4144 ± 51	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0

<i>Tricoderma</i> sp. LMA12	MBG	3990 ± 78	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	MB	2872 ± 103	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
<i>Byssomerulius</i> sp. LMB1	MBA	4122 ± 95	3916 ± 154	0,95 ± 0,02
	MBG	721 ± 84	565 ± 81	0,78 ± 0,06
	MB	1508 ± 58	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
<i>Pleurotus</i> sp. LMB2	MBA	245 ± 32	3262 ± 88	13,50 ± 2,07
	MBG	851 ± 89	2320 ± 21	2,75 ± 0,28
	MB	645 ± 15	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
<i>Dictyopanus</i> <i>pusillus</i> LMB4	MBA	236 ± 21	1860 ± 46	7,92 ± 0,52
	MBG	121 ± 8	895 ± 16	7,43 ± 0,50
	MB	3404 ± 69	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
<i>Hyphodontia</i> sp. LMB7	MBA	3917 ± 26	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	MBG	138 ± 4,8	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	MB	324 ± 53	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
<i>Pleurotus</i> sp. LMB15	MBA	696 ± 49	1422 ± 46	2,05 ± 0,20
	MBG	289 ± 31	386 ± 24	1,34 ± 0,07

Nota: MB: Medio base sin sustrato, MBA: MB con ABTS 0,1 % y MBG: MB con 0,04 % Guayacol).

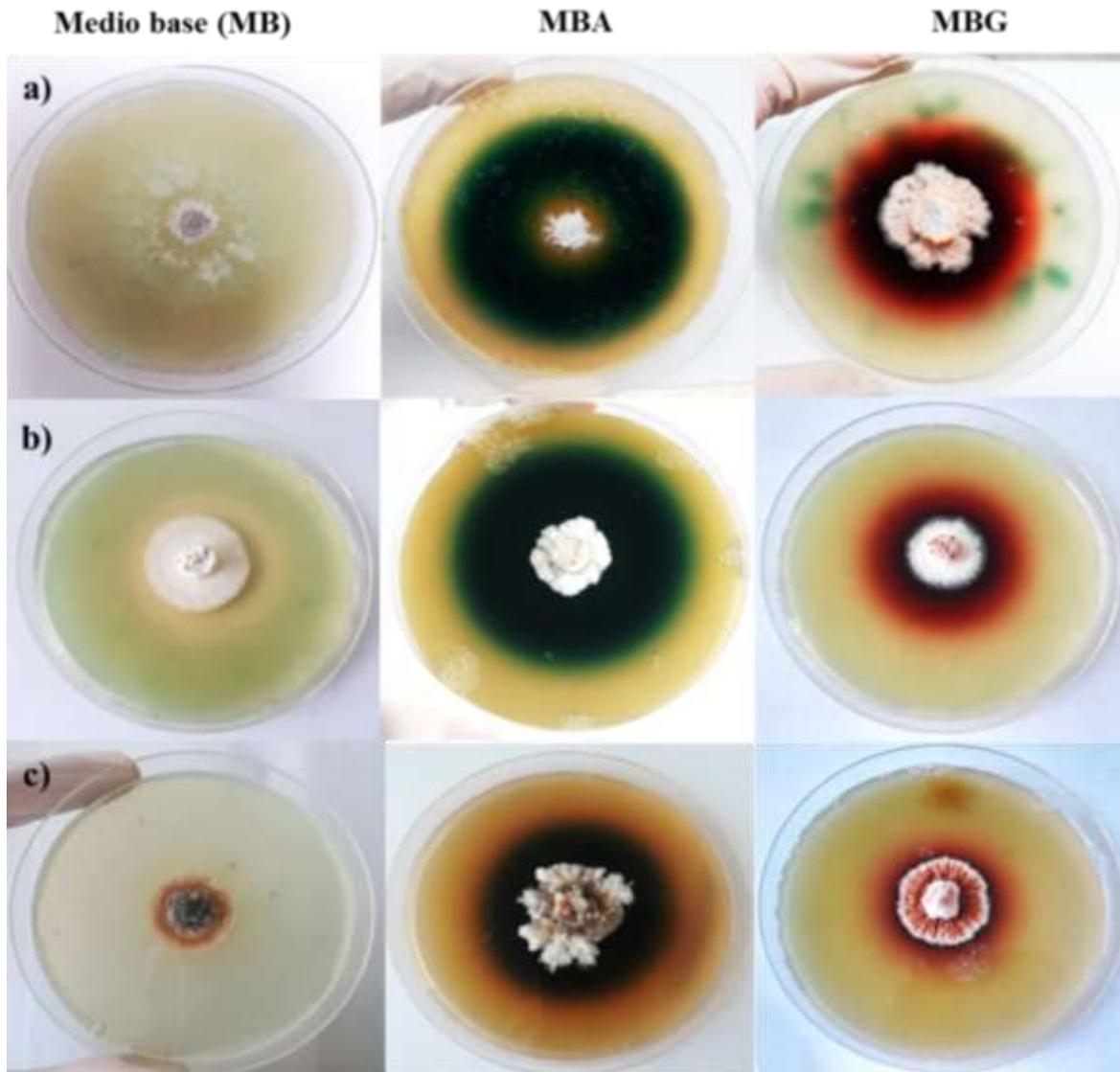
Valores medios (n=3) ± DE.

Los aislamientos de la colección LMMA-UIS mostraron actividad ligninolítica, por medio de la oxidación de ABTS y guayacol, como fue descrito para los hongos ligninolíticos de los géneros *Pleurotus* spp, *Pycnoporus* spp, *Trametes* spp, *Stereum* spp, *Trichaptum* spp, *Ganoderma* spp, *Schizophyllum comune* (Thiribhuvanamala et al., 2017), y por otros autores en el caso de *Lenzites* sp, *Daedalea elegans*, *Cymatoderma elegans*, *Dictyopanus pusillus*, *Polyporus sanguineus*, *Lentinellus* spp, *Hexagonia* sp., *Phellinus rimosus* (Chan Cupul, Heredia Abarca, & Rodríguez Vázquez, 2016).

Pleurotus sp. LMB2 (MBA:13,50 mm²) (MBG: 2,75 mm²), *Dictyopanus pusillus* LMB4 (MBA:7,92 mm²) (MBG:7,43 mm²) y *Pleurotus* sp. LMB15 (MBA: 2,05 mm²) (MBG:1,34 mm²) fueron los aislamientos que mostraron las mayores EE para la oxidación de ABTS y guayacol en MB **Tabla 6** y **Figura 17**. Basados en los resultados descritos, se seleccionaron los hongos *Pleurotus* sp. LMB2, *Dictyopanus pusillus* LMB4 y *Pleurotus* sp. LMB15 como los aislamientos

con la mayor actividad ligninolítica semicuantitativa de la colección LMMA-UIS para ser usados en el siguiente paso del proceso.

Figura 17. Evaluación de actividad ligninolítica en placa de agar.



Nota: *Pleurotus* sp. LMB2 (a), *Dictyopanus pusillus* LMB4 (b) y *Pleurotus* sp. LMB15 (c) en los tres medios de cultivo: medio de cultivo base (MB), MBA: MB con ABTS, MBG: MB con guayacol por 15 días a 25°C.

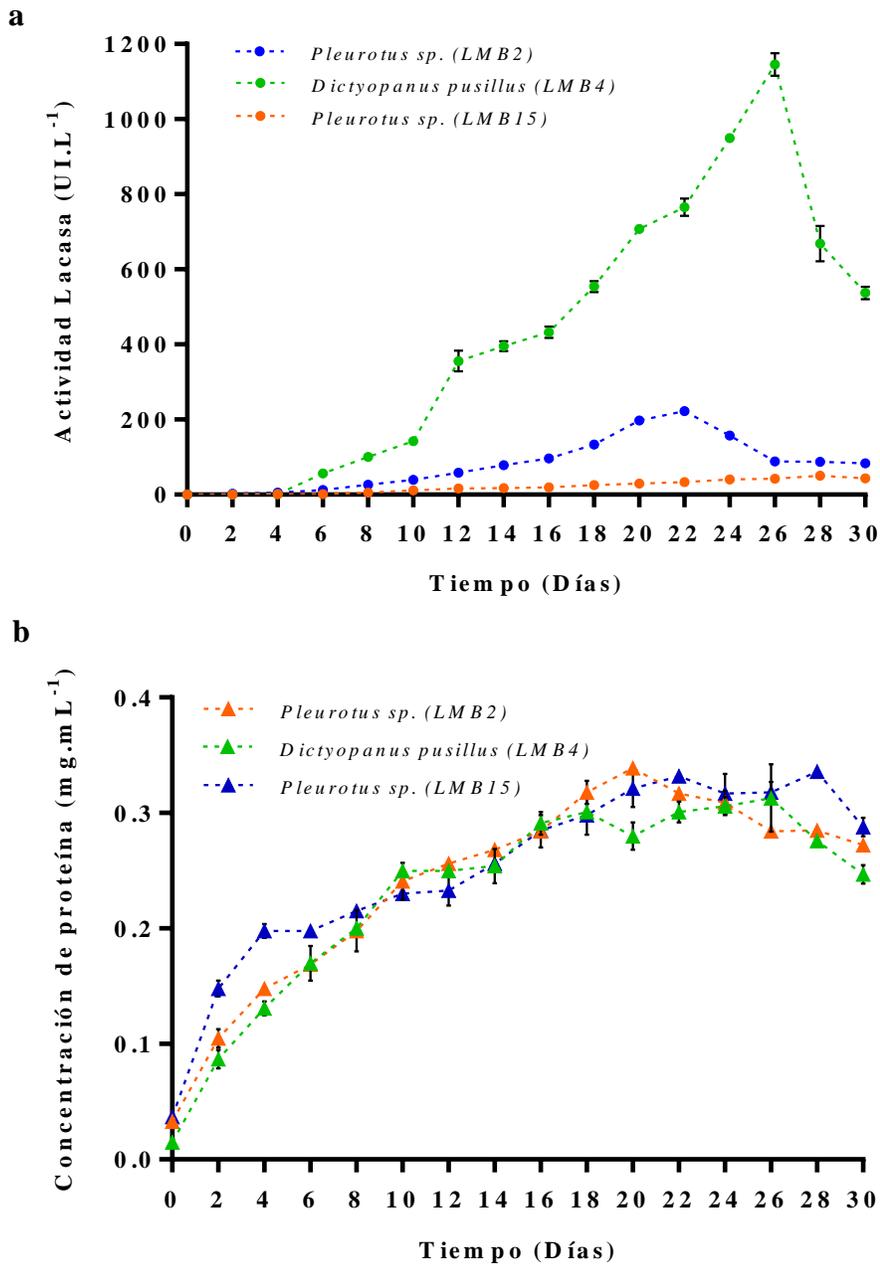
5.3. Evaluación cuantitativa de la actividad lignocelulolítica en SSF

Con el fin de evaluar cuantitativamente la actividad enzimática de los hongos seleccionados, se realizó fermentación en estado sólido (SSF), según lo descrito en la sección 4.3.1. En el extracto obtenido se cuantificaron proteínas totales y las actividades enzimáticas ligninolíticas: lacasa, manganeso peróxidasa y lignina peroxidasa y celulolíticas; endoglucanasa, celobiohidrolasa y β -glucosidasa.

Los extractos enzimáticos de *Pleurotus* sp. LMB2, *Dictyopanus pusillus* LMB4 y *Pleurotus* sp. LMB15 mostraron solamente actividad lacasa usando ABTS como sustrato. Las mayores oxidaciones de ABTS se observaron después de los 20 días de fermentación para los tres aislamientos (ver **Figura 18a**). No se detectaron actividades ligninolíticas manganeso peroxidasa y lignina peroxidasa, ni actividades celulolíticas (endoglucanasa, celobiohidrolasa y β -glucosidasa).

Las mayores actividades lacasa alcanzadas por *Pleurotus* sp LMB2 ($222,65 \pm 3,8$ UI.L⁻¹), *Dictyopanus* sp. LMB4 (1145 ± 30 UI. L⁻¹) y *Pleurotus* sp LMB15 ($50,85 \pm 1,7$ UI.L⁻¹) fueron a los 22, 26 y 28 días, respectivamente **Figura 18a**. La máxima concentración de proteína observada en las SSF fue para *Pleurotus* sp LMB2 ($0,339 \pm 0,00$ mg. mL⁻¹); *Dictyopanus pusillus* LMB4 ($0,329 \pm 0,02$ mg. mL⁻¹) y *Pleurotus* sp, LMB15 ($0,336 \pm 0,005$ mg. mL⁻¹), a los 22, 26 y 28 días, respectivamente (mismos días de la actividad lacasa máxima) (**Figura 18b**).

Figura 18. Actividad lacasa y concentración de proteína total en los extractos enzimáticos.



Nota: Actividad lacasa (a) y Proteína (b) en el extracto enzimático de *Pleurotus sp.* LMB2, *Dictyopanus pusillus* LMB4 y *Pleurotus sp.* LMB15 en fermentación en estado sólido (SSF) por 30 días usando como sustrato lignocelulosa de raquis de palma. No se detectaron actividades

celulolíticas (endoglucanasa, celobiohidrolasa y β - glucosidasa) y actividades lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa en ninguna de las cepas.

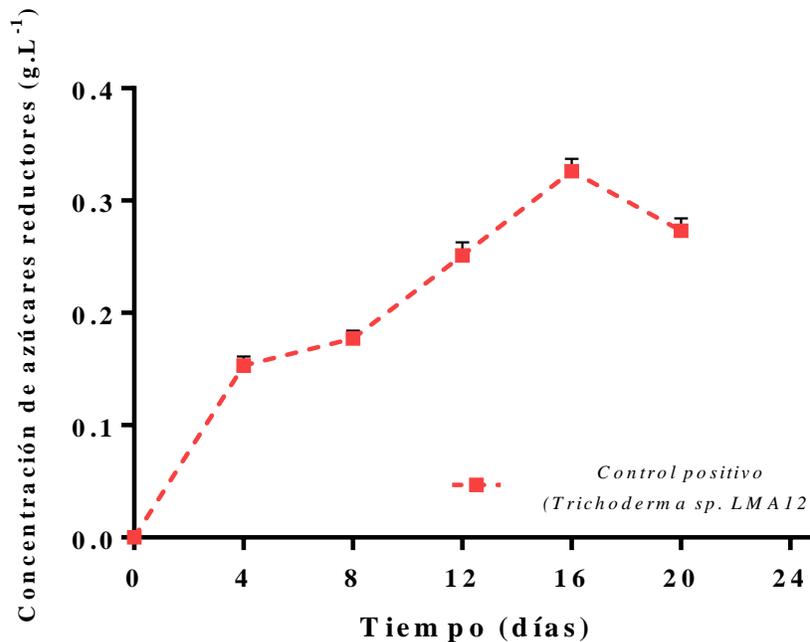
La actividad lacasa de *Pleurotus* sp LMB2 y *Pleurotus* sp LMB15 es mayor a la descrita por otros estudios donde cepas de *Pleurotus ostreatus* han obtenido actividad lacasa $4,73 \pm 0,51$ UI. mL⁻¹ y de 1,71 UI. mL⁻¹ usando salvado de trigo y residuo de banano como sustrato (Sergentani et al., 2016). Los valores de actividad lacasa obtenidos por *Dictyopanus pusillus* LMB4 son 4 veces más altos en comparación con los valores reportados previamente por (Rueda et al., 2020) para el mismo aislamiento. El aumento de la actividad lacasa estaría relacionada con la adición de ácido gálico en la SSF como inductor de la secreción de enzimas lignolíticas en hongos basidiomicetos, como ha sido reportado en los aislamientos *Oidiodendron echinulatum*, *Coriolus versicolor*, *Eichhornia crassipes* (Ming et al., 2019; Mishra et al., 2017; Wang et al., 2017).

Debido a que en la SSF con sustrato lignocelulósico no se detectaron actividades celulolíticas (endoglucanasa, celobiohidrolasa y β - glucosidasa) en el seguimiento por 30 días. Se realizó una nueva SSF con sustrato lignocelulósico hasta los 45 días para determinar si era necesario evaluar mayores tiempos de fermentación para obtener enzimas celulolíticas. Sin embargo, no se observó actividad celulolítica en ninguno de los extractos enzimáticos de *Pleurotus* sp. LMB2, *Dictyopanus pusillus* LMB4 y *Pleurotus* sp. LMB15 en el seguimiento por 45 días (datos no mostrados).

Teniendo en cuenta que se ha demostrado que los genes que codifican las enzimas celulasas son reprimidos por presencia de glucosa (Suto & Tomita, 2001). Se realizó una nueva SSF en sustrato celulósico usando la metodología descrita en la sección 4.3.1. Los extractos enzimáticos de *Pleurotus* sp. LMB2, *Dictyopanus pusillus* LMB4 y *Pleurotus* sp. LMB15 no mostraron

actividad celulolítica total en 20 días de SSF usando celulosa como sustrato (**Figura 19**). El control positivo *Trichoderma* sp LMA12 mostró actividad celulolítica total máxima a los 16 días de SSF.

Figura 19. Fermentación SSF por 24 días usando como sustrato celulosa.



Nota: La actividad celulolítica se representa en la liberación de azúcares reductores. No se detectó actividad celulolítica total en las cepas de *Pleurotus* sp. LMB2, *Dictyopanus pusillus* LMB4 y *Pleurotus* sp. LMB15, se usó como control una cepa de *Trichoderma* sp. LMA12.

