

OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE XILANASA BACTERIANA A PARTIR DE *Bacillus sp. K1* CON EL USO DE RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS

Terry Miguel Solis Carranza

Resumen

Las xilanasas son enzimas que hidrolizan el xilano, produciendo azúcares fermentables tales como xilosa y xilobiosa con aplicaciones industriales muy diversas entre las que destaca el biobleaching y la producción de bioetanol de segunda generación. El objetivo principal del presente estudio se enfoca en la optimización de la producción de xilanasas bacterianas por parte de la bacteria *Bacillus sp. K1*. La misma ha sido previamente aislada de muestras de madera en putrefacción recolectadas en las premisas de la Universidad de Lakehead para su Departamento de Biología. Las variables investigadas para la optimización fueron físicas tales como pH, temperatura y volumen de inóculo; y de composición del medio de fermentación tales como fuente de carbono, fuente de nitrógeno orgánico e inorgánico y relación porcentual entre dichos componentes. Adicionalmente, se determinó el efecto de iones metálicos (sodio, potasio, magnesio, calcio, ferroso, níqueloso, cúprico, cobaltoso y manganeso) y surfactantes (Polisorbato-20, dodecil sulfato de sodio y Triton X-100) en la actividad enzimática de la xilanasas producidas. La mayor producción de xilanasas fue tras 36h de fermentación y las condiciones físicas óptimas asociadas a la producción de xilanasas fueron pH 6, temperatura 35 °C y volumen de inóculo 1%. La composición óptima del medio de fermentación determinada está constituida por: Afrecho de trigo 4%, Glucosa 0,5%, NH₄NO₃ 0,5%, K₂HPO₄ 0,1%, KCl 0,1%, MgSO₄ 0,05%, peptona 0,5%, SDS 0,1%. La actividad enzimática generada es de 264,96±7,89 IU/L, con un 248,79% de

incremento con respecto al inicial. Los inhibidores más importantes fueron los iones cúprico y manganeso con 32,00% y 49,16% de inhibición comparado con el experimento de control. Las condiciones de fermentación y la presencia de celulosa favorecen una futura aplicación en la industria del bioetanol de segunda generación.

Palabras claves: <FERMENTACIÓN SUMERGIDA>, <PRODUCCIÓN DE ENZIMAS>, <AFRECHO DE TRIGO>, <BIOETANOL DE SEGUNDA GENERACIÓN>.

Abstract:

The xylanases are enzymes that hydrolyze xylan, producing fermentable sugars such as xylose and xylobiose. These enzymes have several industrial applications, among which its use in biobleaching and second-generation bioethanol stands out. The main objective in the present study is the optimization of the bacterial xylanase production by the strain *Bacillus sp. K1*, which has been previously isolated from rotting wood samples collected at Lakehead University's premises for its Biology Department. The variables investigated for optimization were physical such as pH, temperature and inoculum volume; and composition of the fermentation medium such as carbon source, organic and inorganic nitrogen source and percentage ratio between these components. Additionally, the effect of metal ions (sodium, potassium, magnesium, calcium, ferrous, nickelous, cupric, cobaltous and manganese) and surfactants

(Tween-20, dodecyl sodium sulfate and Triton X-100) in the xylanase enzyme activity was determined. The highest production of xylanase was obtained after 36h fermentation and the optimal physical conditions associated with the xylanase production were pH 6, temperature 35 °C and inoculum volume 1%. The optimum composition of the fermentation medium consists of: wheat bran 4%, glucose 0,5%, NH_4NO_3 0,5%, K_2HPO_4 0,1%, KCl 0,1%, MgSO_4 0,05%, peptone 0,5%, SDS 0,1%. The enzyme activity generated is $264,96 \pm 7,89$ IU/L, with a 248,79% increase from the initial conditions. The most important inhibitors were cupric and manganous ions with 32,00% and 49,16% inhibition compared to the control experiment. The fermentation conditions and the presence of cellulase provide a future application in the second-generation bioethanol industry.

Keywords: <SUBMERGED FERMEN-
TATION>, <ENZYME PRODUCTION>,
<WHEAT BRAN>, <SECOND-GENER-
ATION BIOETHANOL>.

2. INTRODUCCIÓN

La lignocelulosa es el principal y más abundante componente de la biomasa renovable producida por la fotosíntesis. Los tres principales componentes que la constituyen son celulosa, hemicelulosa y lignina. Entre ellas, las hemicelulosas están compuestas de complejas mezclas de xilano, xiloglucano, glucomanano, arabinogalactano y otros heteropolímeros [1], [2].

El xilano es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza, representando aproximadamente un tercio del carbono orgánico renovable de la Tierra. La hidrólisis de sus enlaces β -1,4, se lleva a cabo con la enzima xilanasas (endo-1,4- β -D-xilanhidrolasa; EC 3.2.1.8), conduciendo a productos tales como xilosa y xilobiosa [3], [4].

