

Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química

“Deslignificación de residuos agroindustriales mediante el uso de *Phanerochaete chrysosporium* recombinante para la obtención de nanocristales de celulosa”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta

I.A. Francisco Santoyo Fexas

Dirigido por:

Dra. Sandra O. Mendoza Díaz

Co-dirigido por:

Dr. Miguel A. Gómez Lim

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Diciembre, 2019
México



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Posgrado de Alimentos del Centro de la República
(PROPAC)

“Deslignificación de residuos agroindustriales mediante el uso de *Phanerochaete chrysosporium* recombinante para la obtención de nanocristales de celulosa”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta

I.A. Francisco Santoyo Fexas

Dirigido por:

Dra. Sandra O. Mendoza Díaz

Co-dirigido por:

Dr. Miguel A. Gómez Lim

Dra. Sandra Olimpia Mendoza Díaz

Presidente

Dr. Miguel Ángel Gómez Lim

Secretario

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña

Vocal

Dra. Marcela Gaytán Martínez

Suplente

Dr. Gerardo Torres Delgado

Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

Diciembre, 2019

México

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, el amor de mi vida. Todo lo que hago es para y por ustedes.

A mis hermanas, mis compañeras de viaje.

A mis abuelos, mi inspiración.

A mi familia, que son un ejemplo a seguir.

A mis amigos, la familia que pude elegir.

A mis compañeros, que me levantaron y apoyaron.

A mi equipo de investigación, por todo el apoyo con la realización de los experimentos.

A mi directora, por la paciencia.

A mi comité, mis facilitadores de conocimiento y experiencia.

A mis profesores, que su vocación siga inspirando a otros.

Al CONACYT por el apoyo económico brindado durante la realización de este proyecto.

A la Universidad Autónoma de Querétaro por recibirme como un alumno más, por darme las facilidades para realizar este proyecto y que ahora podré llamar alma máter.

TABLA DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CUADROS	4
ÍNDICE DE FIGURAS	5
RESUMEN	6
SUMMARY	7
I. INTRODUCCIÓN	8
II. ANTECEDENTES	10
II.1 Materia Prima.....	10
II.1.1. Sorgo	10
II.1.2. Agave.....	11
II.2. Lignina	11
II.3. Celulosa	13
II.3.2. Nanocrisales de Celulosa (NCC)	14
II.4. Obtención de NCC.....	16
II.4.1. Pretratamientos	17
II.4.1.1. Procesos químicos.....	17
II.4.1.2. Procesos mecánicos	17
II.4.1.3. Otros procesos	17
II.4.2. Producción de NCC.....	17
II.5. <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	18
II.6. Enzimas deslignificantes.....	19
II.6.1. Lignina Peroxidasa.....	19
II.6.2. Manganese Peroxidasa	20
II.6.3. Peroxidasa versátil	21
II.6.4. Lacasa	21
II.7 Caracterización de los NCC.....	22
III. JUSTIFICACIÓN.....	24
IV. OBJETIVOS.....	25
IV.1. General.....	25
IV.2. Particulares	25
V. METODOLOGÍA	26
V.1. Materiales	26
V.1.1. Materiales biológicos	26

V.1.2. Materiales químicos.....	26
V.2. Métodos.....	26
V.2.1. Pretratamiento de las muestras.	26
V.2.2. Caracterización de la fibra	26
V.2.2.1. Cenizas	27
V.2.2.2. Humedad.....	27
V.2.2.3. Lignina	27
V.2.2.4. α -celulosa.....	28
V.2.2.5. Holocelulosa.....	28
V.2.2. Fermentación en estado sólido.....	28
V.2.3. Deslignificación mediante procesamiento químico.....	29
V.2.4. Blanqueamiento del material deslignificado.	30
V.2.5. Producción de los nanocristales de celulosa (NCC).	30
V.2.6. Análisis de la Celulosa y los Nanocristales de Celulosa.....	30
V.2.6.1. Difracción de Rayos X (DRX).....	30
V.2.7.2. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).....	31
V.2.7.3. Espectroscopía Infrarroja de reflectancia total atenuada con transformada de Fourier (ATR-FTIR)	31
V.2.7.4. TEM	31
V.3. Análisis estadístico	31
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
VI.1 Caracterización de materia prima.....	32
VI.2 Fermentación en estado sólido.....	33
VI.4 Análisis de celulosa aislada	40
VI.4.1 Espectroscopía de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier.....	40
VI.4.2 Difracción de Rayos X.....	41
VI.5 Análisis de producto de hidrólisis ácida de la celulosa	44
VI.5.1 Espectroscopía de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier.....	44
VI.5.2. Difracción de Rayos X.....	45
VI.5.3 Microscopía Electrónica de Barrido	46
VII. CONCLUSIONES	48
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	49