La ausencia de actividad celulolítica total (endoglucanasa, celobiohidrolasa y β -glucosidasa) en los 30 días de SSF usando sustrato lignocelulósico (**Figura 18**) podría estar relacionada a la deslignificación selectiva de los hongos de la podredumbre blanca, en donde la lignina y la hemicelulosa presentes en el sustrato se degradan antes que celulosa, generándose las enzimas ligninolíticas y hemicelulolíticas en los primeros días de la fermentación (Peralta et al., 2017; Yoon et al., 2014). Por tanto, la producción de enzimas en la fermentación en sustrato sólido

(SSF) puede depender del contenido inicial de lignina, hemicelulosa y celulosa en el sustrato lignocelulósico, lo cual puede alargar los tiempos de producción de enzimas celulolíticas (Yoon et al., 2014). Sin embargo, es importante señalar que no todos los hongos basidiomicetos de la podredumbre blanca son efectivos en la producción de celulasas, se ha encontrado que *Lentinula edodes* y *Funalia trogii* producen mayor cantidad de enzimas ligninolíticas que de enzimas celulolíticas (Yoon et al., 2014). La ausencia de actividad celulolítica total (endoglucanasa, celobiohidrolasa y β -glucosidasa) en la SSF por 20 días usando celulosa (avicel® o CMC) como inductor (**Figura 19**) no garantizó la síntesis de celulasas, se ha informado que su inducción en hongos es pobre en comparación con el uso de soforosa (β -D-glucosa-[1,2]-D-glucosa), la cual genera un aumento de hasta 2.500 veces la expresión de celulasas (Gutiérrez et al., 2018)

A pesar que se ha establecido que hongos de los géneros *Phanerochaete* sp. *Trametes* sp. y *Pleurotus* sp, son excelentes productores de celulasas, en algunos estudios no se ha detectado actividad celulolítica en cepas de *Pleurotus ostreatus* y *Trametes versicolor* cultivadas en residuo lignocelulósico de orujo de tomate y tallo de sorgo (Iandolo, Piscitelli, Sannia, & Faraco, 2011).

De igual manera se ha evidenciado que las condiciones en la SSF son importantes para mejorar la producción de metabolitos en un proceso de fermentación, dado que la producción de enzimas depende de factores como: tipo de sustrato, preparación del inóculo, condiciones del proceso en la SSF (tiempo de fermentación, pH, temperatura y humedad) y medio de fermentación (fuente de carbono, nitrógeno, fósforo oligoelementos y minerales traza e inductores) (Ghazanfar, Irfan, Nadeem, & Syed, 2019; Sarsan & Merugu, 2019). Por tanto, se hace necesario optimizar estos factores para favorecer el crecimiento y secreción de enzimas celulolíticas en un proceso de fermentación usando hongos de los géneros *Pleurotus* sp. LMB2, *Dictyopanus pusillus* LMB4 y *Pleurotus* sp. LMB15 de la colección LMMA-UIS.

Debido a que no se obtuvo un extracto enzimático con actividad celulolítica con las metodologías de fermentación empleadas se utilizaron celulasas comerciales de *Trichoderma reesei* ATCC 26921 (C2730 Sigma-Aldrich) junto con el extracto enzimático de *Dictyopanus pusillus* LMB4 para el pretratamiento y sacarificación de CPH y desintoxicación de jarabes fermentables debido a que alcanzó una actividad lacasa cinco veces mayor que *Pleurotus* sp. LMB2 y veinte veces mayor que *Pleurotus* sp. LMB15.

5.4. Pretratamiento y sacarificación simultáneas de cáscara de mazorca de cacao (SPS) y desintoxicación de jarabes fermentables

5.4.1. Materia prima

La composición porcentual de lignocelulosa en la cáscara de mazorca de cacao CCN-51 fue $29,97 \pm 0,01$ % de lignina, $25,51 \pm 0,01$ % de celulosa y $21,93 \pm 0,03$ % de hemicelulosa, estas proporciones son similares a los reportados por Campos y colaboradores y Lu y colaboradores en 2018 (Campos et al., 2018; F. Lu et al., 2018). Cabe destacar que el contenido de lignina en la CPH permite evidenciar la relevancia de un pretratamiento que permita la mayor remoción de lignina y favorezca la acción de las enzimas hidrolíticas sobre los polisacáridos de celulosa y hemicelulosa presentes en la CPH para la obtención de azúcares fermentables (Taherzadeh & Karimi, 2008).

5.4.2. Efecto del pH, temperatura, concentración de cobre y enzimas lignocelulolíticas en el SPS y desintoxicación

La producción de azúcares fermentables a partir de biomasa lignocelulósica y la desintoxicación de jarabes depende de variables como: pH, temperatura, concentración de mediadores (CuSO_4) y concentración unidades enzimáticas lacasas:celulasas (S. Kumar et al., 2017; Zanirun et al., 2015). Se realizó un ANOVA para establecer el efecto de cada una de las

variables sobre el pretratamiento y sacarificación simultáneas (SPS) de cáscara de mazorca de cacao según lo descrito en la sección 4.4.2.

Las mayores concentraciones de glucosa ($4,51 \pm 0,3 \text{ g.L}^{-1}$) y azúcares reductores ($11,21 \pm 0,14 \text{ g.L}^{-1}$) por SPS usando CPH como sustrato, se obtuvieron a valores de pH de 4.0 y temperatura de 45°C , respectivamente (**Figura 20**). Se observa que a valores de pH entre 4.0 y 5.5 se favoreció la liberación de glucosa y azúcares reductores en el SPS, mientras que a pH 7.0 se observó una disminución de la concentración alcanzando $3,54 \pm 0,11 \text{ g.L}^{-1}$ y $9,43 \pm 0,20 \text{ g.L}^{-1}$ de glucosa y azúcares reductores, respectivamente (**Figura 20a**). Los valores de pH determinados concuerdan con el pH ideal para la actividad enzimática de celulasas y lacasas (Baldrian & Valášková, 2008; Manavalan, Manavalan, & Heese, 2015).

La concentración de glucosa $1,1 \pm 0,10 \text{ g.L}^{-1}$ y azúcares reductores $3,4 \pm 0,18 \text{ g.L}^{-1}$ se vio claramente comprometida durante los ensayos realizados a 60°C en comparación con las concentraciones de glucosa ($4,3 \pm 0,02 \text{ g.L}^{-1}$) y azúcares reductores ($11,2 \pm 0,14 \text{ g.L}^{-1}$) a temperaturas de 45°C (**Figura 20b**). La reducción en la concentración de azúcares puede ser consecuencia de la desnaturalización de las enzimas involucradas en el proceso de SPS (Masran et al., 2016). Adicionalmente, el aumento gradual de las unidades enzimáticas lacasas: celulasas permitió obtener una mayor concentración de glucosa ($5,21 \pm 0,2 \text{ g.L}^{-1}$) y azúcares reductores ($13,25 \pm 0,74 \text{ g.L}^{-1}$) a la mayor concentración de unidades enzimáticas empleadas ($15:30 \text{ UI.L}^{-1}:\text{UPF.mL}^{-1}$ de lacasas:celulasas) en comparación con las demás concentraciones enzimáticas evaluadas experimentalmente (**Figura 20c**). De igual manera no se observó ninguna diferencia en la obtención de glucosa y azúcares reductores a las diferentes concentraciones de CuSO_4 evaluadas (**Figura 20d**).

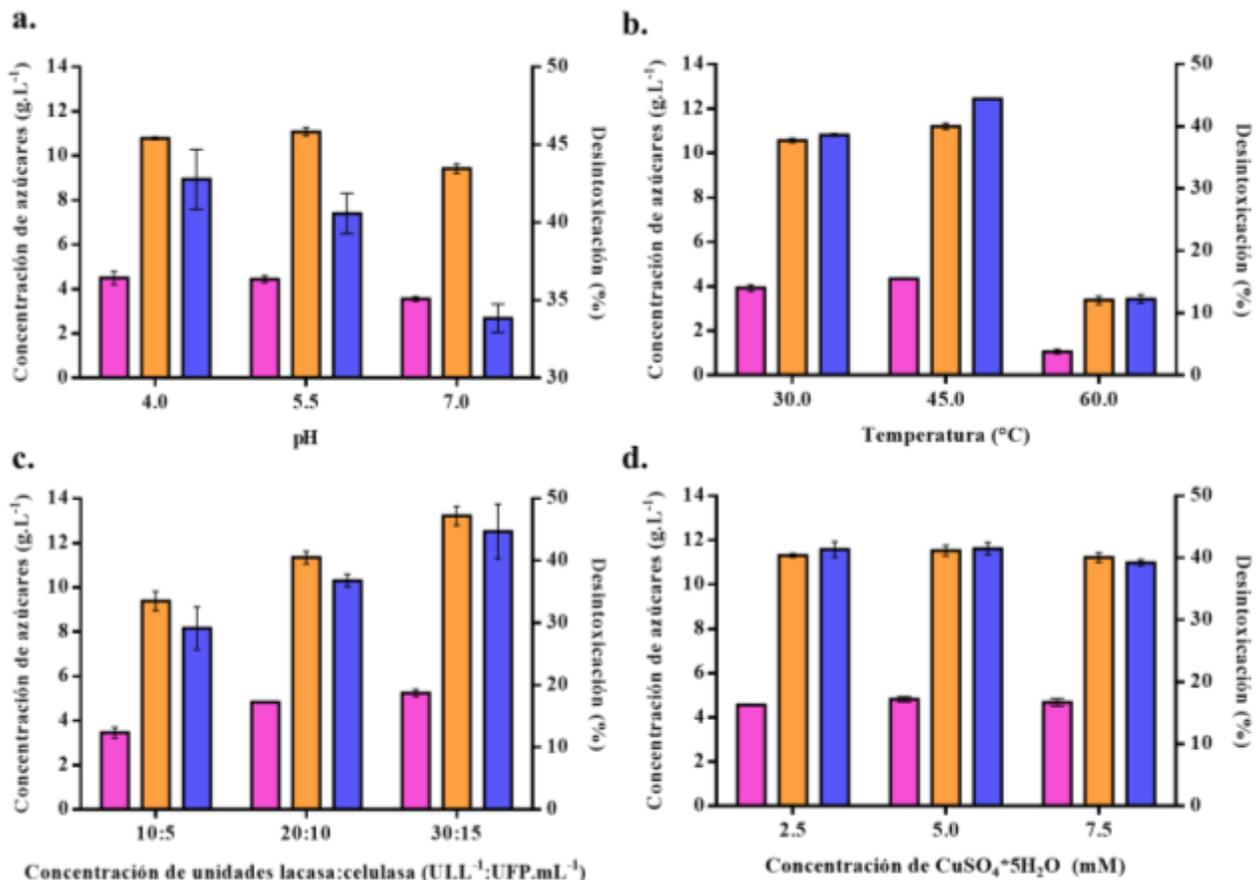
El mayor porcentaje de desintoxicación de compuestos fenólicos presentes en el jarabe fermentable ($44,7 \pm 4,4$ %), usando el extracto enzimático de *Dictyopanus pusillus* LMB4 se obtuvo a una concentración de unidades enzimáticas lacasas: celulasas de 30:15 UI.L⁻¹:UPF.mL⁻¹ (**Figura 20**). Se observa que a pH entre 4.0 y 5.5 se favoreció la desintoxicación de compuestos fenólicos, mientras que a pH de 7.0 se observó un menor porcentaje de desintoxicación con un 24,4 % (**Figura 20a**). El porcentaje de desintoxicación de compuestos fenólicos presentes en el jarabe disminuyó a temperatura de 60 °C ($12,7 \pm 0,69$ %) en comparación con la temperatura de 45 °C donde se observó un mayor porcentaje de desintoxicación ($44,4 \pm 0,052$ %) (**Figura 20b**). Los valores de pH y temperatura determinados concuerdan con el pH y temperatura ideal de las lacasas (Baldrian & Valášková, 2008; Manavalan et al., 2015) El aumento gradual de la concentración de unidades enzimáticas lacasas: celulasas permitió obtener un mayor porcentaje de desintoxicación de compuestos fenólicos ($44,7 \pm 4,4$ %) (**Figura 20c**).

El análisis estadístico realizado con *Statgraphics® Centurion XVI.I* usando la prueba de Tukey con un valor-p <0,05 y un nivel del 95,0% de confianza mostró que el efecto del pH, la temperatura y concentración de las unidades enzimáticas lacasas: celulasas es estadísticamente significativo sobre la producción de glucosa con un valor ($p= 0,0288$), ($p= 0,0001$) y ($p= 0,0036$), azúcares reductores con un valor ($p= 0,0038$), ($p= 0,0000$) y ($p= 0,0051$) y en la desintoxicación de compuestos fenólicos presentes en el jarabe con un valor ($p= 0,0173$), ($p= 0,000$) y ($p= 0,0397$), respectivamente. La concentración de cobre no fue estadísticamente significativa sobre la producción de glucosa ($p= 0,2393$) y azúcares reductores ($p= 0,3547$); así como en la desintoxicación de compuestos fenólicos presentes en el jarabe ($p= 0,1677$).

Para determinar cuáles valores medios de glucosa, azúcares reductores y porcentaje de desintoxicación de compuestos fenólicos son significativamente diferentes entre los niveles de las

variables independientes, se realizó la prueba de múltiples rangos (**Apéndice C**). Los resultados de la prueba de múltiples rangos indicaron que los pares de valores de pH (4.0 - 7.0) y (5.5-7.0) muestran diferencias significativas, siendo el rango (4.0 - 5.5) un grupo homogéneo. Adicionalmente se observaron diferencias significativas en los valores medios de glucosa y azúcares reductores y de desintoxicación de compuestos fenólicos para los pares de temperatura (30-45 °C), (45-60 °C) y (30-60 °C); y concentración de unidades enzimáticas celulasas: lacasas (10:5 y 20:10 U.I.L⁻¹:UPF.mL⁻¹), (20:10 y 30:15 U.I.L⁻¹:UPF.mL⁻¹) y (5:10 y 15:30 U.I.L⁻¹:UPF.mL⁻¹). Los pares de concentración de CuSO₄ (2,5 y 5,0) (5,0 y 7,5 mM) (2,5 y 7,5 mM) no muestran diferencias estadísticamente significativas.

Figura 20. Efecto del pH, temperatura, concentración de unidades enzimáticas y concentración de cobre CuSO₄ sobre el SPS.



Nota: Efecto del pH (a), temperatura (b), concentración de unidades enzimáticas lacasas: celulasas (c) y concentración de CuSO_4 (d) para la producción de Glucosa (barras rosas) y Azúcares reductores (barras naranjas) y la desintoxicación del jarabe (barras azules) en 144 horas, usando CPH como sustrato.

Se ha informado que la presencia de mediadores (como ABTS, guayacol, HBT (1-hidroxibenzotriazol), ácido gálico) aumentan el rendimiento en la hidrólisis y pretratamiento de lignocelulosa en comparación con el uso de las enzimas lignocelulolíticas sin mediadores, facilitando la oxidación de la lignina y facilitando la interacción de las enzimas con la matriz lignocelulosica (Zanirun et al., 2015). Basados en los resultados de la (**Figura 20d**) para el mejoramiento del proceso de SPS en la obtención y desintoxicación de jarabes fermentables a partir de CPH, se fijaron los valores de la concentración de CuSO_4 en 2,5 mM (concentración más baja empleada experimental) y el tiempo de incubación en 144 horas (tiempo en el que se estabilizó la concentración de glucosa y azúcares reductores en todas las variables independientes. **Apéndice D**)

De acuerdo a los resultados obtenidos en el ANOVA se seleccionaron las variables independientes pH, temperatura y concentración de enzimas lacasas:celulasas para el mejoramiento del proceso de SPS en la obtención y desintoxicación de jarabes fermentables a partir de CPH. Los valores establecidos para las variables independientes del diseño de experimentos de cribado 2^3 fueron: pH (4. 0, 5.0 y 6. 0), temperatura (35° , 45° , 55°C) y concentración de enzimas lacasas:celulasas (10:20, 15:30 y 20:40 U.I.L⁻¹:UPF.mL⁻¹) (**Tabla 4**) en el (**Apéndice E**) se puede observar la combinación de las variables independientes que se realizó en 27 experimentos.

Tabla 4. Variables independientes y niveles empleados en el diseño de cribado 2³.

Variables independientes	Niveles	
	-1	1
pH	4.0	6.0
Temperatura, °C	35	55
Actividad lacasa:celulasa, UI.L ⁻¹ :UPF.mL ⁻¹	20:10	40:20

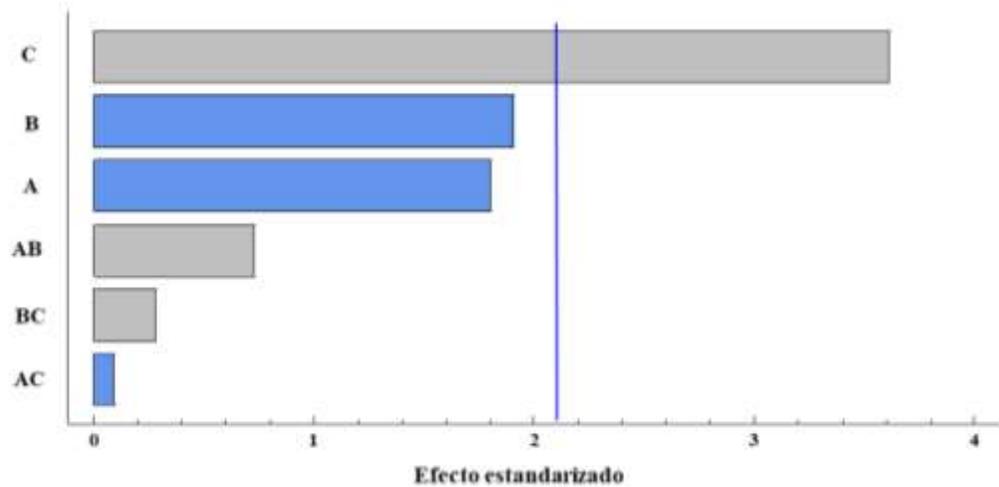
Nota: Diseño con tres variables independientes (pH, temperatura y concentración de enzimas celulasas: lacasas), dos niveles para cada variable, un punto central y tres replicas.