En la actualidad el uso de las xilanasas a escala industrial tiene un campo muy amplio de aplicación. Entre estos se encuentra el blanqueo de la pulpa en la industria papelera, clarificación de jugos, bioconversión de residuos lignocelulósicos y desechos agrícolas en productos fermentables, mejoramiento de la consistencia de la cerveza y digestibilidad de alimentos balanceados [5].

Entre las aplicaciones citadas se destaca el uso de xilanasas como sustituto de compuestos clorados para el blanqueo de pulpa Kraft en la producción de papel, en un proceso llamado *biobleaching*. El proceso tradicional ha generado grandes cantidades de aguas residuales cargadas de compuestos organoclorados, de características tóxicas, mutagénicas y resistentes a la biodegradación, además de ser una de las mayores fuentes de contaminación ambiental a nivel industrial [6].

Además, existen investigaciones enfocadas en la producción de biocombustibles de segunda generación, los cuales son los principales productos de la

bioconversión de materiales lignocelulósicos. Entre ellos “el etanol es el combustible renovable más importante en términos de volumen y valor de mercado” [7].

El uso de xilanasas en la producción de etanol de segunda generación puede incrementar su efectividad, al aprovechar la hemicelulosa, convirtiéndola en xilosa, la cual es un azúcar fermentable. Además, la producción de xilanasas con xilano purificado como sustrato no es viable desde el punto de vista económico por su elevado costo.

En este contexto el presente estudio se enfoca en la optimización de la producción de xilanasas a partir de una cepa bacteriana aislada por el personal del laboratorio para enzimas, bioproductos y biorremediación de la universidad de Lakehead. Seguido de la evaluación de la efectividad de diversos subproductos agroindustriales lignocelulósicos de bajo costo ricos en hemicelulosa, como sustratos para el cultivo de la cepa *Bacillus sp. K1* y la consecuente producción de xilanasas bacterianas.

3. METODOLOGIA

3.1.Cepa bacteriana y su activación

De acuerdo con Prasad & Qin [8] la bacteria *Bacillus sp. K1* fue aislada en las premisas de la Universidad de Lakehead; a partir de una muestra de madera en estado de putrefacción, se identificó como productora de celulasa por Prasad & Qin y se preservó en refrigeración a $-83\text{ }^{\circ}\text{C}$. La cepa se encuentra registrada en el base de datos del banco de genes NCBI (N° de acceso KP987117)

Una muestra de la cepa congelada fue cultivada en una caja Petri con medio de cultivo Luria-Bertani y colocada en una incubadora a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h. Para la activación de la bacteria a utilizarse en el estudio, se empleó 50 mL de medio de cultivo Luria-Bertani en un matraz, para luego ser

incubado por 15 h a 37 °C y 200 rpm de velocidad de agitación.

3.1. Cultivo de la cepa bacteriana

La bacteria activada se cultivó al 1% de inóculo en 20mL de medio MSM para verificar la producción de xilanas y crecimiento bacteriano en función del tiempo. El medio utilizado consistió en: xilano purificado 1%, nitrato de sodio 0,1 g, NaNO₃ 0,1%, K₂HPO₄ 0,1%, KCl 0,1%, MgSO₄ 0,05%, extracto de levadura 0,05%. Las condiciones de fermentación fueron pH 7, 37 °C y 200 rpm de agitación por 144 h. Las muestras fueron tomadas cada 12 h y preservadas a -4°C.

3.2. Densidad óptica y medición de la actividad enzimática

3.2.1. Medición de la densidad óptica

El uso de la espectrofotometría para medir la densidad óptica a 600 nm (OD600) de un cultivo bacteriano con la finalidad monitorear el crecimiento ha sido una técnica usual en microbiología [9]. Las muestras tomadas cada 12 h se descongelaron lentamente en hielo y se midió su densidad óptica en un espectrofotómetro. La densidad óptica de varias muestras se midió en un espectrofotómetro de microplacas Epoch™ fabricado por BioTek Instruments [10]. Con el uso del promedio de estas mediciones se trazó la curva de crecimiento bacteriano.

3.2.2. Extracción de la enzima cruda

Las muestras se centrifugaron a 12000 rpm durante 3 min. El sobrenadante claro (extracto crudo) se utilizó para el ensayo enzimático.

3.2.3. Ensayo de actividad enzimática para xilanas

La producción de xilanas se verificó con la medición de su actividad enzimática. Este método se fundamenta en cuantificar la liberación de xilosa, con el uso del reactivo, ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) [10]. El reactivo usado es de marca Sigma Aldrich N° producto D0550).

Este método requiere la construcción previa de una curva de calibración con xilosa, reactivo de marca Sigma Aldrich (N° producto X-0200000). La longitud de onda utilizada fue de 540 nm. La curva de calibración se desarrolló con diferentes soluciones de xilosa con una concentración en el rango de 0 a 800 µg/mL. Los experimentos se realizaron por triplicado y la curva se construyó mediante la técnica de regresión lineal.