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Métodos reportados para obtención de nanocelulosa a partir de biomasa residual (Jawaid, Boufi, & Khalil, 2017).	15
Cuadro 2 Métodos utilizados para la caracterización de los NCC.	22
Cuadro 3. Análisis proximal de materia prima	32
Cuadro 4. Porcentajes de lignina durante las fermentaciones en estado sólido de la fibra de agave con la cepa control de <i>P. chrysosporium</i> y la transformante TF9 con ambos medios de cultivo.	34
Cuadro 5. pH durante las fermentaciones en estado sólido de la fibra de agave con la cepa control de <i>P. chrysosporium</i> y la transformante TF9 con ambos medios de cultivo.	36
Cuadro 6. Porcentajes de lignina durante las fermentaciones en estado sólido del tallo de sorgo con la cepa control de <i>P. chrysosporium</i> y la transformante TF9 con ambos medios de cultivo.	37
Cuadro 7. pH durante las fermentaciones en estado sólido del tallo de sorgo con la cepa control de <i>P. chrysosporium</i> y la transformante TF9 con ambos medios de cultivo.	38
Cuadro 8. Concentración de lignina en los distintos pasos de deslignificación y blanqueamientos de los tratamientos químico y biológico.	39
Cuadro 9. Cristalinidad de las distintas muestras de celulosa.	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de los monómeros primarios y sus correspondientes unidades estructurales en la lignina (Pollegioni et al., 2015).	12
Figura 2. Representación esquemática de la estructura de la lignina, mostrando los enlaces más comunes (Pollegioni et al., 2015).	13
Figura 3. Estructura básica de la celulosa mostrando la unidad de celobiosa (Trache et al., 2017)	14
Figura 4. Propiedades de los Nanocristales de Celulosa (Tang et al., 2017).	14
Figura 5. Metodología para la obtención de CNCs a partir de biomasa lignocelulósica (Espino et al., 2014).	16
Figura 6 Distintos métodos para el aislamiento de celulosa y preparación de NCC (Trache et al., 2017)	18
Figura 7. Phanerochaete chrysosporium degradando material lignolítico.	19
Figura 8. Mecanismo de reacción de LiP en un modelo de lignina con un compuesto éter β -aril arilglicerol (Pollegioni et al., 2015).	20
Figura 9. Ciclo catalítico de MnP (Pollegioni et al., 2015).	21
Figura 10. Ciclo catalítico propuesto de la Lacasa (Pollegioni et al., 2015).....	22
Figura 11. Cuerpo fructífero de <i>P. chrysosporium</i> TF9 en microscopio, objetivo 40X.	34
Figura 12. Espectro infrarrojo de las muestras de celulosa aislada.....	41
Figura 13. Lectura de difracción de rayos X (XRD) de muestras de celulosa de las distintas muestras y tratamientos.	42
Figura 14. Observación de celulosa aislada en SEM. A) TSB, B) TSQ, C) RAB, D) RAQ.	43
Figura 15. Espectro infrarrojo de las muestras de supuestos NCC.	44
Figura 16. Lectura de difracción de rayos X (XRD) de supuestas muestras de NCC de las distintas muestras y tratamientos.	46
Figura 17. Observaciones en TEM de supuestos NCC de las distintas muestras. A) RAB, B) RAC, C) TSB, D) TSC.	47