5.4.3. Mejoramiento de la producción y desintoxicación de jarabes fermentables

Para mejoramiento del proceso de SPS en la obtención y desintoxicación de jarabes fermentables a partir de CPH usando celulasas comerciales de *Trichoderma reesei* ATCC 26921 (C2730 Sigma-Aldrich) junto con el extracto enzimático de *Dictyopanus pusillus* LMB4, se evaluaron las variables independientes seleccionadas en la sección 4.4.3.

La combinación de las variables independientes (pH, temperatura y concentración de enzimas celulasas: lacasas) (**Apéndice E**) en el diseño de experimentos 2³ permitió determinar que el aumento en la concentración de las unidades enzimáticas de celulasas comerciales de *Trichoderma reesei* ATCC 26921 (C2730 Sigma-Aldrich®) y lacasa en el extracto de *Dictyopanus pusillus* LMB4 mostraron un efecto positivo durante el SPS y desintoxicación de jarabes. La concentración de unidades enzimáticas lacasas:celulasas fue el único efecto estadísticamente significativo con un valor- $p < 0,05$ y un nivel de confianza del 95,0%, en el diseño de experimentos de cribado para la producción de glucosa ($p = 0,0002$) y azúcares reductores ($p = 0,0001$) a partir de CPH y desintoxicación de compuestos fenólicos presentes en el jarabe ($p = 0,0080$) (**Figura 21**). Sin embargo, se cree que la significancia estadística del efecto del pH y temperatura en la producción de glucosa y azúcares reductores y en la desintoxicación pudo verse afectada por el marcado efecto positivo de la concentración de unidades enzimáticas lacasas: celulasas.

Figura 21. Gráfico de Pareto del diseño de experimentos de cribado.



Nota: La línea azul representa el umbral estadísticamente significativo con el 95% de confianza, las barras grises resaltan los efectos positivos y las barras azules los efectos negativos. A: pH, B: Temperatura y C: unidades enzimáticas lacasas: celulasas.

Para evaluar el efecto de los valores de pH y temperatura en el SPS de CPH y en la desintoxicación de jarabes, se realizó un segundo diseño experimental multinivel 4^2 , ampliando los rangos de las variables de pH (3.0 a 6.0) y temperatura (30° a 60°C) y fijando la concentración de unidades enzimáticas lacasas: celulasas a un valor de 40:20 UI.L⁻¹:UPF.mL⁻¹ (concentración más alta empleada experimentalmente en diseño de cribado) (*Tabla 5*), en el (*Apéndice E*) se puede observar la combinación de las variables independientes que se realizó en 48 experimentos. El efecto del pH y temperatura en el SPS de CPH fue significativo con un valor $p < 0,05$ y un nivel de confianza del 95,0% para aumentar la concentración de azúcares reductores y para la desintoxicación de compuestos fenólicos; pero solo el efecto de la temperatura fue significativo para aumentar la concentración de glucosa (*Figura 22*).

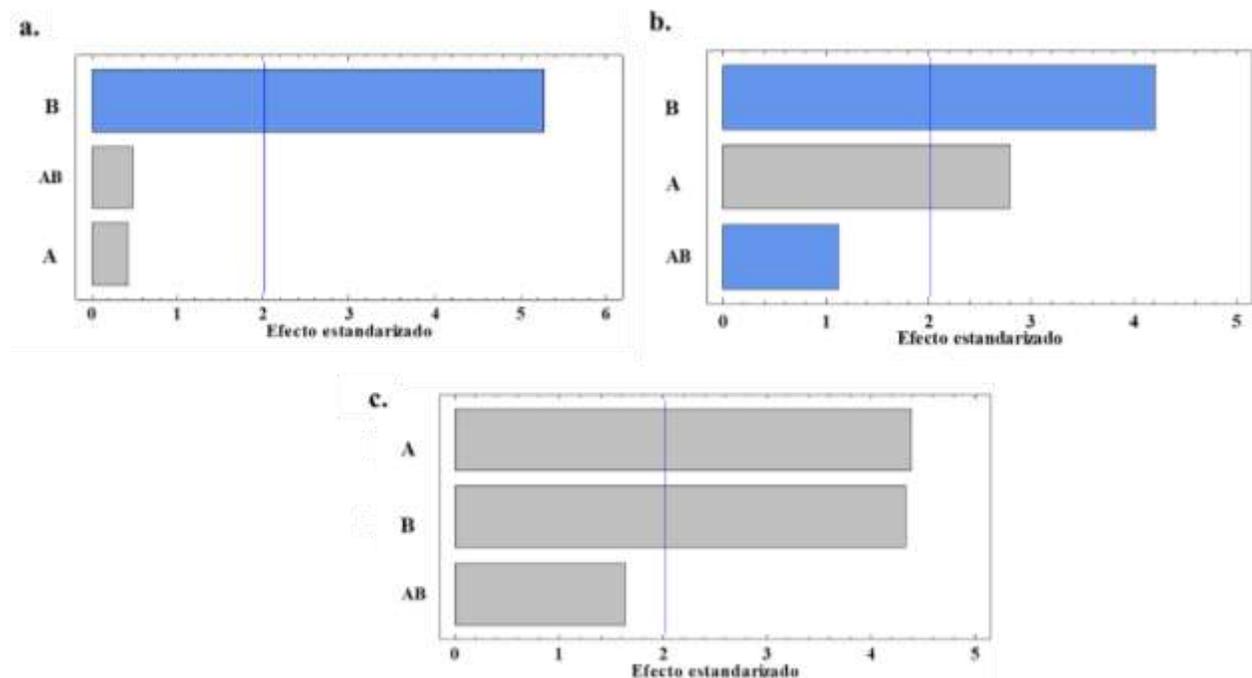
Tabla 5. Variables independientes y niveles empleados en el diseño multifactorial 4².

Factores	Niveles			
pH	3.0	4.0	5.0	6.0
Temperatura (°C)	30	40	50	60

Nota: Diseño con dos variables independientes (pH y temperatura), cuatro niveles para cada variable y tres réplicas.

En el diagrama de Pareto obtenido del diseño de multinivel 4² se observó que el aumento de pH tiene un efecto positivo y el aumento de la temperatura un efecto negativo en el SPS de CPH para la producción de azúcares fermentables. Las enzimas lignocelulolíticas tienen un mayor actividad a pH ácidos entre 3-4, sin embargo son más estables por largos periodos de tiempo a pH entre 5-7 (Manavalan et al., 2015; Rueda et al., 2020).

Figura 22. Gráfico de Pareto del diseño de experimentos multinivel.



Nota: Gráficos de Pareto las variables de respuesta glucosa (a), azúcares reductores (b) y desintoxicación de compuestos fenólicos (c) en diseño de experimentos multinivel. La línea azul

representa el umbral estadísticamente significativo con el 95% de confianza, las barras grises resaltan los efectos positivos y las barras azules los efectos negativos. A: pH, B: Temperatura.

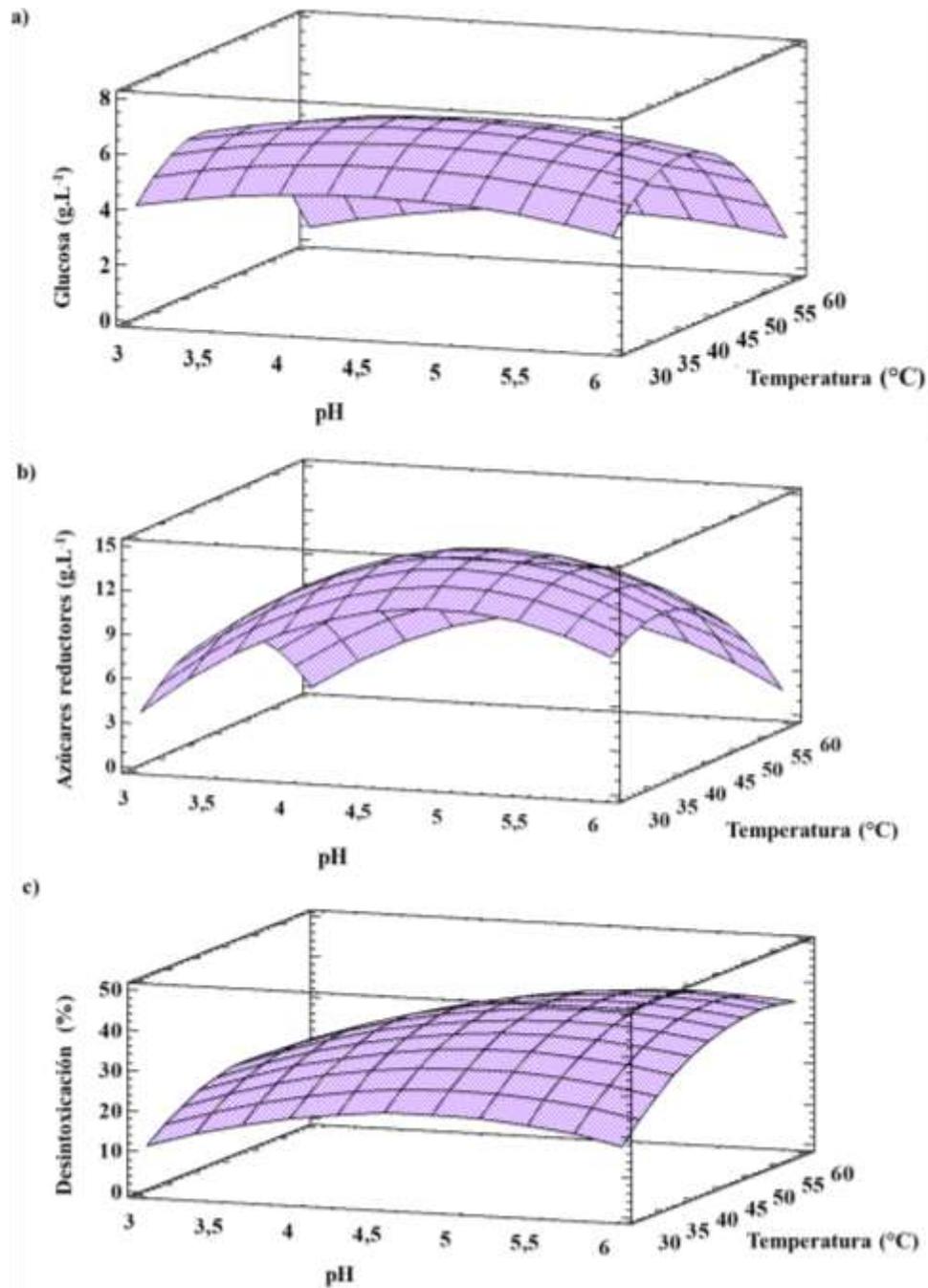
El diseño experimental multinivel 4^2 logró el mejoramiento de la producción de jarabes fermentables por SPS y la desintoxicación de compuestos fenólicos presentes en el jarabe aumentando la concentración de glucosa en un 16,5% ($6,24 \pm 0,13 \text{ g.L}^{-1}$) a un valor de pH 5.0 y temperatura de 50°C y la concentración azúcares reductores en un 2,1% ($13,53 \pm 0,36 \text{ g.L}^{-1}$), en comparación con el ANOVA (glucosa de $4,51 \pm 0,3 \text{ g.L}^{-1}$ y azúcares reductores de $11,21 \pm 0,14 \text{ g.L}^{-1}$) (sección 5.4.2). (**Figura 23**).

La evaluación de los datos por superficie de respuesta permitió calcular los valores de las variables independientes que favorecen en mayor proporción el proceso de SPS de CPH y desintoxicación de jarabes fermentables utilizando celulasas comerciales de *T. reesei* ATCC 26921 junto con el extracto enzimático con actividad lacasa de *Dictyopanus pusillus* LMB4. Los valores estimados fueron pH 4,9 y temperatura 45°C para alcanzar una concentración máxima teórica de glucosa de $6,4 \text{ g.L}^{-1}$ y de azúcares reductores de $13,3 \text{ g.L}^{-1}$ y un porcentaje de desintoxicación de jarabes de 37,2 % (**Figura 23**). Igualmente se calcularon los valores de pH y temperatura utilizando celulasas comerciales de *T. reesei* ATCC 26921 junto con lacasas comerciales de *Trametes versicolor* (38429 Sigma-Aldrich®) como control (**Apéndice F**). Los valores estimados fueron de pH 5,0 y temperatura de 41°C , para alcanzar una concentración máxima teórica de glucosa $6,32 \text{ g.L}^{-1}$ y de azúcares reductores $12,66 \text{ g.L}^{-1}$ y un porcentaje de desintoxicación de jarabes de 40,6 %.

Los valores estimados de pH y temperatura son similares a los reportados en la obtención de azúcares, a partir de residuos lignocelulósicos de bambú, maíz y paja arroz por medio de SPS, donde se obtuvieron valores de pH óptimo de 5.0 y temperaturas (54°C , 50°C y 35°C)

respectivamente para cada biomasa (Ma & Ruan, 2015; Kumar et al., 2017). La temperatura y el pH que favorecen el proceso de SPS depende de la naturaleza de las enzimas empleadas, por tanto, es importante mantener un pH y una temperatura de incubación apropiada evitando el menor grado de desnaturalización durante el proceso de pretratamiento y sacarificación, permitiendo que las enzimas implicadas en el proceso mantengan su estructura tridimensional y por lo tanto su afinidad por el sustrato y la viabilidad del sitio catalítico (Masran et al., 2016).

Figura 23. Gráficas de superficie de respuesta 3D para el SPS de cáscara de mazorca de cacao y desintoxicación de compuestos fenólicos en jarabes fermentables.



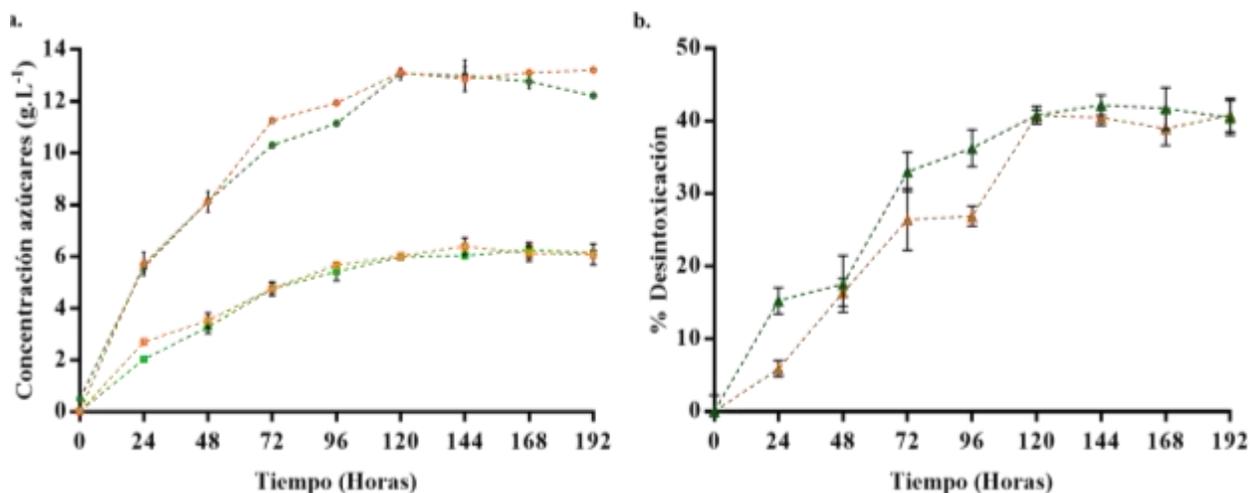
Nota: Cada gráfico en la figura representa el efecto de la interacción entre temperatura y pH de las tres variables en la respuesta concentración de glucosa (a) y concentración de azúcares reductores (b) y desintoxicación de compuestos fenólicos (c).

5.5. Producción y desintoxicación de jarabes fermentables

El modelo experimental para la producción de jarabes fermentables por SPS de CPH y desintoxicación de jarabes utilizando el extracto enzimático con actividad lacasa de *Dictyopanus pusillus* LMB4 junto con celulasas comerciales de *Trichoderma reesei* ATCC 26921 se validó en las condiciones óptimas calculadas: concentración de CuSO_4 de 2,5 mM (establecida en la sección 5.4.2), concentración de unidades enzimáticas lacasas: celulasas de 40:20 UI.L⁻¹:UPF.mL⁻¹, pH de 4,9 y temperatura 45 °C (establecidas en la sección 5.4.3).

La concentración experimental máxima obtenida de glucosa y azúcares reductores fue entre las 120 – 144 horas con una concentración de $6,4 \pm 0,33 \text{ g.L}^{-1}$ y de $13,12 \pm 0,3 \text{ g.L}^{-1}$ respectivamente (**figura 24a**). Concentraciones comparables con las obtenidas en el proceso de SPS con CPH utilizando celulasas comerciales de *T. reesei* ATCC 26921 y lacasas comerciales de *Trametes versicolor* (38429 Sigma-Aldrich®) con una concentración de glucosa de $6,04 \pm 0,10 \text{ g.L}^{-1}$ y de azúcares reductores de $13,07 \pm 0,22 \text{ g.L}^{-1}$ obtenidas entre las 120–144 horas (**figura 24a**).