La mezcla de reacción contenía 20 µL de solución de xilano purificado de espelta y avena, marca Sigma Aldrich (N° producto X-0627) al 1% (preparada en tampón citrato 0,05 M de pH 5,3) como sustrato, se incubaron 10 µL de extracto enzimático diluido y tampón citrato (0,05 M, pH 5,3) a 50 °C durante 30 min y luego la reacción se terminó mediante la adición de 60 µL de reactivo DNS.

Se ejecutó un control simultáneo que contenía todos los reactivos, y la reacción se terminó antes de la adición del extracto de enzima. Las muestras se colocaron en un baño de agua hirviendo por 10 min, se enfriaron a temperatura ambiente y se diluyeron a 300 µL con agua destilada. La absorbancia de las muestras se determinó en un espectrofotómetro a 540 nm [11].

La unidad de actividad de xilanas se definió como la cantidad de enzima que cataliza la liberación de 1 µmol de azúcar reductor equivalente a xilosa por litro minuto en las condiciones de ensayo especificadas [10].

Los promedios de absorbancia obtenidos en cada ensayo fueron convertidos en concentración de xilosa (µg/mL) con el uso

de la curva de calibración previamente realizada. La concentración de xilosa será transformada en unidad de actividad enzimática mediante la siguiente ecuación:

$$Ac_x = \frac{X * V_r * 1000}{t_{inc} * M * V_e} \quad (1)$$

Donde:

Ac_x = Actividad de xilanasas (μ mol xilosa/Lmin).

X = Concentración de xilosa (μ g/mL reacción).

V_r = Volumen total de reacción (0,03 mL reacción).

V_e = Volumen del extracto enzimático (0,01 mL extracto).

t_{inc} = Tiempo de incubación (30 min).

M = Peso molecular de xilosa (150 μ g/ μ mol).

3.1.1. Optimización del pH

Se compararon diferentes pH en un rango de 3 a 9 en las condiciones de cultivo en un matraz para verificar la actividad enzimática óptima. Cada muestra se analizó a las 36 h, cuando la actividad de xilanasas era más alta, en base a los ensayos anteriores.

3.1.2. Optimización del volumen de inóculo.

Se compararon diferentes volúmenes de inóculo de 0,5% a 10% en las condiciones de cultivo para verificar la actividad óptima de la xilanasas. Cada muestra se analizó a las 36 h, cuando la actividad de xilanasas era más alta, en base a los ensayos anteriores.

3.1.3. Optimización de la temperatura de fermentación.

Se compararon diferentes temperaturas de 25 °C a 45 °C en las condiciones de cultivo para verificar la actividad óptima de la xilanasas. Cada muestra se analizó a las 36 h, cuando la actividad de xilanasas era más alta, en base a los ensayos anteriores.

3.2. Optimización del medio de fermentación

3.2.1. Optimización de la fuente de carbono

Se estudió el reemplazo del xilano purificado con diferentes residuos: afrecho de trigo, paja de trigo, aserrín, bagazo de maíz y hojas de olmo de roca (*Ulmus thomasii* Sarg.) como fuente de carbono principal; y azúcares purificadas como: lactosa, sacarosa, D-sorbitol, D-Fructosa, D-Glucosa como fuente suplementaria, en una concentración de 1%. Finalmente, se probó con diferentes concentraciones del residuo lignocelulósico optimizado en un rango de 0,5% a 5%, suplementando el medio de cultivo con 0,5% del azúcar purificada que demostró incrementar la actividad enzimática en mayor proporción.

3.2.2. Optimización de la fuente de nitrógeno

Las fuentes orgánicas de nitrógeno comparadas fueron: extracto de levadura, peptona, úrea, extracto de malta y triptona. A su vez las fuentes inorgánicas fueron: sulfato de amonio, nitrato de potasio, cloruro de amonio, nitrato de sodio y nitrato de amonio. Este experimento mantuvo las condiciones de cultivo previamente optimizadas con 1% de fuente de nitrógeno. Finalmente, se probó con diferentes concentraciones de la fuente inorgánica de nitrógeno optimizada en un rango de 0,5% a 4%.

3.2.3. Relación entre la concentración fuente de nitrógeno/ carbono.

Se utilizó la relación ya optimizada entre la fuente de carbono y nitrógeno inorgánica para ensayar diferentes relaciones de concentración con la fuente orgánica de nitrógeno (8:1:1, 8:1:2, 8:1:4, 8:1:5, 8:1:6 y 8:1:8) en la preparación del medio de cultivo para optimizar la actividad enzimática.