El porcentaje de desintoxicación de compuestos fenólicos máximo fue a las 120 horas del proceso de SPS con un $40,80 \pm 0,75 \%$ (**figura 24b**). Porcentaje similar al obtenido en el proceso de SPS con CPH utilizando celulasas comerciales de *T. reesei* ATCC 26921 y lacasas comerciales de *Trametes versicolor* (38429 Sigma-Aldrich®) con un porcentaje de $40,80 \pm 0,74 \%$ (**figura 24b**). Las concentraciones de glucosa, azúcares reductores y el porcentaje de desintoxicación de compuestos fenólicos experimentales obtenidas en el proceso de SPS usando el extracto enzimático con actividad lacasa de *D. pusillus* LMB4 junto con celulasas comerciales de *T. reesei* ATCC 26921 fueron similares a las teóricas predichas en la sección 5.4.3.

Figura 24. Producción y desintoxicación de jarabes obtenidos por SPS de CPH.


Nota: Concentración de azúcares (a) y porcentaje de desintoxicación de compuestos fenólicos (b) presentes en los jarabes fermentables obtenidos por SPS de cáscara de mazorca de cacao usando extracto enzimático con actividad lacasa de *D. pusillus* LMB4 y celulasas comerciales de *T. reesei* ATCC 26921 (líneas naranjas) y por SPS usando lacasas comerciales de *T. versicolor* (38429 Sigma-Aldrich) y celulasas comerciales de *T. reesei* ATCC 26921 (líneas verdes). Cada gráfico en la figura muestra la concentración de glucosa (■), azúcares reductores (●) y el porcentaje de desintoxicación de compuestos fenólicos (▲).

5.5.1. Evaluación del efecto de las enzimas ligninolíticas en la producción y desintoxicación de jarabes

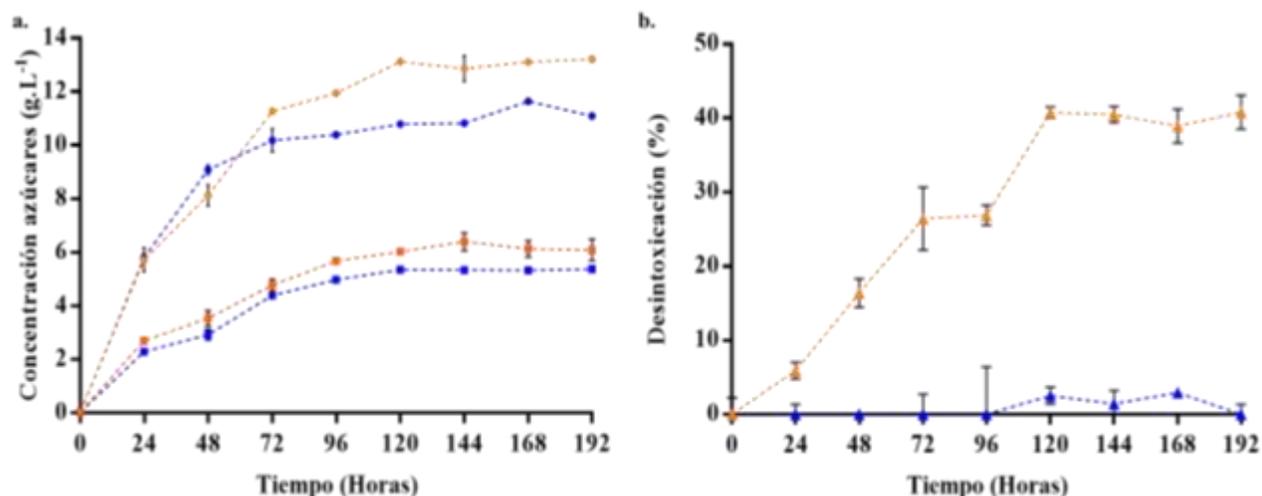
La comparación entre el SPS y la sacarificación sin pretratamiento de CPH mostró que el pretratamiento con el extracto enzimático con actividad lacasa de *Dictyopanus pusillus* LMB4 favoreció el proceso de hidrólisis de celulosa de la CPH. Las concentraciones de glucosa aumentaron un 19,56 % (pasaron de $5,34 \pm 0,01$ g.L⁻¹ a $6,39 \pm 0,33$ g.L⁻¹) y azúcares reductores aumentaron en un 21,71% (pasaron de $10,78 \pm 0,04$ g.L⁻¹ a $13,12 \pm 0,03$ g.L⁻¹) usando extracto enzimático de lacasas de *Dictyopanus pusillus* LMB4 (figura 25a). El aumento de la concentración

de azúcares por acción del pretratamiento con lacasas en el proceso de sacarificación enzimática también se observó al tratar abeto con lacasa antes de hidrólisis, mejorando la hidrólisis enzimática en un 12% y en SPS de raquis de palma con lacasas (Moilanen, Kellock, Galkin, & Viikari, 2011; Rueda et al., 2020). Esta mejoría está relacionada con la oxidación las fracciones fenólicas y no fenólicas de la lignina por acción del pretratamiento con lacasas, permitiendo que la celulosa y la hemicelulosa tengan una mayor disponibilidad para las acción de las enzimas hidrolíticas generando un aumento en la concentración de azúcares fermentables (Robak & Balcersek, 2018).

El uso de lacasas en el SPS favoreció la desintoxicación en el tiempo del $40,8 \pm 0,75$ % de los compuestos fenólicos liberados en el jarabe (por el proceso de SPS) usando extracto enzimático de lacasas de *Dictyopanus pusillus* LMB4 (**figura 25b**). El efecto de las enzimas lacasas como agentes desintoxicantes de compuestos fenólicos contenidos en los residuos lignocelulósicos, fue comprobado por Sudha y colaboradores en 2015 quienes usando una lacasa de *Tyromyces chioneus* en residuos de sauce y arroz, alcanzaron valores de eliminación de compuestos fenólicos de 49.8% y 32.6%, respectivamente (Sudha et al., 2015).

Los compuestos fenólicos como la vainillina y el siringaldehído inhiben las enzimas celulolíticas, especialmente las β -glucosidasas; mientras que el ácido ferúlico y el ácido p -cumarico las desactivan (Moreno, Ibarra, Fernández, & Ballesteros, 2012). Los compuestos fenólicos también interfieren con la función e integridad de las membranas de los microorganismos al cambiar su relación proteína-lípidos (Robak & Balcersek, 2018). El proceso de desintoxicación de compuestos fenólicos presentes en el jarabe fermentable a radicales que son menos tóxicos es un proceso beneficioso, debido a que evita la inhibición de las enzimas hidrolíticas implicadas en el proceso de sacarificación y evita el daño en la membrana de los microorganismos implicados en el proceso de fermentación para la producción final de etanol (Jönsson & Martín, 2016)

Figura 25. Producción y desintoxicación de jarabes obtenidos por SPS y sacarificación sin pretratamiento



Nota: Concentración de azúcares (a) y porcentaje de desintoxicación de compuestos fenólicos (b) presentes en los jarabes fermentables obtenidos por SPS de cáscara de mazorca de cacao usando extracto enzimático con actividad lacasa de *D. pusillus* LMB4 (líneas naranjas) y sacarificación sin pretratamiento (líneas azules). Cada gráfico en la figura muestra la concentración de glucosa (■), azúcares reductores (●) y el porcentaje de desintoxicación de compuestos fenólicos (▲).

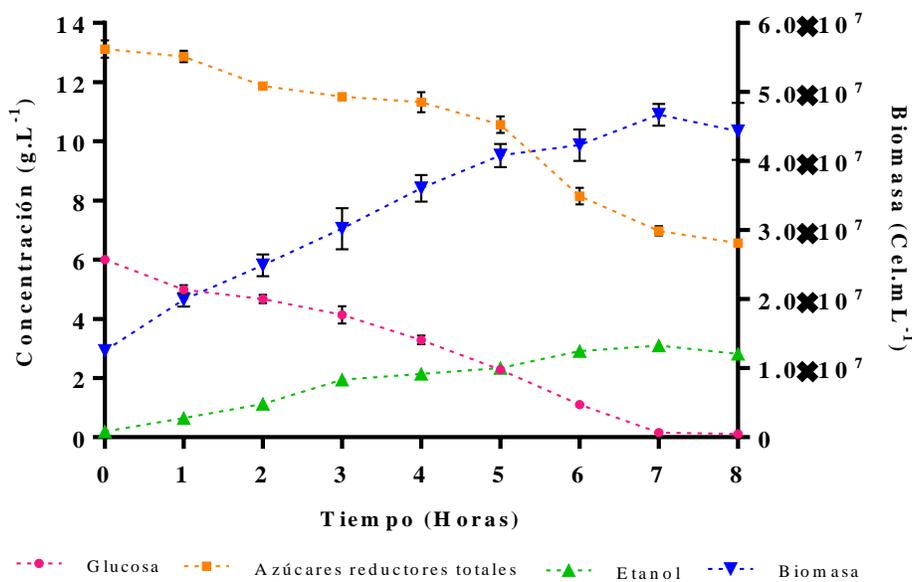
5.6 Obtención de etanol de segunda generación

5.6.1 Fermentación de jarabes obtenidos por SPS de CPH

Los jarabes provenientes de materias primas lignocelulósicas contienen azúcares que pueden ser fermentados por levaduras para la producción de etanol, sin embargo, la concentración de etanol que se obtiene depende de la concentración inicial de azúcares y la concentración de inhibidores (Zabed et al., 2017). Por tanto, el jarabe fermentable con concentración de glucosa de $6,4 \pm 0,33$ g.L⁻¹ y de azúcares reductores de $13,12 \pm 0,3$ g.L⁻¹ obtenido por SPS de cáscara de mazorca de cacao (CPH) se utilizó para obtener etanol por fermentación usando la levadura *Kluyveromyces marxianus* DSM 5418. El proceso de fermentación se describe en la sección 4.6.2.

La mayor concentración de etanol ($3,1 \pm 0,07 \text{ g. L}^{-1}$) se obtuvo a las siete horas de fermentación, coincidiendo con la disminución de las concentraciones de glucosa y azúcares reductores en un 97,4 y 46,8 %, respectivamente (**Figura 26**). Estos resultados comprueban que la producción de etanol está inversamente relacionada con la concentración de azúcares disponibles en el jarabe obtenido por SPS de CPH.

Figura 26. Fermentación alcohólica de jarabes obtenidos por SPS de CPH.



Nota: Se realizó seguimiento al proceso de fermentación tomando muestras cada hora durante 8 horas. Se cuantificó la concentración de glucosa, azúcares reductores, etanol y biomasa. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como media \pm DE.

Teniendo en cuenta que la producción de etanol y el consumo de azúcares se estabilizó en la hora 7 de fermentación, se fijó este tiempo para el ANOVA y el diseño experimental multinivel 3². El valor de pH en el jarabe (5.0) correspondió al rango utilizado por la mayoría de medios de fermentación empleados para la producción de bioetanol (4.5 a 5.5), por tanto, el control de los

valores de pH fue una variable que no se tuvo en cuenta para el proceso de optimización de producción de etanol (Mohd Azhar et al., 2017)

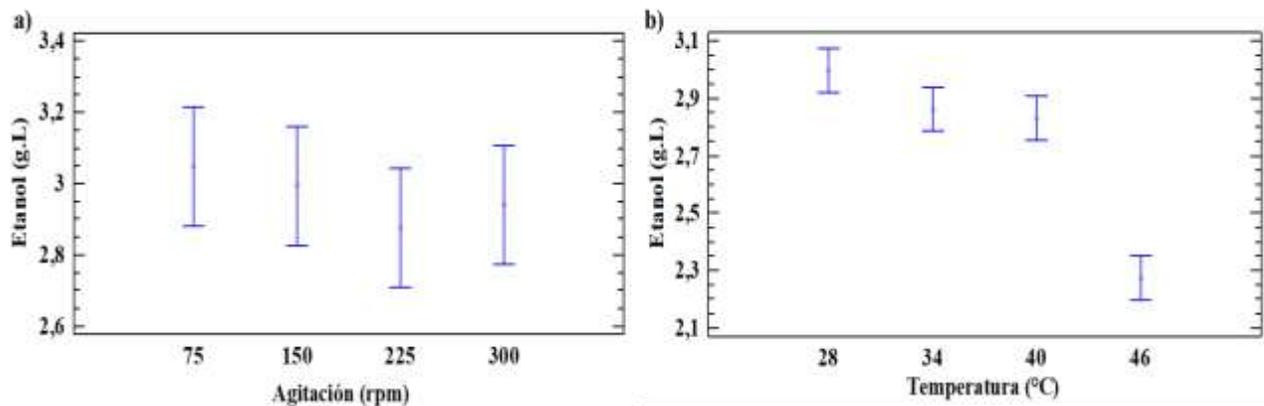
5.6.2 *Determinación de las condiciones que favorecen la obtención de etanol*

Durante la fermentación de azúcares a etanol, aproximadamente el 95% de los azúcares (que pueden ser metabolizados) se convierten en etanol y CO₂, el 1% se convierte en biomasa celular y el 4% se convierte en otros subproductos solubles (Zabed et al., 2017). Sin embargo, para que el 95 % de los azúcares se metabolicen a etanol es importante tener en cuenta variables como: i) la temperatura ya que afecta la tasa de crecimiento de la levadura y ii) la velocidad de agitación ya que afectan la permeabilidad de los nutrientes al interior de las células (Mohd Azhar et al., 2017; Taghizadeh, Motevali, & Ghobadian, 2019). Por tanto, se evaluó el efecto de estas variables en la producción de etanol por fermentación de jarabes obtenido por SPS de cáscara de mazorca de cacao (CPH) por la levadura *Kluyveromyces marxianus* DSM 5418.

La mayor concentración de etanol ($3,04 \pm 0,13$ g. L⁻¹) en el proceso de fermentación de jarabes usando la levadura *Kluyveromyces marxianus* DSM 5418 se obtuvo a 75 rpm (**Figura 27a**). Se observa una tendencia de aumento en la producción de etanol a valores de agitación más bajos (**Figura 27a**). Un aumento en la velocidad de agitación evidencia que no favorece la producción de etanol ya que causa limitación a las actividades metabólicas de las células (Mohd Azhar et al., 2017). Se observa que a temperatura de 46 °C hay una producción de etanol de $2,27 \pm 0,04$ g. L⁻¹, concentración más baja en comparación a la alcanzada a 28 °C ($3,0 \pm 0,10$ g. L⁻¹) (**Figura 27b**). Sin embargo, la capacidad de crecer y fermentar a temperaturas superiores a 40°C de la levadura *Kluyveromyces marxianus*, temperaturas cercanas a las temperaturas óptimas de la hidrólisis enzimática pueden conducir una integración de los procesos de pretratamiento, sacarificación, desintoxicación y fermentación para la producción final de etanol (Moreno et al., 2012).

El análisis estadístico realizado con *Statgraphics® Centurion XVI.I* usando la prueba de Tukey con un valor- $p < 0,05$ y un nivel del 95,0% de confianza mostró que el efecto de la temperatura es estadísticamente significativo sobre la producción de etanol con un valor $p = 0,001$. La velocidad de agitación no fue estadísticamente significativa sobre la producción de etanol ($p = 0,4443$). Para determinar cuáles valores medios de etanol son significativamente diferentes entre los niveles de las variables independientes (temperatura y velocidad de agitación), se realizó la prueba de múltiples rangos (**Figura 27**). Los resultados de la prueba de múltiples rangos indicaron que los pares de valores de temperatura (28-40 °C), (28-46 °C), (34-46 °C) y (40-46 °C) muestran diferencias estadísticamente significativas, por el contrario, el rango (34-40 °C) es grupo homogéneo sin diferencias significativas.

Figura 27. Efecto de la agitación y temperatura en la producción de etanol.



Nota: Efecto la agitación (a), temperatura (b) sobre la fermentación para la producción de etanol en 7 horas, usando jarabe obtenido por SPS de CPH como sustrato.

De acuerdo con los resultados obtenidos en el ANOVA se ampliaron los rangos de temperatura y velocidad de agitación para la producción de etanol por fermentación de jarabes usando la levadura *Kluyveromyces marxianus* DSM 5418 en el diseño de experimentos multinivel

3² (**Tabla 6**) En el (**Apéndice E**) se puede observar la combinación de las variables independientes que se realizó en 27 experimentos.

Tabla 6. Variables independientes y niveles empleados en el diseño multifactorial 3².

Factores	Niveles		
Temperatura (°C)	28	42	56
Agitación (rpm)	0	150	300

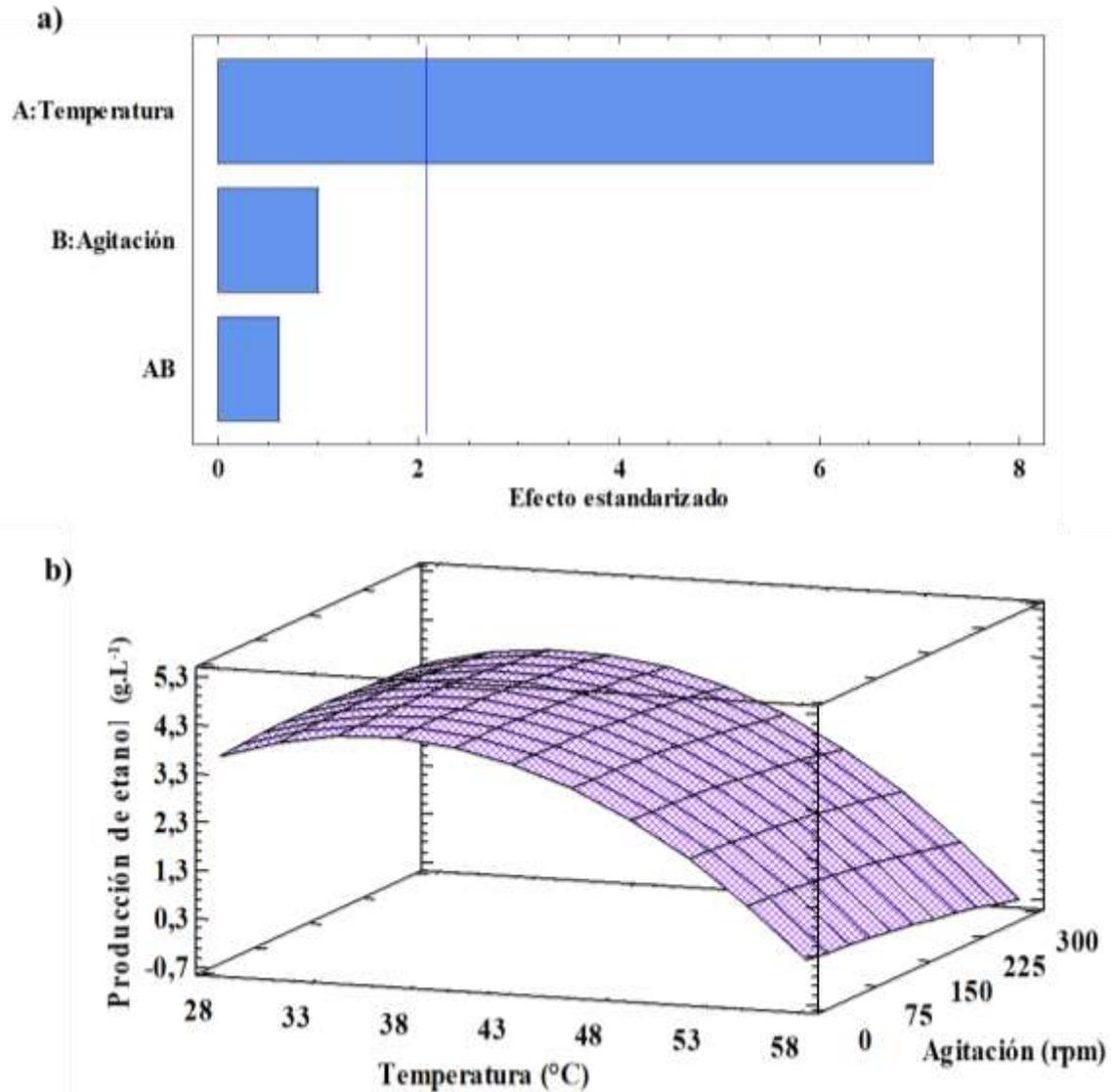
Nota: Diseño con dos variables independientes (Temperatura y agitación), para cada variable y tres réplicas.

En el diagrama de Pareto obtenido del diseño de multinivel 3² se observó que el aumento de la temperatura y la velocidad de agitación tienen un efecto negativo en el proceso de fermentación de jarabes usando la levadura *K. marxianus* DSM 5418 SPS de CPH. Sin embargo, la temperatura fue la única variable que ejerció un efecto significativo con un valor $p < 0,05$ y un nivel de confianza del 95,0% para aumentar la concentración de etanol (**Figura 28a**). El efecto negativo que genera el aumento de la temperatura en la producción de etanol es resultado del estrés osmótico al que se somete la levadura, además de generar un efecto directo sobre las proteínas celulares llevando a la desnaturalización de los ribosomas y algunas enzimas esenciales (implicadas en la generación de energía o etanol), creando alteración en la fluidez de las membranas (Zabed et al., 2017).

La evaluación de los resultados por medio de la superficie de respuesta permitió calcular los valores de las variables independientes para el proceso de fermentación de jarabes obtenidos por SPS de CPH. Los valores estimados fueron agitación de 55 rpm y temperatura de 36 °C para alcanzar una concentración máxima teórica de etanol de 4,23 g.L⁻¹ (**Figura 28b**). Los valores estimados de temperatura son similares a estudios previos de optimización de la producción de bioetanol a partir de residuo de suero utilizando *Kluyveromyces marxianus* estos estudios

mostraron una temperatura óptima de 34 °C y 37 °C (Diniz, Rodrigues, Fietto, Passos, & Silveira, 2014; Murari, Machado, Schuina, & Del Bianchi, 2019)

Figura 28. Gráfica de Pareto y superficie de respuesta de pH y temperatura para producción de etanol por fermentación de jarabes usando la levadura *K. marxianus* DSM 5418.



Nota: Gráfica de Pareto (a), La línea azul representa el umbral estadísticamente significativo con el 95% de confianza, las barras grises resaltan los efectos positivos y las barras azules los efectos negativos. Superficie de respuesta (b), las gráficas representan el efecto de la interacción entre

temperatura y agitación para la producción de etanol por fermentación de jarabes usando la levadura *K. marxianus* DSM 5418.

5.6.3 Validación de las condiciones teóricas óptimas de fermentación

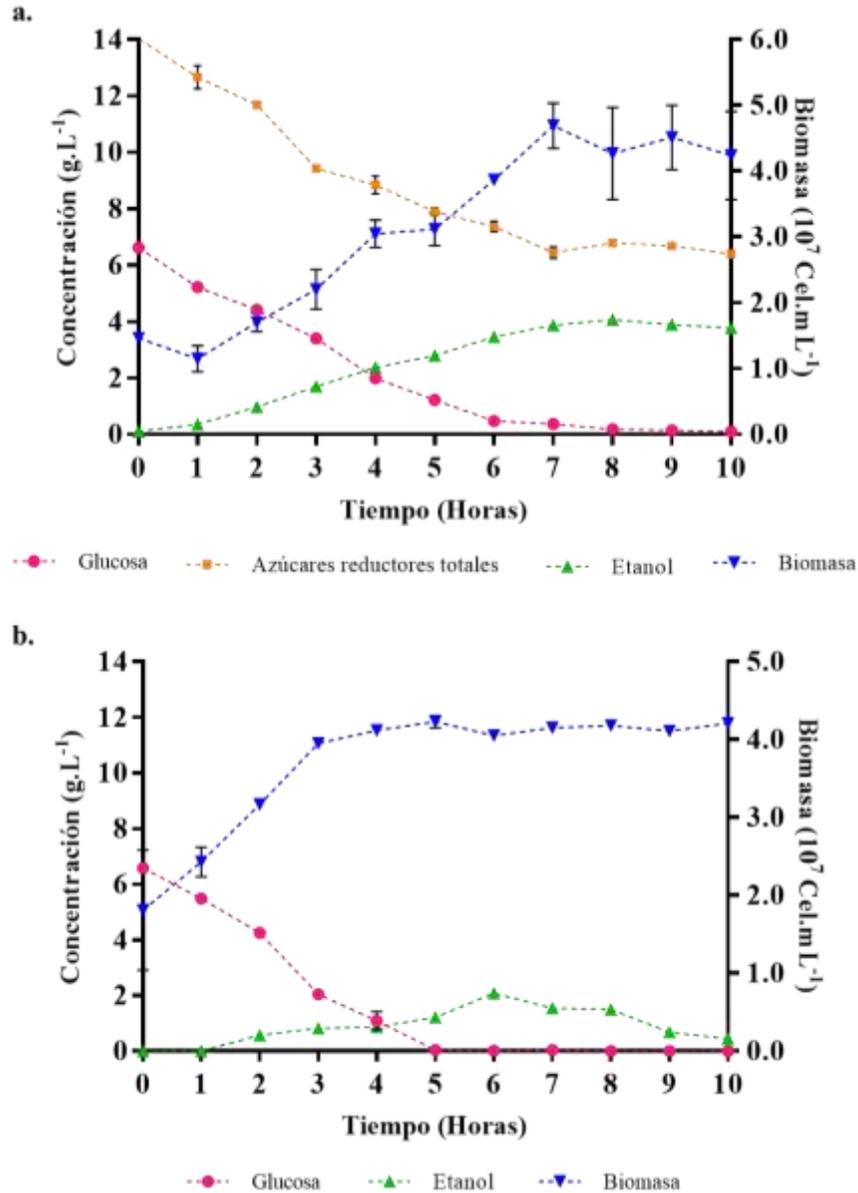
El modelo experimental para la producción de etanol por fermentación de jarabes obtenidos por SPS de CPH y desintoxicación de jarabes utilizando el extracto enzimático con actividad lacasa de *Dictyopanus pusillus* LMB4 junto con celulasas comerciales de *Trichoderma reesei* ATCC 26921 se validó en las condiciones teóricas calculadas: agitación de 55 rpm y temperatura de 36 °C (establecida en la sección 5.6.2).

La concentración experimental máxima obtenida de etanol fue entre las 7-9 horas con una concentración de máxima de $4,1 \pm 0,05 \text{ g. L}^{-1}$ (rendimiento de 63,25 %) a las 8 horas de fermentación. De igual manera la glucosa y los azúcares reductores se consumieron en un 97,2 % y 51,62 %, respectivamente al mismo tiempo de fermentación (**figura 29a**). La concentración de etanol experimental obtenida fue similar a la teórica predicha en la sección 5.6.2. Por tanto, el diseño experimental multinivel 3^2 logró el mejoramiento del proceso de fermentación de jarabes obtenidos por SPS de CPH aumentado un 32,25 % la concentración de etanol y un 10,23 % el rendimiento en comparación con el ensayo inicial (Etanol de $3,1 \pm 0,07 \text{ g. L}^{-1}$, rendimiento de 53,01 %) (sección 3.6.1).

La concentración de etanol ($2,08 \pm 0,03 \text{ g.L}^{-1}$) obtenida en la fermentación usando medio control (MCS) suplementado con la misma concentración de glucosa inicial del jarabe es dos veces menor a la concentración obtenida en la fermentación usando jarabes obtenidos por SPS de CPH ($4,1 \pm 0,05 \text{ g. L}^{-1}$) (**figura 29b**). Esto puede ser generado por: i) la única fuente de carbono disponible para la fermentación en el medio MCS es la glucosa. ii) El hidrolizado de lignocelulosa de cáscara de mazorca de cacao podría tener compuestos solubles entre ellos ácido cítrico y ácido

acético, este último reportado por su capacidad de aumentar el rendimiento en la producción de etanol en una concentración de 20 mM (Greetham, Hart, & Tucker, 2016). iii) El hidrolizado de lignocelulosa también podría tener compuestos como grasas y nitrógeno provenientes de la CPH; compuestos que pueden favorecer el metabolismo celular de la levadura y en la producción de etanol. Debido a que no fueron caracterizados los azúcares reductores y otros compuestos solubles presentes en el jarabe, no es posible determinar si existen otros compuestos o azúcares además de la glucosa que puedan ser metabolizados por la levadura para la producción de etanol.

Figura 29. Fermentación alcohólica de jarabes y medio control a condiciones óptimas calculadas.



Nota: Fermentación alcohólica de jarabes obtenidos por SPS de CPH a condiciones óptimas calculadas (agitación de 55 rpm y temperatura de 36 °C) (a). Fermentación alcohólica en medio control suplementado con la misma concentración de glucosa inicial del jarabe (b). Se realizó seguimiento al proceso de fermentación tomando muestras cada hora durante 10 horas. Se observa el consumo de azúcares, concentración de etanol y formación de biomasa. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como media ± DE.

6. Conclusiones

Las cepas de la colección LMMA-UIS *Pleurotus* sp. LMB2, *Dictyopanus pusillus* LMB4 y *Pleurotus* sp. LMB15 tienen potencial para secretar un complejo enzimático lignocelulolítico con capacidad de hidrolizar carboximetilcelulosa y oxidar guayacol y ABTS.

El extracto enzimático de *Dictyopanus pusillus* LMB4 obtenido por SSF mostró la mayor actividad lignolítica lacasa (1145 ± 30 U.I.L⁻¹) a los 26 días de fermentación. Las actividades ligninolíticas; manganeso peroxidasa y lignina peroxidasa y actividad celulolítica; endoglucanasa, celobiohidrolasa y β - glucosidasa no pudieron ser detectadas por las metodologías planteadas para las cepas de *Pleurotus* sp. LMB2, *Dictyopanus pusillus* LMB4 y *Pleurotus* sp. LMB15.

Durante el desarrollo de esta investigación se obtuvo un jarabe fermentable por pretratamiento y sacarificación simultáneos de cáscara de mazorca de cacao usando el extracto enzimático con actividad ligninolítica lacasa de *Dictyopanus pusillus* LMB4 junto con celulasas comerciales de *Trichoderma reesei* ATCC 26921 (C2730 Sigma-Aldrich®). Las condiciones óptimas para la producción de jarabes fermentables fueron: concentración de CuSO₄ de 2,5 mM, concentración de unidades enzimáticas lacasas y celulasas de 30:15 U.I.L⁻¹:UPF.mL⁻¹, pH de 5,0 y temperatura 45 °C. Con estas condiciones se obtuvo una concentración de de glucosa de $6,4 \pm 0,33$ g.L⁻¹, azúcares reductores totales de $13,12 \pm 0,3$ g.L⁻¹.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que el extracto enzimático con actividad lignocelulolítica lacasa de *Dictyopanus pusillus* LMB4 tiene potencial para el pretratamiento y sacarificación de residuos lignocelulósicos de cáscara de mazorca de cacao y desintoxicación de compuestos fenólicos presentes en los jarabes fermentables, aumentando la concentración de

glucosa y azúcares reductores en un 19,56 % y 21,71% respectivamente y disminuyendo la concentración de compuestos fenólicos un $40,8 \pm 0,75$ % en comparación con la sacarificación sin pretratamiento.

Es posible obtener etanol a partir de hidrolizados lignocelulósicos de cáscara de mazorca de cacao, en las condiciones óptimas calculadas: agitación de 55 rpm y temperatura de 36 °C para obtener una concentración final de etanol de $4,1 \pm 0,05$.

7. Recomendaciones

Para investigaciones afines se recomienda:

Optimizar la fermentación en estado sólido mediante el uso de diferentes sustratos lignocelulósicos, fuentes de carbono, nitrógeno, fósforo, oligoelementos, minerales traza e inductores que favorezcan la producción y excreción de enzimas ligninocelulolíticas manganeso peroxidasa, lignina peroxidasa, endoglucanasa celobiohidrolasa, β -glucosidasa.

Cuantificar y caracterizar los azúcares obtenidos por pretratamiento y sacarificación simultánea de cáscara de mazorca de cacao, para conocer los tipos de azúcares disponibles para su fermentación y de esta manera determinar el rendimiento del proceso.

Utilizar otros mediadores además del CuSO_4 para mejorar la eficiencia del proceso de pretratamiento en la eliminación y modificación de lignina y así aumentar la producción de azúcares fermentables durante la hidrólisis de celulosa.

8. Divulgación

Modalidad: Poster en 41st Symposium of biotechnology for fuels and chemicals.

Fecha y lugar: Ciudad Seattle, Washington Estados Unidos, 26 de abril a 03 de mayo del 2019.

Producto: Native basidiomycete fungi screening for future production of enzymatic cocktails to be used in simultaneous pretreatment and saccharification of cocoa shells lignocellulosic biomass.

Modalidad: Artículo científico sometido a la revista Crops and Products

Producto: Basidiomycete fungi screening and ligninolytic enzymatic extracts production for pretreatment and saccharification of cacao pod husk (*Theobroma cacao* L.)

Autores: Yarileny Castellanos Villamizar; Andrés M. Rueda; Inés Hernández Celia; Clara I. Sánchez and Daniel Molina V

Estado: Sometido

Referencias bibliográficas

- Abaide, E. R., Ugalde, G., Di Luccio, M., Moreira, R. de F. P. M., Tres, M. V., Zabet, G. L., & Mazutti, M. A. (2019). Obtaining fermentable sugars and bioproducts from rice husks by subcritical water hydrolysis in a semi-continuous mode. *Bioresource Technology*, 272(September 2018), 510–520. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.10.075>
- Acosta, N., Vrieze, J. De, Sandoval, V., Sinche, D., & Wierinck, I. (2018). Cocoa residues as viable biomass for renewable energy production through anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, 265(March), 568–572. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.05.100>
- Alemawor, F., Dzogbefia, V. P., Oddoye, E. O. K., & Oldham, J. H. (2009). Effect of *Pleurotus ostreatus* fermentation on cocoa pod husk composition : Influence of fermentation period and Mn²⁺ supplementation on the fermentation process. *African Journal of Biotechnology*, 8(9), 1950–1958.
- Alfarra, H. Y., Hasali, N. H. M., & Omar, M. N. (2013). *A lignolytic Fungi with Laccase Activity Isolated from Malaysian local Environment for Phytochemical Transformation Purposes* (Vol. 2).
- Althuri, A., Gujjala, L. K. S., & Banerjee, R. (2017). Partially consolidated bioprocessing of mixed lignocellulosic feedstocks for ethanol production. *Bioresource Technology*, 245(June), 530–539. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.140>
- Ang, T. N., Ngoh, G. C., Seak, A., & Chua, M. (2011). A quantitative method for fungal ligninolytic enzyme. *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering*, 6(May 2010), 589–595. <https://doi.org/10.1002/apj>

- Avanthi, A., & Banerjee, R. (2016). A strategic laccase mediated lignin degradation of lignocellulosic feedstocks for ethanol production. *Industrial Crops and Products*, 92, 174–185. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.08.009>
- Baldrian, P., & Valášková, V. (2008). Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(3), 501–521. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00106.x>
- Balladares, C., Chóez, I., García, J., Sosa, D., & Pérez, S. (2016). Physicochemical characterization of *Theobroma cacao* L. sweatings in Ecuadorian coast. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 28(10), 741–745. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2016-02-187>
- Banerjee, R., Devi, A., & Ray, S. (2017). A cleaner and eco-friendly bioprocess for enhancing reducing sugar production from pineapple leaf waste. *Journal of Cleaner Production*, 149, 387–395. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.02.088>
- Barreto, J. A. R., & Anaguano, A. H. (2014). Evaluación del crecimiento y compatibilidad de hongos de la podredumbre blanca. *Ciencia En Desarrollo*, 5(2), 197–205.
- Behera, B. C., Sethi, B. K., Mishra, R. R., Dutta, S. K., & Thatoi, H. N. (2017). Microbial cellulases – Diversity & biotechnology with reference to mangrove environment : A review. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(1), 197–210. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2016.12.001>
- Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 254, 248–254.