3.3. Efecto de iones metálicos y surfactantes

Se ensayaron diferentes iones metálicos (sodio, potasio, magnesio, calcio, ferroso y níqueloso) con una concentración 1 mM y surfactantes (Polisorbato-20, dodecil sulfato de sodio y Triton X-100) con concentración 0,1% en el medio de cultivo y se determinó su efecto en la actividad de la enzima xilanas se comparó manteniendo las condiciones previamente optimizadas.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados (Fig.1) verifican la producción de xilanas bacteriana. Tras 36 h de fermentación se produjo el pico más alto de densidad óptica y actividad enzimática equivalente a $106,05 \pm 8,05 \mu\text{mol xilosa/Lmin}$, es decir que tanto el crecimiento bacteriano como la producción de enzimas, utilizando como sustrato xilano purificado, fueron optimizados. Las condiciones físicas involucradas en la producción de xilanas tales como pH de fermentación, volumen de inóculo y temperatura de optimización se optimizaron con experimentos independientes.

Figura 1: Producción periódica de xilanas y densidad óptica en función del tiempo de incubación cada 12 h por 6 días (144h)

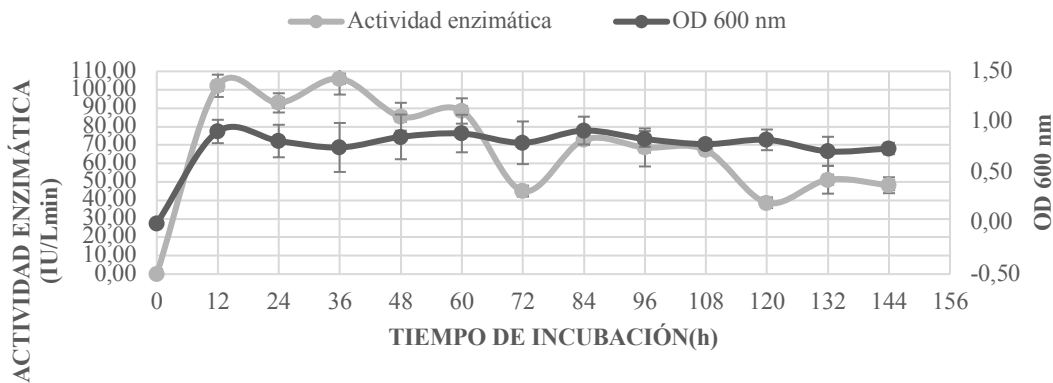


Figura 2: Optimización del pH de fermentación mediante la comparación de la actividad enzimática relativa y densidad óptica.

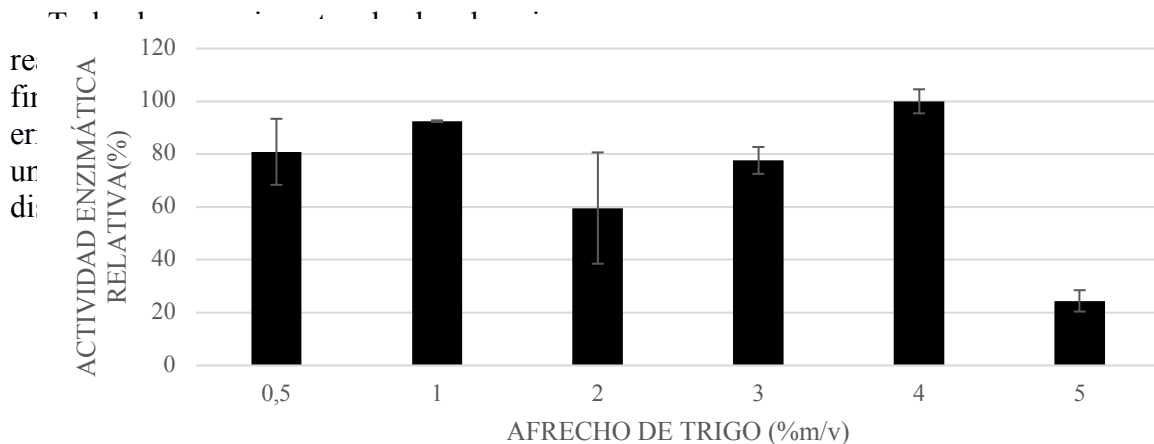


Figura 3: Optimización del volumen de inóculo mediante la comparación de la actividad enzimática relativa v densidad óptica