Brondz, I. (2014). Classification of the Basidiomycota. In *Encyclopedia of Food Microbiology* (Second Edi, Vol. 2). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00139-7>

Browning, B. . (1967). *Methods of Wood Chemistry*.

Campos, R., Nieto, K. H., & Oomah, B. D. (2018). Cocoa (*Theobroma cacao* L .) pod husk : Renewable source of bioactive compounds. *Trends in Food Science & Technology*, 81(September), 172–184. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.09.022>

Chan Cupul, W., Heredia Abarca, G. P., & Rodríguez Vázquez, R. (2016). Aislamiento y evaluación de la actividad enzimática ligninolítica de macromicetos del estado de Veracruz, México. *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*, 32(3), 339–351. <https://doi.org/10.20937/RICA.2016.32.03.08>

Chen, H., Liu, J., Chang, X., Chen, D., Xue, Y., Liu, P., ... Han, S. (2017). A review on the pretreatment of lignocellulose for high-value chemicals. *Fuel Processing Technology*, 160, 196–206. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2016.12.007>

Coniglio, R. O., Fonseca, M. I., Villalba, L. L., & Zapata, P. D. (2017). Screening of new secretory cellulases from different supernatants of white rot fungi from Misiones, Argentina. *Mycology*, 8(1), 1–10. <https://doi.org/10.1080/21501203.2016.1267047>

Corre, M. A., Lorenci, A., Carlos, W., Soccol, R., & Rigon, M. (2016). Production of Cellulases by *Phanerochaete* sp . Using Empty Fruit Bunches of Palm (EFB) as Substrate : Optimization and Scale-Up of Process in Bubble Column and Stirred Tank Bioreactors (STR). *Waste and Biomass Valorization*, 7(6), 1327–1337. <https://doi.org/10.1007/s12649-016-9503-7>

Davies, G., & Henrissat, B. (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, 3(9), 853–859. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(01\)00220-9](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00220-9)

Deswal, D., Khasa, Y. P., & Kuhad, R. C. (2011). Bioresource Technology Optimization of cellulase production by a brown rot fungus *Fomitopsis* sp . RCK2010 under solid state fermentation. *Bioresource Technology*, 102(10), 6065–6072. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.032>

Diniz, R. H. S., Rodrigues, M. Q. R. B., Fietto, L. G., Passos, F. M. L., & Silveira, W. B. (2014). Optimizing and validating the production of ethanol from cheese whey permeate by *Kluyveromyces marxianus* UFV-3. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(2), 111–117. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2013.09.002>

Doria, E., Altobelli, E., Girometta, C., Nielsen, E., Zhang, T., & Savino, E. (2014). Evaluation of lignocellulolytic activities of ten fungal species able to degrade poplar wood. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 94, 160–166. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.07.016>

FAOSTAT (2020). Food and agriculture organization. Recuperado de <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QD>

Fen, L., Xuwei, Z., Nanyi, L., Puyu, Z., Shuang, Z., Xue, Z., ... Haiping, L. (2014). Screening of Lignocellulose-Degrading Superior Mushroom Strains and Determination of Their CMCase and Laccase Activity. *The Scientific World Journal*, 2014, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2014/763108>

Gardes, M., & Bruns, T. D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes -

application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2(2), 113–118.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x>

Gerena, F. (2015). OBTENCIÓN DE JARABES AZUCARADOS A PARTIR DE LA DRÓLISIS QUÍMICA DE RESIDUOS DE CÁSCARAS DE NARANJA (*Citrus sinensis* l var valencia) Y PAPA (*Solanum tuberosum*) variedad Diacol capiro (R-12) PARA SER EMPLEADOS COMO EDULCORANTES EN LA INDUSTRIA DE ALIMENTOS. *Ingeniería y Ciencia*, ISSN-e 1794-9165, Vol. 11, Nº. 22, 2015, Págs. 151-172, 11(22), 151–172.
<https://doi.org/10.17230/ingciencia.10.19.5>

Ghazanfar, M., Irfan, M., Nadeem, M., & Syed, Q. (2019). Role of bioprocess parameters to improve cellulase production: Part I. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: From Cellulose to Cellulase: Strategies to Improve Biofuel Production*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64223-3.00005-9>

Ghose, T. K. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*, 59(2).
<https://doi.org/10.1351/pac198759020257>

Greetham, D., Hart, A. J., & Tucker, G. A. (2016). Presence of low concentrations of acetic acid improves yeast tolerance to hydroxymethylfurfural (HMF) and furfural. *Biomass and Bioenergy*, 85, 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.11.026>

Gutiérrez, I., Moreno, N., & Montoya, D. (2018). Mecanismos y regulación de la hidrólisis enzimática de celulosa en hongos filamentosos : casos clásicos y nuevos modelos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 32(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2013.10.009>

Hailei, W., Ping, L., Yuhua, Y., & Yufeng, L. (2015). Overproduction of laccase from a newly

isolated *Ganoderma lucidum* using the municipal food waste as main carbon and nitrogen supplement. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 38(5), 957–966.

<https://doi.org/10.1007/s00449-014-1341-z>

Hernández, I. (2015). Hidrólisis enzimática de subproductos lignocelulósicos generados durante el beneficio de la palma aceitera para la obtención de jarabes fermentables (Vol. 151).

<https://doi.org/10.1145/3132847.3132886>

Houfani, A. A., Anders, N., Spiess, A. C., Baldrian, P., & Benallaoua, S. (2020). Insights from enzymatic degradation of cellulose and hemicellulose to fermentable sugars– a review.

Biomass and Bioenergy, 134(January 2019), 105481.

<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105481>

Howard, R. L., Abotsi, E., Jansen Van Rensburg, E. ., & Howard, S. (2003). Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *African Journal of Biotechnology*, 2(December), 602–619.

Hull, P. (2010). Glucose Syrup Manufacture. *Glucose Syrups*, 19–44.

<https://doi.org/10.1002/9781444314748.ch3>

Iandolo, D., Piscitelli, A., Sannia, G., & Faraco, V. (2011). Enzyme production by solid substrate fermentation of *pleurotus ostreatus* and *trametes versicolor* on tomato pomace. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 163(1), 40–51. <https://doi.org/10.1007/s12010-010-9014-0>

Irbe, I., Elisashvili, V., Asatiani, M. D., Janberga, A., Andersone, I., Andersons, B., ... Grinins, J. (2014). Lignocellulolytic activity of *Coniophora puteana* and *Trametes versicolor* in fermentation of wheat bran and decay of hydrothermally modified hardwoods. *International*

Biodeterioration and Biodegradation, 86, 71–78. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.06.027>

Izzo, A. D., & Mazzola, M. (2009). Hybridization of an ITS-based macroarray with ITS community probes for characterization of complex communities of fungi and fungal-like protists. *Mycological Research*, 113(6–7), 802–812. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2008.11.020>

Janusz, G., Pawlik, A., Sulej, J., Świdorska-Burek, U., Jarosz-Wilkolazka, A., & Paszczyński, A. (2017). Lignin degradation: Microorganisms, enzymes involved, genomes analysis and evolution. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(6), 941–962. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux049>

Järvinen, J., Taskila, S., Isomäki, R., & Ojamo, H. (2012). Screening of white-rot fungi manganese peroxidases : a comparison between the specific activities of the enzyme from different native producers. *AMB Express a Springer Open Journal*, 2, 1–9. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-2-62>

Johannes, C., & Majcherczyk, A. (2000). Laccase activity tests and laccase inhibitors. *Journal of Biotechnology*, 78, 193–199.

Jönsson, L. J., Alriksson, B., & Nilvebrant, N. O. (2013). Bioconversion of lignocellulose: Inhibitors and detoxification. *Biotechnology for Biofuels*, 6(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-16>

Jönsson, L. J., & Martín, C. (2016). Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresource Technology*, 199, 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.009>

- Juturu, V., & Wu, J. C. (2014). Microbial cellulases: Engineering, production and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *33*, 188–203. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.01.077>
- Kajita, S., Sugawara, S., Miyazaki, Y., Nakamura, M., Katayama, Y., Shishido, K., & Iimura, Y. (2004). Overproduction of recombinant laccase using a homologous expression system in *Coriolus versicolor*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *66*(2), 194–199. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1663-x>
- Khindaria, A., Grover, T. A., & Aust, S. D. (1995). Evidence for Formation of the Veratryl Alcohol Cation Radical by Lignin Peroxidase. *American Chemical Society*, *34*, 6020–6025.
- Kobakhidze, A., Asatiani, M., Kachlishvili, E., & Elisashvili, V. (2016). Induction and catabolite repression of cellulase and xylanase synthesis in the selected white-rot basidiomycetes. *Annals of Agrarian Sciences*, *14*(3), 169–176. <https://doi.org/10.1016/j.aasci.2016.07.001>
- Kumar, & Chandra, R. (2020). Ligninolytic enzymes and its mechanisms for degradation of lignocellulosic waste in environment. *Heliyon*, *6*(2), e03170. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03170>
- Kumar, S., Gujjala, L. K. S., & Banerjee, R. (2017). Simultaneous pretreatment and saccharification of bamboo for biobutanol production. *Industrial Crops and Products*, *101*, 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.02.028>
- Kumar, V., Duc, D., Dharmaraja, J., & Shobana, S. (2018). A review on lignin structure , pretreatments , fermentation reactions and biorefinery potential. *Bioresource Technology*, (September), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.070>

- Kumari, D., & Singh, R. (2018). Pretreatment of lignocellulosic wastes for biofuel production: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 90(March), 877–891. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.03.111>
- Li, S., Tang, B., Liu, Y., Chen, A., Tang, W., & Wei, S. (2016). High-level production and characterization of laccase from a newly isolated fungus *Trametes* sp. LS-10C. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 8(October), 278–285. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.10.008>
- Lourenço, A., Gominho, J., Curt, M. D., Revilla, E., Villar, J. C., Pereira, H., ... Pereira, H. (2016). Steam explosion as pre-treatment of *Cynara cardunculus* prior to delignification. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.6b03854>
- Lu, F., Rodriguez, J., Damme, I. Van, Westwood, N. J., Shaw, L., Robinson, J. S., ... Charalampopoulos, D. (2018). Valorisation strategies for cocoa pod husk and its fractions. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 14, 80–88. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2018.07.007>
- Lu, W., Wang, H., Yang, S., Wang, Z., & Nie, Y. (2005). *Isolation and characterization of mesophilic cellulose-degrading bacteria from flower stalks-vegetable waste co-composting system*. 360, 353–360.
- Macfarlane, C., Warren, C. R., White, D. A., & Adams, A. (1999). A rapid and simple method for processing wood to crude cellulose for analysis of stable carbon isotopes in tree rings. *Tree Physiology*, 19, 831–835.
- Madhavan, N. T., Patel, K. G., Vyas, T. K., & Ganesh, S. (2017). Exploring Microbes for their

Cellulolytic and Lignolytic Enzyme Activity for Manure Preparation. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(12), 3808–3816.

Manavalan, T., Manavalan, A., & Heese, K. (2015). Characterization of Lignocellulolytic Enzymes from White-Rot Fungi. *Current Microbiology*, 70(4), 485–498. <https://doi.org/10.1007/s00284-014-0743-0>

Mandels, M., & Reese, E. T. (1956). *Induction of Cellulase in Trichoderma Viride as Influenced by Carbon Sources and Metals*. (1941), 269–278.

Mandels, M., & Weber, J. (1969). The Production of Cellulases. *American Chemical Society*, 391–414.

Mansur, D., Tago, T., Masuda, T., & Abimanyu, H. (2014). Conversion of cacao pod husks by pyrolysis and catalytic reaction to produce useful chemicals. *Biomass and Bioenergy*, 66, 275–285. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.03.065>

Masran, R., Zanirun, Z., Bahrin, E. K., Ibrahim, M. F., Lai Yee, P., & Abd-Aziz, S. (2016). Harnessing the potential of ligninolytic enzymes for lignocellulosic biomass pretreatment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(12), 5231–5246. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7545-1>

Mcdonald, J. E., Rooks, D. J., & Mccarthy, A. J. (2012). Methods for the Isolation of Cellulose-Degrading Microorganisms. In *Cellulases* (1st ed., Vol. 510). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415931-0.00019-7>

Miller, G. L. (1959). User of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar.

Analytical Chemistry, 31(3), 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>

Ming, C., Dilokpimol, A., Zou, C., Liao, W., Zhao, L., Wang, M., ... Kang, Y. (2019). The quest for fungal strains and their co-culture potential to improve enzymatic degradation of Chinese distillers' grain and other agricultural wastes. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 144(November 2018), 104765. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2019.104765>

Mishra, V., Jana, A. K., Jana, M. M., & Gupta, A. (2017). Enhancement in multiple lignolytic enzymes production for optimized lignin degradation and selectivity in fungal pretreatment of sweet sorghum bagasse. *Bioresource Technology*, 236, 49–59. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.148>

Mohd Azhar, S. H., Abdulla, R., Jambo, S. A., Marbawi, H., Gansau, J. A., Mohd Faik, A. A., & Rodrigues, K. F. (2017). Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 10(November 2016), 52–61. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.03.003>

Moilanen, U., Kellock, M., Galkin, S., & Viikari, L. (2011). The laccase-catalyzed modification of lignin for enzymatic hydrolysis. *Enzyme and Microbial Technology*, 49(6–7), 492–498. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2011.09.012>

Moreno, A., Ibarra, D., Ballesteros, I., Fernández, J., & Ballesteros, M. (2013). Ethanol from laccase-detoxified lignocellulose by the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* — Effects of steam pretreatment conditions, process configurations and substrate loadings. *Biochemical Engineering Journal*, 79, 94–103. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.07.006>

Moreno, A., Ibarra, D., Fernández, J. L., & Ballesteros, M. (2012). Different laccase detoxification

strategies for ethanol production from lignocellulosic biomass by the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. *Bioresource Technology*, 106, 101–109. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.108>

Murari, C. S., Machado, W. R. C., Schuina, G. L., & Del Bianchi, V. L. (2019). Optimization of bioethanol production from cheese whey using *Kluyveromyces marxianus* URM 7404. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 20(May), 101182. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101182>

Nazir, N., Novelina, Juita, E., Amelia, C., & Fatli, R. (2016). Optimization of pre-treatment process of cocoa pod husk using various chemical solvents. *International Journal on Advanced Science, Engineering and Information Technology*, 6(3), 403–409. <https://doi.org/10.18517/ijaseit.6.3.848>

Okiyama, D. C. G., Navarro, S. L. B., & Rodrigues, C. E. C. (2017). Cocoa shell and its compounds : Applications in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 63, 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.03.007>

OlugbengaOlufemi, A., & Sanjo Oyetuji, O. (2015). Optimization of Bioethanol production from Cocoa (*Theobroma cacao*) Bean Shell. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(4), 506–514.