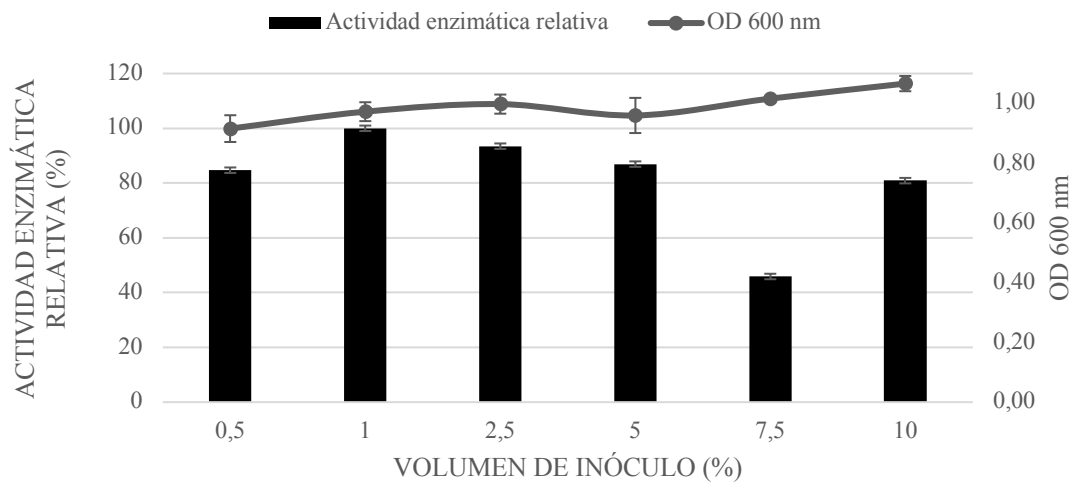


Figura 4: Optimización de la temperatura de fermentación mediante la comparación de la actividad enzimática relativa v densidad óptica.

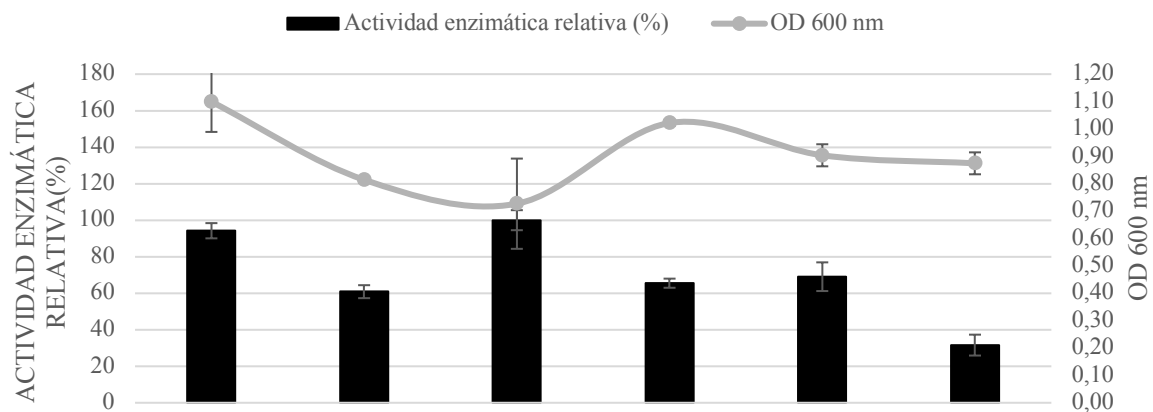


Figura 5: Efecto de la concentración de afrecho de trigo suplementado con glucosa a 0.5% mediante la comparación de su actividad enzimática relativa.

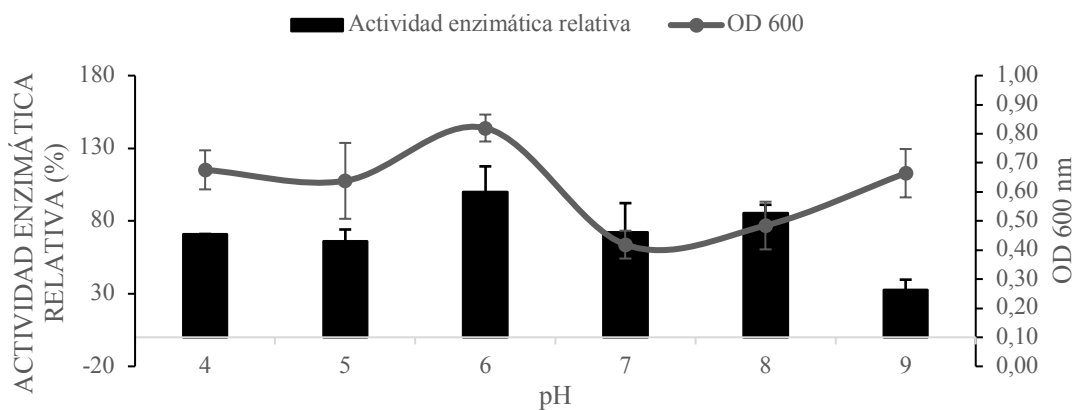


Figura 6: Efecto de la concentración de nitrato de amonio mediante la comparación de la actividad enzimática de diferentes porcentajes m/v de la sustancia.

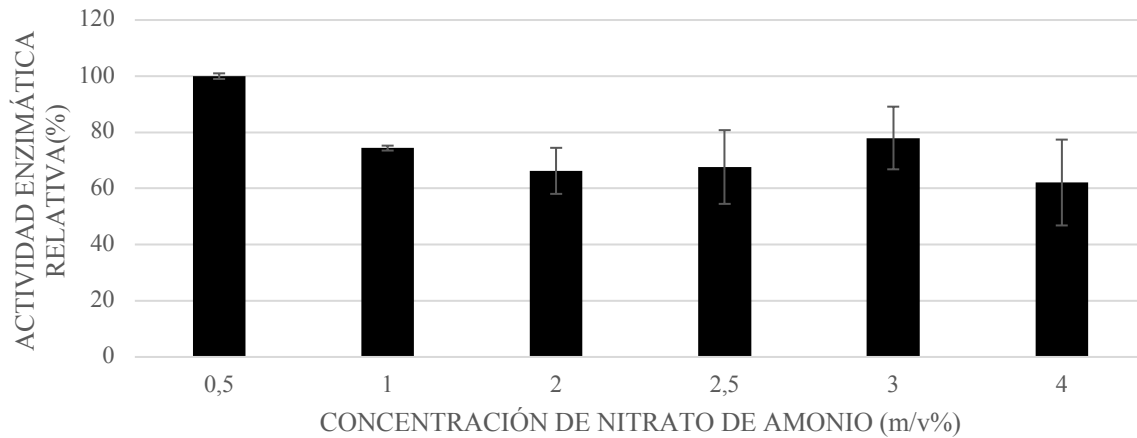
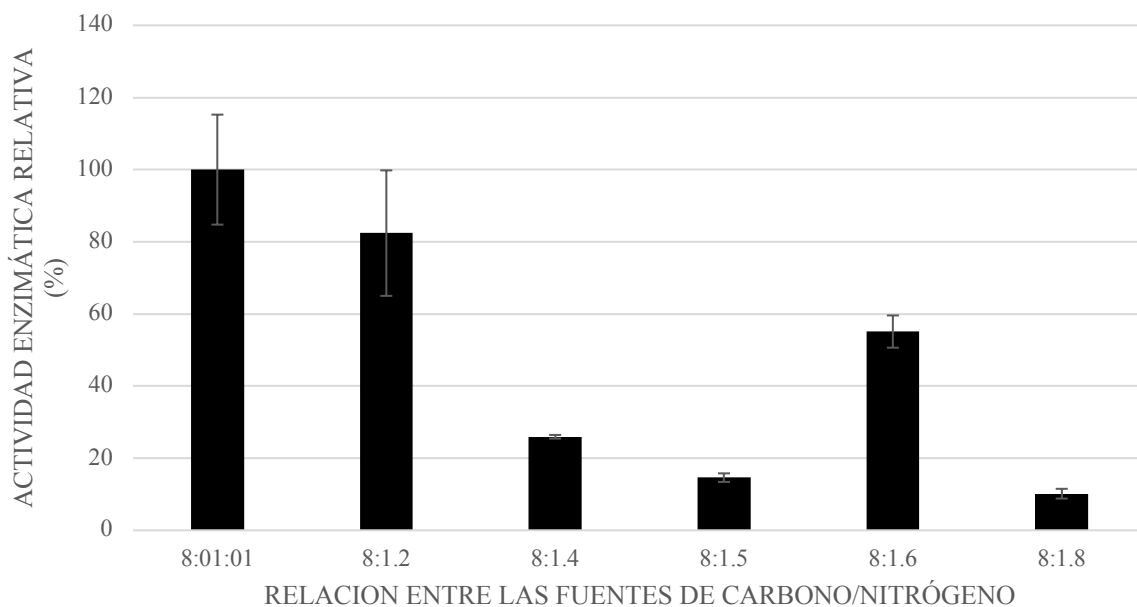


Figura 7: Efecto de la relación entre la concentración de las fuentes de nitrógeno y carbono mediante la comparación de la actividad enzimática relativa.



El pH idóneo se determinó en el valor de 6 (Fig. 2).

El volumen de inóculo y temperatura se optimizaron (Fig. 3 y 4) en 1% v/v y 35 °C respectivamente; cabe mencionar que dichos parámetros no fueron óptimos para el crecimiento bacteriano. Sin embargo, se seleccionaron por el propósito de la investigación de maximizar la producción de enzima. La temperatura coincide con la especie *Bacillus subtilis* detallada en una investigación [12].

El reemplazo del xilano puro con un residuo lignocelulósico, disminuye la actividad enzimática producida por fermentación sumergida (Tabla 1).

La mayor actividad se obtiene con afrecho de trigo. Los residuos restantes demostraron inhibir en gran medida la producción de la enzima. Por tal razón se decidió suplementar el uso de afrecho de trigo con el azúcar purificado que demostró incrementar en mayor medida la actividad enzimática, es decir, glucosa (Tabla 1). El uso de afrecho se corroboró con varias especies de hongos y bacterias en bibliografía [13]; [14]; [15]; [16]; [17].

La concentración de afrecho de trigo a utilizarse para la producción de xilanas se ve limitada por la solubilidad de este en el medio de fermentación, razón por la cual su efecto se determinó en un rango de concentración de 0,5 a 5%.

La fuente de carbono se suplementó con glucosa al 0,5% debido a que las bacterias necesitan de un azúcar purificada simple en las fases iniciales de su crecimiento. Los resultados permitieron identificar la concentración óptima de afrecho de trigo en 4% con glucosa al 0,5% (Fig. 5).

La fuente de nitrógeno inorgánico se determinó con la adición de 5 sustancias en concentración 1% al medio de fermentación.