Panchapakesan, A., & Shankar, N. (2016). Fungal Cellulases : An Overview. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63507-5/00002-2>

Peralta, R. M., Polacchine, B., Carvalho, R., Côrrea, G., & Kato, C. G. (2017). Enzymes from

- Basidiomycetes — Peculiar and Efficient Tools for Biotechnology. In *Biotechnology of Microbial Enzymes*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803725-6.00005-4>
- Percival, Z. Y. H., Hong, J., & Ye, X. (2009). Cellulase Assays. *Biofuels: Methods and Protocols*, 581, 213–231. <https://doi.org/10.1007/978-1-60761-214-8>
- Pollegioni, L., Tonin, F., & Rosini, E. (2015). Lignin-degrading enzymes. *FEBS Journal*, 282(7), 1190–1213. <https://doi.org/10.1111/febs.13224>
- Prajapati, B. P., Kumar Suryawanshi, R., Agrawal, S., Ghosh, M., & Kango, N. (2018). Characterization of cellulase from *Aspergillus tubingensis* NKBP-55 for generation of fermentable sugars from agricultural residues. *Bioresource Technology*, 250(December 2017), 733–740. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.11.099>
- Rabinovich, M. L., Melnick, M. S., & Bolobova, A. V. (2002). The Structure and Mechanism of Action of Proteolytic Enzymes. *Biochemistry*, 67(8), 850–871. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4831-9710-4.50010-6>
- Raj, A., Kumar, S., Haq, I., & Kumar, S. (2014). Bioremediation and toxicity reduction in pulp and paper mill effluent by newly isolated ligninolytic *Paenibacillus* sp . *Ecological Engineering*, 71, 355–362. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2014.07.002>
- Rastogi, M., & Shrivastava, S. (2017). Recent advances in second generation bioethanol production: An insight to pretreatment, saccharification and fermentation processes. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 80(January), 330–340. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.225>

- Robak, K., & Balcerek, M. (2018). *Review of Second Generation Bioethanol Production from Residual Biomass*. 56(2), 0–3. <https://doi.org/10.17113/ftb.56.02.18.5428>
- Rueda, A. M., Lopez de los Santos, Y., Vincent, A. T., Létourneau, M., Hernández, I., Sánchez, C. I., ... Ospina, S. A. (2020). Genome sequencing and functional characterization of a *Dictyopanus pusillus* fungal extract offers a promising alternative for lignocellulose pretreatment of oil palm residues. *Plos One*, 1–29.
- Samah, O. A., Sias, S., Hua, Y. G., & Hussin, N. N. (2011). *Production of Ethanol from Cocoa Pod Hydrolysate*. 43(2), 87–94.
- Sánchez. (2009). Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*, 27, 185–194. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.11.001>
- Sánchez, J. C., Benavides, J., Heredia, J. B., Cisneros-Zevallos, L., & Jacobo-Velázquez, D. A. (2013). The Folin-Ciocalteu assay revisited: Improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Analytical Methods*, 5(21), 5990–5999. <https://doi.org/10.1039/c3ay41125g>
- Sarsaiya, S., Awasthi, S. K., Awasthi, M. K., Awasthi, A. K., Mishra, S., & Chen, J. (2018). The dynamic of cellulase activity of fungi inhabiting organic municipal solid waste. *Bioresource Technology*, 251(October 2017), 411–415. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.12.011>
- Sarsan, S., & Merugu, R. (2019). Role of Bioprocess Parameters to Improve Cellulase Production: Part II. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-64223-3.00006-0>

Scheller, H. V., & Ulvskov, P. (2010). Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology*, 61(1), 263–289. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112315>

Schmidt, J. E., & Thomsen, S. T. (2014). Compositional analysis and projected biofuel potentials from common West African agricultural residues. *Biomass and Bioenergy*, 3, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.01.045>

Schülein, M. (2000). Protein engineering of cellulases. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1543(2), 239–252. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(00\)00247-8](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(00)00247-8)

Seo, H. beom, Kim, H., Lee, O., Ha, J., Lee, H., & Kyung, hwan J. (2009). Measurement of ethanol concentration using solvent extraction and dichromate oxidation and its application to bioethanol production process. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 36, 285–292. <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0497-4>

Sergentani, A. G., Gonou-Zagou, Z., Kapsanaki-Gotsi, E., & Hatzinikolaou, D. G. (2016). Lignocellulose degradation potential of Basidiomycota from Thrace (NE Greece). *International Biodeterioration and Biodegradation*, 114, 268–277. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.07.004>

Sherpa, K. C., Ghangrekar, M. M., & Banerjee, R. (2018). A green and sustainable approach on statistical optimization of laccase mediated delignification of sugarcane tops for enhanced saccharification. *Journal of Environmental Management*, 217, 700–709. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.04.008>

Sidhu, A. K., Darade, S. B., Bhavsar, P. P., Gaikwad, V. B., & Patil, S. N. (2017). Isolation ,

Screening and Optimization for Laccase production by *Scytalidium lignicola* pesante under submerged fermentation. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(4), 2477–2491.

Silveira, M. H. L., Rau, M., Pinto Da Silva Bon, E., & Andreus, J. (2012). A simple and fast method for the determination of endo- and exo-cellulase activity in cellulase preparations using filter paper. *Enzyme and Microbial Technology*, 51(5), 280–285. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2012.07.010>

Simpson, B. K., & Oldham, J. H. (1984). Enzymatic Hydrolysis of Cocoa Pod Husks. *Biotechnology and Bioengineering*, 26, 807–810.

Singleton, V., Orthofer, R., & Lamuela, R. (1999). Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods in Enzymology*, 25(199), 561. <https://doi.org/10.1007/BF02530903>

Sudha, S., Haw, J., Kalyani, D., Kalia, V. C., Chan, Y., & Lee, J. (2015). Bioresource Technology Simultaneous pretreatment and saccharification : Green technology for enhanced sugar yields from biomass using a fungal consortium. *BIORESOURCETECHNOLOGY*, 179, 50–57. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.059>

Sun, Y., & Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production : a review q. *Bioresource Technology*, 83, 1–11.

Suto, M., & Tomita, F. (2001). Induction and catabolite repression mechanisms of cellulase in fungi. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92(4), 305–311. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(01\)80231-0](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(01)80231-0)

Taghizadeh, A., Motevali, A., & Ghobadian, B. (2019). Ethanol production from date wastes: Adapted technologies, challenges, and global potential. *Renewable Energy*, *143*, 1094–1110.

<https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.05.048>

Taherzadeh, M. J., & Karimi, K. (2008). *Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production : A Review*. <https://doi.org/10.3390/ijms9091621>

Tappi. (2002). *Acid-insoluble Lignin in Wood and Pulp USA*. 3–7.

Taylor, T. ., Krings, M., & Taylor, E. . (2015). *Fossil Fungi*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387731-4.00009-8>

Teather, R. M., & Wood, P. J. (1982). *Use of Congo Red-Polysaccharide Interactions in Enumeration and Characterization of Cellulolytic Bacteria from the Bovine Rument*. *43*(4), 777–780.

Thiribhuvanamala, G., Kalaiselvi, G., Parthasarathy, S., Madhavan, S., & Prakasam, V. (2017). Extracellular secretion of lignocellulolytic enzymes by diverse white rot basidiomycetes fungi. *Annals of Phytomedicine: An International Journal*, *VI*(I), 20–29. <https://doi.org/10.21276/ap.2017.6.1.4>

U.S Department of energy Office of Science. (2005). *Genomics: GRL Roadmap: Systems biology for energy and environment*. Retrieved from https://genomicscience.energy.gov/roadmap/pdf/GenomicsGTL_Roadmap.pdf

Wang, Z., Liu, J., Ning, Y., Liao, X., & Jia, Y. (2017). *Eichhornia crassipes*: Agro-waster for a novel thermostable laccase production by *Pycnoporus sanguineus* SYBC-L1. *Journal of*

Bioscience and Bioengineering, 123(2), 163–169.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.09.005>

Wong, D. W. S. (2009). Structure and Action Mechanism of Ligninolytic Enzymes. *Appl Biochem Biotechnol*, 157, 174–209. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8279-z>

Xu, X., Lin, M., Zang, Q., & Shi, S. (2018). Solid state bioconversion of lignocellulosic residues by *Inonotus obliquus* for production of cellulolytic enzymes and saccharification. *Bioresource Technology*, 247(July 2017), 88–95.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.192>

Yoon, L. W., Ang, T. N., Ngoh, G. C., Seak, A., & Chua, M. (2014). ScienceDirect Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production. *Biomass and Bioenergy*, 67, 319–338. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.05.013>

Zabed, H., Sahu, J. N., Suely, A., Boyce, A. N., & Faruq, G. (2017). Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 71(December 2016), 475–501.
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.12.076>

Zanirun, Z., Bahrin, E. K., Lai-Yee, P., Hassan, M. A., & Abd-Aziz, S. (2015). Enhancement of fermentable sugars production from oil palm empty fruit bunch by ligninolytic enzymes mediator system. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 105, 13–20.
<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.08.010>

Apéndices

Apéndice A. Cuantificación de actividades enzimáticas lignocelulolíticas

Actividad celulolítica total se realizó en tubos de 20 mL que contenían 500 μ L del extracto enzimático, 1 mL de buffer citrato (50 mMol a pH 4.8) y 50 mg papel de filtro Whatman No. 1 (1 cm x 6 cm) como sustrato (Deswal et al., 2011; Ghose, 1987). La mezcla se incubó durante 60 minutos a 50°C y se evaluó la capacidad de liberar azúcares reductores. Los azúcares reductores totales se cuantificaron por el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS), empleando glucosa como patrón y la lectura se realizó en microplaca usando un espectrofotómetro UV-VIS a 540 nm (Fen et al., 2014; Miller, 1959; Percival, Hong, & Ye, 2009). La actividad celulolítica total se describió en términos de unidades de papel de filtro (UPF) por mililitro de solución de enzima. (Percival et al., 2009; Silveira, Rau, Pinto Da Silva Bon, & Andreus, 2012). Celulasas comerciales de *Trichoderma reesei* ATCC 26921 (C2730 Sigma-Aldrich) fueron usadas como control de la medición de la actividad enzimática. Para determinar las actividades endoglucanasa EG, celobiohidrolasa CBH y β - glucosidasa se usó como sustrato carboximetilcelulosa, avicel y 4-Nitrofenil - β - D-glucopiranososa (pNPG) respectivamente (Percival et al., 2009). La variable de respuesta para EG y CBH fue la liberación de azúcares reductores totales cuantificada por el método de DNS (Ghose, 1987) y para β - glucosidasa la liberación de *p*-nitrofenil cuantificado en espectrofotómetro a 430 nm (Percival et al., 2009).

La actividad lacasa se determinó por medio de la oxidación de ABTS, la reacción consistió en la mezcla de 150 μ L de buffer acetato pH 4,5 (50 mM), 40 μ L del extracto enzimático y 10 μ L de ABTS, las lecturas se realizaron en espectrofotómetro de microplacas a 415 nm con coeficiente de extinción molar, $\epsilon = 36.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y se calculó usando la **Ecuación 3** (Johannes & Majcherczyk, 2000). La actividad manganeso peroxidasa (MnP) se determinó por medio de la

oxidación de Mn^{2+} a Mn^{3+} . Se añadieron 100 μ L de buffer citrato pH 4,5 mM (50 mM), 40 μ L de $MnSO_4$ (0,8 mM), 20 μ L del extracto enzimático y la reacción se inició añadiendo 40 μ L de H_2O_2 (0,8 mM) fresco, las lecturas se realizaron en espectrofotómetro de microplacas a 270 nm con coeficiente de extinción molar $\epsilon = 22.000 M^{-1} cm^{-1}$ y se calculó usando la **Ecuación 3** (Järvinen, Taskila, Isomäki, & Ojamo, 2012). La actividad lignina peroxidasa (LiP) se midió mediante la oxidación del alcohol 3,4-dimetoxibencílico (VA) a veratril aldehído (VAD), la mezcla de reacción consistió en 100 μ L de buffer citrato pH 3 (20 mM), 40 μ L ml de alcohol veratrílico (10 mM), 20 μ l del extracto enzimático; la reacción se inició al añadir 40 μ L de peróxido de hidrógeno (0.8 mM), las lecturas se realizaron en espectrofotómetro de microplacas a 310 nm con coeficiente de extinción molar $\epsilon = 9.300 M^{-1} cm^{-1}$ y se calculó usando la **Ecuación 3** (Khindaria, Grover, & Aust, 1995; Xu et al., 2018). Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que conduce a la oxidación de 1 μ mol de sustrato por minuto (Doria et al., 2014). Las lecturas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro UV-VIS marca Thermo Fisher Multiskan™ GO. Lacasa comercial de *Trametes versicolor* (38429 Sigma-Aldrich), lignina peroxidasa (42603 Sigma-Aldrich) y manganeso peroxidasa (9314 Sigma-Aldrich), fueron usadas como control de la medición de las actividades enzimáticas.

Ecuación 3

$$Actividad\ lignolítica = \left(\frac{\mu mol}{min \times L} \right) = \left(\frac{\Delta ABS \times Vt \times fd}{t \times E \times L \times Vm} \right)$$

Donde, ΔABS es la lectura de absorbancia final – absorbancia inicial, Vt es el volumen total de reacción (mL), fd es el factor de dilución, t es el tiempo de medición (min), E es el coeficiente de extinción molar del sustrato, L es la longitud del pozo (cm), Vm es el volumen de la muestra (mL)

Apéndice B. Cuantificación de proteína, glucosa, azúcares reductores, compuestos fenólicos y etanol

Cuantificación de proteínas: La concentración de proteína presente en los extractos enzimáticos obtenidos en la SSF se determinó por el método de Bradford, usando una curva de calibración con albúmina de suero bovino a concentraciones entre 0,1 y 2,0 mg.mL⁻¹ como patrón. Un mililitro de reactivo de Bradford se mezcló con 20 µL de la muestra (extracto enzimático) y del patrón por separado. Se tomaron 200 µL de la reacción y se midió la absorbancia a 595 nm en microplaca usando un espectrofotómetro UV-VIS marca ThermoFisher Multiskan™ GO. (Bradford, 1976).

Cuantificación de glucosa: La concentración de glucosa se determinó usando el kit de glucosa-oxidasa de BioSystems, usando un patrón de glucosa (100 mg.dL⁻¹) y una solución de la enzima glucosa oxidasa como reactivo. Un mililitro de la solución de la enzima glucosa oxidasa se mezcló con 10 µL de la muestra y del patrón por separado. La mezcla de la reacción se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente (16-25°C), se colectaron 200 µL de la mezcla y se midió la absorbancia a 506 nm en usando un espectrofotómetro UV-VIS marca ThermoFisher Multiskan™ GO (Abaide et al., 2019).

Cuantificación de azúcares reductores: La concentración de azúcares reductores totales se determinó por el método de DNS, usando una curva de calibración con glucosa a concentraciones entre 0,2 y 3,2 mg.mL⁻¹ como patrón. Se añadieron 125 µL del patrón o la muestra en 125 µL de reactivo ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS). La reacción se llevó a cabo en agua hirviendo por 5 minutos, posterior a este tiempo la reacción se detuvo por choque térmico en hielo por 2 minutos. Finalmente se añadieron 1250 µL de agua destilada, se colectaron 200 µL de la

reacción y se midió la absorbancia a 540 nm en microplaca usando un espectrofotómetro UV-VIS marca ThermoFisher Multiskan™ GO (Miller, 1959).

Cuantificación de fenoles totales: La concentración de fenoles totales se determinó por el método de Folin-Ciocalteu modificado, usando una curva de calibración con ácido gálico a concentraciones entre 0,02 y 0,40 mg.mL⁻¹ como patrón. La determinación se realizó mezclando 25 µL de muestra o patrón, con 25 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu, 200 µL de agua de ionizada, 250 µL de Na₂CO₃ (70 g.L⁻¹) y 100 µL de agua des ionizada. La reacción se incubó durante una hora a temperatura ambiente, bajo condiciones de oscuridad y se colectaron 200 µL de la mezcla y se midió la absorbancia a 765 nm en usando un espectrofotómetro UV-VIS marca ThermoFisher Multiskan™ GO (Sánchez, Benavides, Heredia, Cisneros-Zevallos, & Jacobo-Velázquez, 2013; Singleton, Orthofer, & Lamuela, 1999).

La diferencia entre las concentraciones de compuestos fenólicos los jarabes fermentables obtenidos por SPS y el blanco sin adición de enzimas, fueron utilizadas para calcular el porcentaje de desintoxicación en los jarabes fermentables obtenidos a partir de CPH (Avanthi & Banerjee, 2016; Banerjee, Devi, & Ray, 2017; Sudha et al., 2015).

Cuantificación de etanol. La concentración de etanol se determinó usando una curva de calibración con etanol a concentraciones entre 0,15 y 1,20 % v/v como patrón. La determinación de etanol se realizó en microtubos tapa rosca de 2 mL, mezclando 500 µL de muestra o patrón con 500 µL de TBP, la mezcla se agitó en vórtex por 1 hora a temperatura ambiente. Posterior al tiempo de agitación, se colectaron 250 µL de la fase orgánica de la extracción (fase superior) en un tubo que contenía 250 µL del reactivo dicromato de potasio (K₂Cr₂O₇ al 10 % v/v en una solución de H₂SO₄ a 5M), la mezcla (fase orgánica y dicromato) se agitó en vórtex por 30 minutos. Posterior al tiempo de agitación, se dejó en reposo, finalmente se colectaron 200 µL de la fase inferior de la

reacción y se midió la absorbancia a 595 nm en microplaca usando un espectrofotómetro UV-VIS marca ThermoFisher Multiskan™ GO (Seo et al., 2009).