Tabla 1: Efecto de diferentes fuentes carbono al 1% de concentración en la actividad enzimática.

Fuente de carbono	Actividad enzimática (IU/L)
Xilano (Control)	105,17± 8,59
Bagazo de maíz	6,28 ± 0,58
Paja de trigo	0,00
Afrecho de trigo	85,86 ± 4,91
Hojas de olmo de roca	0,00
Aserrín	0,00
Sacarosa	73,64 ± 7,86
Sorbitol	20,95 ± 9,35
Fructosa	27,04 ± 6,97
Lactosa	23,50 ± 1,39
Glucosa	97,30 ± 7,51

En la tabla 2 se puede observar que las actividades enzimáticas relativas del sobrenadante con nitrato de potasio, nitrato de sodio, sulfato de amonio y nitrato de amonio tienen valores similares.

La elección del nitrato de amonio se debe a que: demostró tener la mayor actividad enzimática y al realizar la cotización con el proveedor Sigma Aldrich en internet tuvo menor precio que las demás sustancias.

Tabla 2: Efecto de diferentes fuentes inorgánicas de nitrógeno al 1% de concentración en la actividad enzimática.

Fuente inorgánica de nitrógeno (1%)	Actividad enzimática (IU/L)
KNO ₃	149,61 ± 11,83
NaNO ₃	147,71 ± 6,34
NH ₄ NO ₃	159,61 ± 9,04
NH ₄ Cl	120,31 ± 12,37
(NH ₄) ₂ SO ₄	146,90 ± 0,88

La concentración óptima de nitrato de amonio se determinó en un rango de 0,5-5%. Siendo la dosis de nitrato de amonio en 0,5% adecuada para maximizar la producción de xilanasa bacteriana. Por lo tanto, la relación entre la concentración porcentual de afrecho de trigo y nitrato de amonio es 8 a 1 (Fig. 6).

La fuente de nitrógeno orgánico fue determinada con la adición de 5 sustancias en concentración 1% al medio de fermentación. En la tabla 3 se puede observar que las actividades enzimáticas relativas del sobrenadante con la aplicación de peptona, extracto de levadura y extracto de malta tienen valores similares.

La peptona fue escogida debido a que demostró tener la mayor actividad enzimática y al realizar la cotización con el proveedor Sigma Aldrich en internet tuvo menor precio que las demás sustancias.

Tabla 3: Efecto de diferentes fuentes orgánicas de nitrógeno al 1% de concentración en la actividad enzimática.

Fuente orgánica de nitrógeno (1%)	Actividad enzimática (IU/L)
Peptona	162,94 ± 2,16
Extracto de malta	147,76 ± 11,41
Triptona	114,24 ± 8,82
Úrea	93,59 ± 13,25
Extracto de levadura	155,10 ± 3,44

La relación entre la concentración porcentual de las fuentes de carbono y nitrógeno se determinó con la finalidad de maximizar la actividad enzimática de xilanasa. La relación del porcentaje de afrecho de trigo y nitrato de amonio se encontró en experimentos previos de 8 a 1. El porcentaje de peptona se halló equivalente a 8:1:1 (Fig. 7).

El efecto de la adición de diferentes aditivos, entre ellos iones metálicos (Tabla 4)

al medio de fermentación en concentración 1mM se realizó con experimentos independientes y se determinó el efecto que ejerce cada uno de ellos en la actividad enzimática comparado con un experimento de control sin la incorporación de aditivos.

En general, la adición de los iones metálicos inhibió la actividad enzimática según la tabla 4. Sin embargo, cabe recalcar que los iones cúprico y manganoso influyeron en el decremento más significativo de la actividad de xilanasa, lo cual se puede deber al bloqueo de la secreción de proteína en el medio de fermentación, según [13].

El efecto de la adición de los surfactantes polisorbato-20 (Tween-20), dodecil sulfato de sodio y Triton X-100 en concentración 0,1% se realizó con experimentos independientes con la finalidad de comparar su actividad enzimática con un experimento de control sin la incorporación de aditivos.

Tabla 4: Efecto de diferentes aditivos en la actividad enzimática de la xilanasa obtenida.

Aditivos añadidos	Actividad enzimática (IU/L)
Control	171,69 ± 19,33
Na+	114,19 ± 12,77
K+	111,88 ± 7,89
Mg ++	142,02 ± 6,99
Ca++	138,50 ± 6,54
Fe++	152,34 ± 8,67
Ni++	121,83 ± 3,92
Cu++	54,94 ± 4,07
Co++	133,13 ± 14,50
Mn++	84,40 ± 15,21
TWEEN-20	140,10 ± 26,52
SDS	264,96 ± 2,27
TRITON X-100	152,25 ± 12,19

La incorporación de Polisorbato-20 y Tritón X-100 mostró un decremento de la actividad enzimática relativa al experimento de control. Sin embargo, la adición de dodecil sulfato de sodio incrementó significativamente dicho parámetro. Este

comportamiento puede ser explicado porque la adición de surfactantes al medio de cultivo ejerce diferentes efectos en la secreción de enzimas, dependiendo del grado en el que afecta la permeabilidad de las membranas celulares según [2].