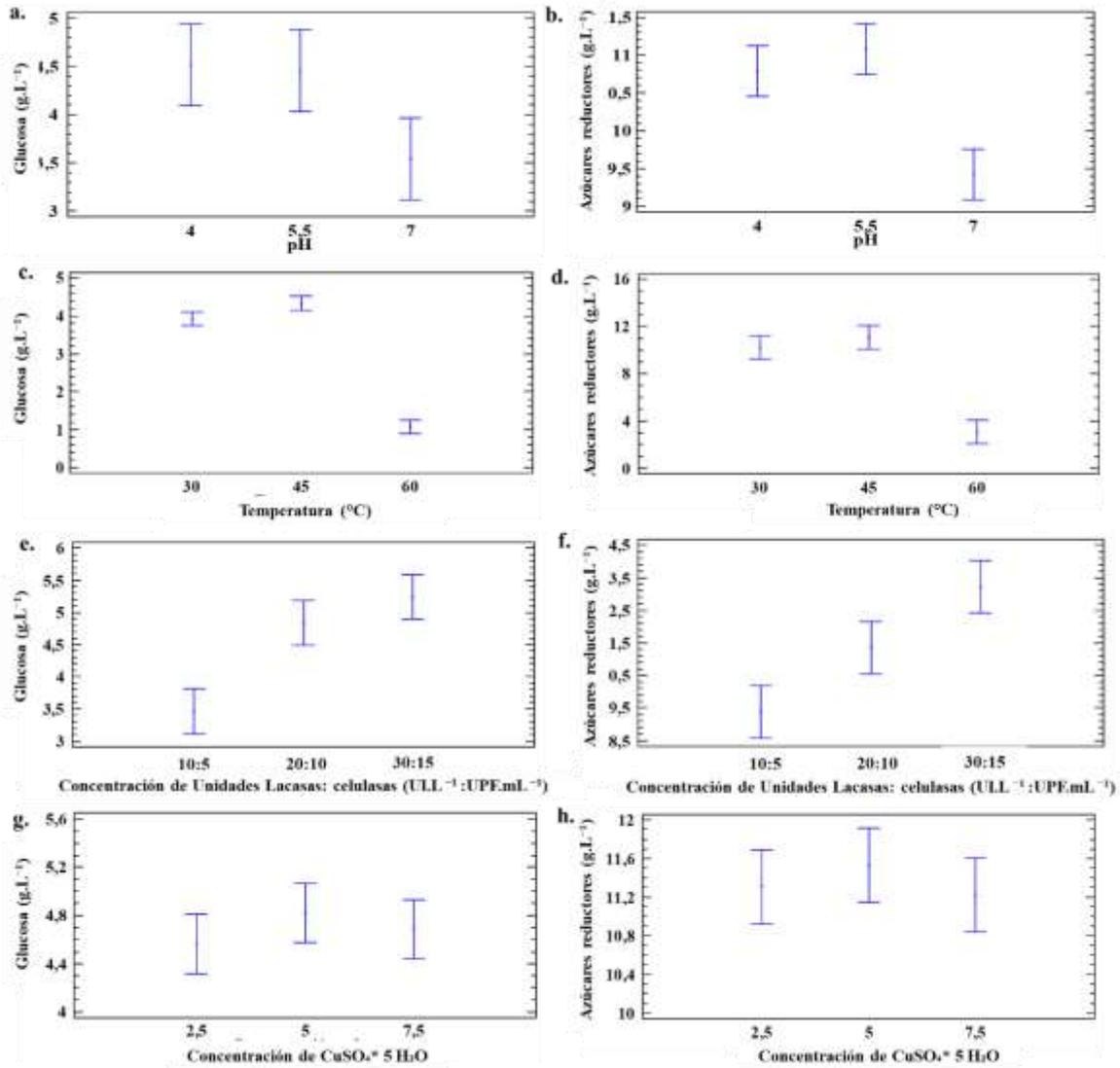
Cuantificación de biomasa celular. *La concentración de biomasa celular de la levadura Kluyveromyces marxianus* DSM 5418 se determinó mediante conteo de células en cámara de Thoma. La suspensión celular se diluyó con solución salina 0,9 % v/v (1:100) para permitir el conteo. La concentración de la levadura se determinó por la ***Ecuación 4***.

$$\textit{Ecuación 4} \qquad \qquad \qquad \textit{Concentración levadura} = A \times B \times C$$

Donde A es el número total de células (levaduras) en toda la cámara, B es el factor de dilución (1:100) y C es el volumen de la cámara (10000 mL).

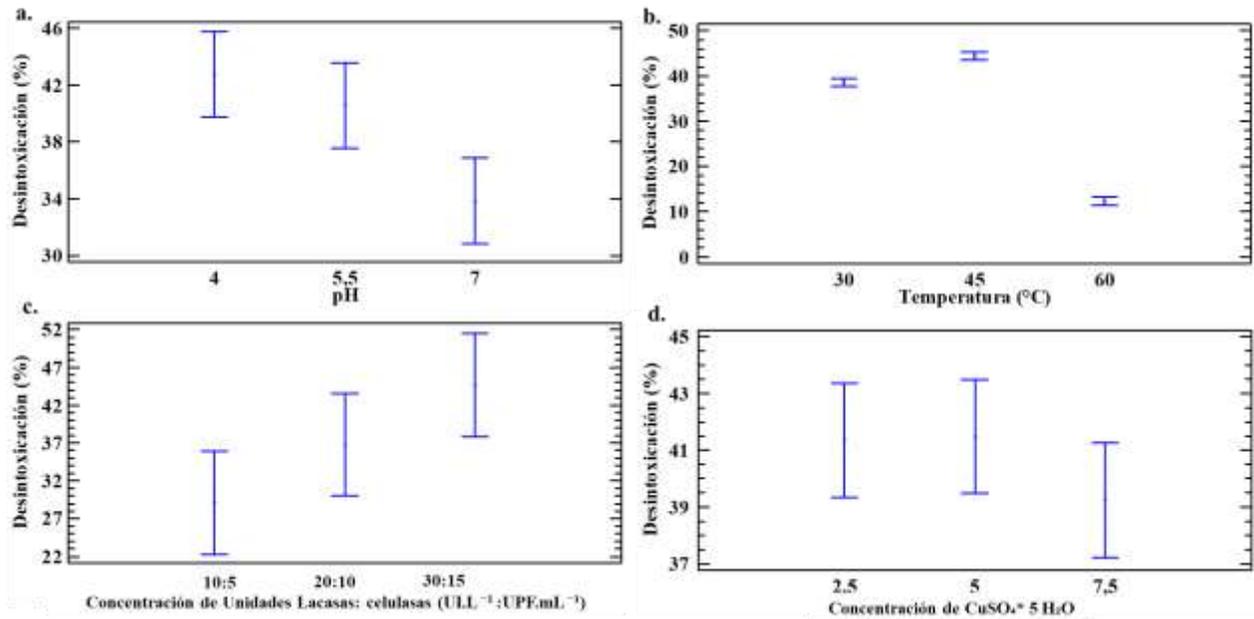
Apéndice C. Prueba de múltiples rangos, Tukey para el análisis de varianza de SPS de
CPH

Figura 30. Prueba de múltiples rangos (Tukey, HSD) para la producción de azúcares.



Nota: Efecto del pH (a), temperatura (b), concentración de unidades enzimáticas enzimas lacasas: celulasas y concentración de CuSO₄(d) sobre el SPS para la producción de Glucosa y Azúcares reductores totales en 144 horas, usando CPH como sustrato.

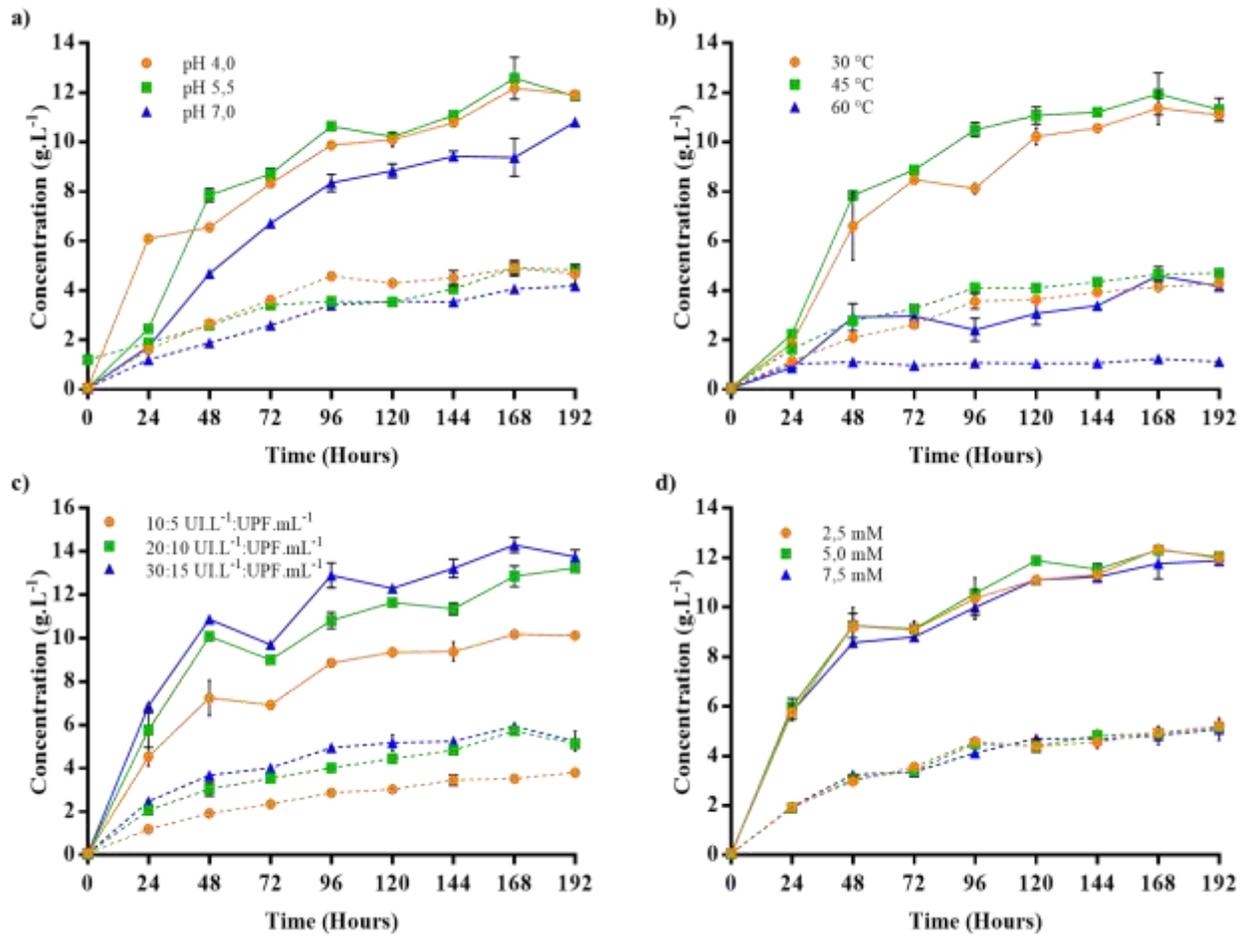
Figura 31. Prueba de múltiples rangos (Tukey, HSD) para la desintoxicación de jarabes.



Nota: Efecto del pH (a), temperatura (b), concentración de unidades enzimáticas enzimas lacasas: celulasas y concentración de CuSO₄ (d) sobre la desintoxicación de jarabes en 144 horas.

Apéndice D. Análisis de varianza para SPS de CPH por 192 horas

Figura 32 . Producción de azúcares por SPS durante 192 horas.



Nota: Efecto del pH (a), temperatura (b), concentraciones de unidades enzimáticas de lacasa:celulasa (c) y concentraciones de CuSO₄ (d) sobre SPS de CPH para la obtención de glucosa (líneas punteadas) y azúcares reducidos (líneas en continua). El SPS se llevó a cabo durante 192 horas. Los gráficos muestran el promedio y la desviación estándar de tres réplicas para cada dato.

Apéndice E. Combinaciones de las variables independientes en los diseños de experimentos

Tabla 7. *Combinación de las variables independientes pH, temperatura y concentración de enzimas en el diseño de cribado para la obtención de jarabes por SPS de CPH*

Combinación	Bloque	pH	Temperatura (°C)	Concentración lacasas:celulasas (U.L. ⁻¹ :UPF.mL ⁻¹)
1	1	6	35	20:10
2	1	6	55	20:10
3	1	4	35	20:10
4	1	6	35	40:20
5	1	5	45	30:15
6	1	4	35	40:20
7	1	4	55	20:10
8	1	4	55	40:20
9	1	6	55	40:20
10	2	6	35	20:10
11	2	6	55	20:10
12	2	4	35	20:10
13	2	6	35	40:20
14	2	5	45	30:15
15	2	4	35	40:20
16	2	4	55	20:10
17	2	4	55	40:20
18	2	6	55	40:20
19	3	6	35	20:10
20	3	6	55	20:10
21	3	4	35	20:10
22	3	6	35	40:20
23	3	5	45	30:15
24	3	4	35	40:20
25	3	4	55	20:10
26	3	4	55	40:20
27	3	6	55	40:20

Tabla 8. *Combinación de las variables independientes pH y temperatura en el diseño multinivel para la obtención de jarabes por SPS de CPH.*

Combinación	Bloque	pH	Temperatura (°C)
1	1	3	40
2	1	6	60
3	1	3	30
4	1	4	50
5	1	5	40

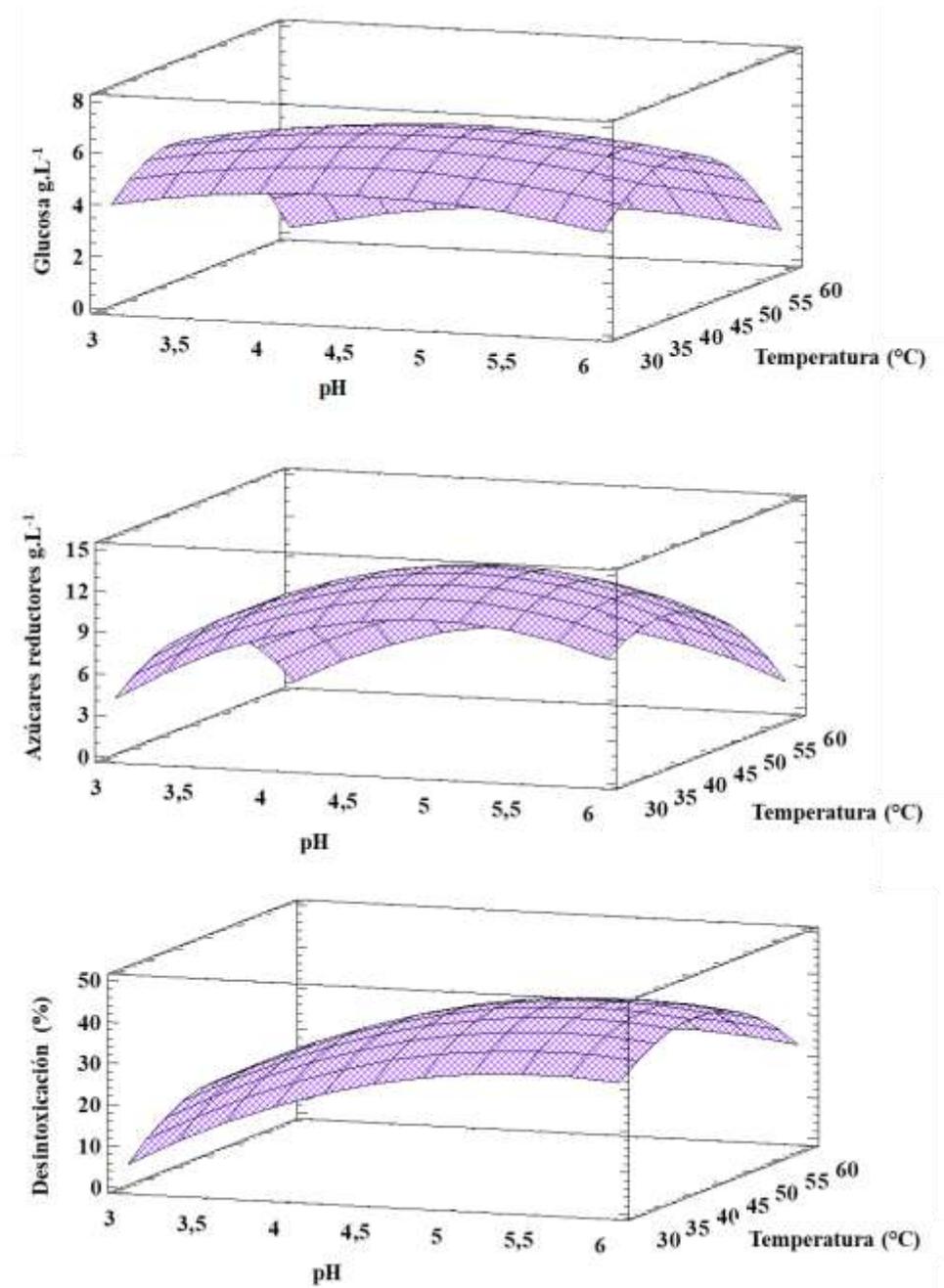
6	1	4	30
7	1	5	50
8	1	3	50
9	1	4	60
10	1	3	60
11	1	5	30
12	1	4	40
13	1	6	50
14	1	6	40
15	1	6	30
16	1	5	60
17	2	5	60
18	2	5	30
19	2	3	30
20	2	4	40
21	2	4	60
22	2	4	50
23	2	5	50
24	2	3	60
25	2	4	30
26	2	3	50
27	2	3	40
28	2	6	30
29	2	6	50
30	2	5	40
31	2	6	60
32	2	6	40
33	1	4	30
34	3	3	60
35	3	4	60
36	3	5	30
37	3	4	40
38	3	5	50
39	3	3	30
40	3	3	50
41	3	5	60
42	3	4	50
43	3	6	40
44	3	6	60
45	3	3	40
46	3	6	30
47	3	6	50
48	3	5	40

Tabla 9. *Combinación de las variables independientes en el diseño multinivel 3² para obtención de etanol*

Combinación	Bloque	Temperatura (°C)	Agitación (rpm)
1	1	28	0
2	1	42	150
3	1	56	0
4	1	56	300
5	1	42	0
6	1	28	150
7	1	28	300
8	1	56	150
9	1	42	300
10	2	28	300
11	2	42	0
12	2	56	150
13	2	42	150
14	2	56	0
15	2	28	0
16	2	28	150
17	2	56	300
18	2	42	300
19	3	42	150
20	3	28	300
21	3	56	300
22	3	42	0
23	3	56	0
24	3	28	0
25	3	42	300
26	3	28	150
27	3	56	150

Apéndice F. Optimización SPS de CPH usando enzimas comerciales

Figura 33. Superficies de respuesta SPS usando enzimas comerciales.



Nota: Gráficas de superficie de respuesta 3D para el proceso de pretratamiento y sacarificación simultáneas (SPS) de cáscara de mazorca de cacao y desintoxicación de compuestos fenólicos en jarabes fermentables utilizando celulasas comerciales de *T. Reesei* ATCC 26921 junto con lacasas

comerciales de *Trametes versicolor* (38429 Sigma-Aldrich) como control .Cada gráfico en la figura representa el efecto de la interacción entre temperatura y pH de las tres variables en la respuesta concentración de glucosa (a) y concentración de azúcares reductores (b) y desintoxicación de compuestos fenólicos (c)