La comparación de las actividades enzimáticas producidas con las variables previas y posteriores asociadas a la fermentación en la tabla 4 permitió determinar un valor final de $264,96 \pm 7,89$ $\mu\text{mol xilosa/Lmin}$, el cual se calculó que es 248,79% mayor a la actividad enzimática encontrada al inicio de la presente investigación.

CONCLUSIÓN

La bacteria *Bacillus sp. K1*, previamente aislada y determinada como productora de celulasa, demostró ser productora de xilanasa bacteriana con un tiempo de fermentación óptimo de 36h. Las condiciones físicas óptimas asociadas a la producción de xilanasa bacteriana fueron pH de 6, temperatura de 35°C y volumen de inóculo 1%. La adición del surfactante SDS en 1% fue el parámetro que indujo de una manera significativa la actividad de la enzima.

Las condiciones físicas de fermentación y la producción verificada tanto de celulasa como de xilanasa por parte de la bacteria *Bacillus sp. K1* favorecen su aplicación futura en la industria del bioetanol de segunda generación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] A. Ragauskas, C. Williams, B. Davison, G. Britovsek, J. Cairney, C. Eckert, W. J. Frederick, J. Hallett, D. Leak, C. Liotta, J. Mielenz, R. Murphy, R. Templer and T. Tschaplinski, "The path forward for biofuels and biomaterials," *Science*. 311, pp. 484-489, 2006.
- [2] D. Verma y T. Satyanarayana, «Molecular approaches for ameliorating microbial xylanases,» *Bioresource Technology*, pp. 360-367, 2012.
- [3] T. Collins, C. Gerday and G. Feller, "Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases," *FEMS Microbiology Reviews*, pp. 3-23, 2015.
- [4] R. Bernier, M. Desrochers, L. Jurasek and M. Paice, "Isolation and characterization of a xylanase from *Bacillus subtilis*," *Applied and Environmental Microbiology*, pp. 511-514, 1983.
- [5] K. Wong, L. Tan and J. Saddler, "Multiplicity of β -1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications," *Microbiological Reviews*, pp. 305-317, 1988.
- [6] S. Subramaniyan y P. Prema, «Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application,» *Critical Reviews in Biotechnology*, pp. 33-64, 2002.
- [7] M. Taherzadeh and K. Karimi, "Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review," *International Journal of Molecular Sciences*, pp. 707-738, 2008.
- [8] Y. Prasad y W. Qin, «Characterization of Novel Cellulase-producing Bacteria,» *Applied Biochemistry and Biotechnology*, nº 177, pp. 1186-1198, 2015.
- [9] B. Matlock, R. Beringer, D. Ash, M. Allen y A. Page, «Analyzing Differences in Bacterial Optical Density Measurements,» *Thermo Scientific*, pp. 1-2, 2007.
- [10] Biotek Instruments, «Biotek,» 16 11 2017. [En línea]. Available: <https://www.biotek.es/es/products/literature-request.html>.
- [11] G. Miller, «Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination,» *Analytical Chemistry*, pp. 426-428, 1959.
- [12] H. Guo, H. Chen, L. Fan, B. Zheng, D. Jian and W. Qin, "Enzymes produced by biomass-degrading bacteria can efficiently," *Renewable Energy*, pp. 195-201, 2017.
- [13] M. Irfan, U. Asghar, M. Nadeem, R. Nelofer y Q. Syed, «Optimization of process parameters for xylanase production by *Bacillus sp.* in submerged fermentation,» *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, pp. 139-147, 2016.

- [14] A. Sharma, S. Adhikari y T. Satyanarayana, «Alkali-thermostable and cellulase-free xylanase production by an extreme thermophile *Geobacillus thermoleovorans*,» *World J Microbiol Biotechnol* , pp. 483-490, 2007.
- [15] B. Battan, J. Sharma, S. Dhiman y R. Chander, «Enhanced production of cellulase-free thermostable xylanase by *Bacillus pumilus* ASH and its potential application in paper industry,» *Enzyme and Microbial Technology* , pp. 733-739, 2007.
- [16] G. Coman y G. Bahrim, «Optimization of xylanase production by *Streptomyces* sp P12-137 using response surface methodology and central composite design,» *Annals of Microbiology*, pp. 773-779, 2011.
- [17] R. Chander, M. Manchanda y A. Singh, «Optimization of xylanase production by a hyperxylanolytic mutant strain of *Fusarium oxysporum*,» *Process Biochemistry*, pp. 641-647, 1998 .
- [18] R. Muthezhilan, R. Ashok y S. Jayalakshmi, «Production and optimization of thermostable alkaline xylanase by *Penicillium oxalicum* in solid state fermentation,» *African Journal of Microbiology Research*, pp. 20-28, 2007.