RESUMEN

En los últimos años ha tomado gran interés la obtención de Nanocristales de Celulosa (NCC) a partir de diferentes fuentes de origen vegetal, siendo estas procesadas químicamente para la obtención del producto final. Para la obtención de los NCC se utilizaron residuos agroindustriales de dos cultivos de interés en México debido a la alta generación de subproductos que estos conllevan: sorgo y agave azul. Este proceso químico involucra en la primera etapa la deslignificación de la materia prima, la cual de manera tradicional se lleva a cabo con la utilización de hidróxido de sodio en altas concentraciones. Para sustituir este proceso de deslignificación, se utilizó un hongo lignolítico recombinante, *Phanerochaete chrysosporium*, el cual tiene la capacidad de sobre expresar cuatro enzimas lignolíticas diferentes. Para la obtención y purificación de los NCC a partir de la celulosa aislada, se prosiguió con un tratamiento que consiste en una hidrólisis ácida seguida con sonicación, para eliminar las fracciones amorfas y obtener las cristalinas. Para la evaluación del rendimiento de obtención de NCC con el tratamiento biológico, se comparó con un control de cada una de las muestras, las cuales se deslignificaron y blanquearon con NaOH, ácido acético y NaClO₂, respectivamente. Para el procedimiento biológico se obtuvo un tiempo ideal de deslignificación de 8 días para ambos residuos, así como porcentajes de deslignificación de 69.51% para el residuo de agave y de 63.72% para el residuo de sorgo. Mediante DRX, SEM, TEM y FTIR se observó el correcto aislamiento de la celulosa por ambos métodos y en ambos residuos, así como las características de las nanoestructuras obtenidas. Para estas últimas se recomienda continuar con el experimento para perfeccionar la obtención de nanocristales.

Palabras clave: Lignina, Nanocristales de Celulosa, *Phanerochaete chrysosporium*, Agave, Sorgo.

SUMMARY

In the past few years, there has been a great interest for the production of Cellulose Nanocrystals (CNCs) from different vegetal sources, being these chemically treated for the final product obtention. For this work, there were used two agrowaste materials of interest for the obtention of CNCs, because of the high production of byproducts on their industries: sorghum and blue agave. The traditional chemical process involves a first stage delignification of the biomass, which is traditionally done with sodium hydroxide at high concentration. To substitute this process, a lignolytic recombinant fungus was used, *Phanerochaete chrysosporium* TF9, which has the ability to overexpress four different enzymes. Posterior to this biotechnological process, there was a bleaching treatment to isolate completely the cellulose, which was then submitted to an acid hydrolysis with posterior sonication for obtaining nanostructures and removing the amorphous fraction. For evaluating the yield of the biotechnological process, there was a control method with a traditional delignification process with NaOH and the same posterior bleaching treatment with NaOH, acetic acid and NaClO₂. For the biotechnological procedure, it was determined that the best treatment time was 8 days and it was achieved a 69.51% of delignification for Agave biomass and 63.72% for sorghum biomass. By XRD, SEM, TEM and FTIR analysis, there was observed the isolation of cellulose and also the production of nanostructures after the sulfuric acid hydrolysis. Further analysis in the CNCs production is recommended.

Keywords: Lignin, Cellulose Nanocrystals, *Phanerochaete chrysosporium*, Agave, Sorghum.

I. INTRODUCCIÓN

En las áreas de nanociencia y nanotecnología, ha incrementado el interés por la síntesis y modificación de nanomateriales con estructura definida y funcionalidad debido a sus diversas potenciales aplicaciones. Los avances recientes en los nanomateriales han llevado al desarrollo de nanopartículas funcionales, las cuales son prometedoras en diversos campos, tales como la medicina, la electrónica, el área de alimentos, la producción de biomateriales y la producción de energía. Debido a la preocupación por el medio ambiente y el desarrollo sustentable, existe una necesidad urgente por reemplazar las materias primas tradicionales y suplirlas con fuentes renovables.

Una de estas nanopartículas son los nanocristales de celulosa (NCC), los cuales se derivan de la hidrólisis ácida de materiales ricos en celulosa, tales como las plantas y los residuos agroindustriales. Los NCC son excelentes candidatos para el diseño de nanomateriales funcionales debido a sus diversas características, tales como su alta área superficial, la presencia de grupos hidroxilo para su funcionalización, su estabilidad coloidal, baja toxicidad, quiralidad y fuerza mecánica. Uno de sus usos más prometedores es la formación de las matrices poliméricas de nanocompositos, debido a que pueden proveerlos de un gran refuerzo (Brinchi, Cotana, Fortunati, & Kenny, 2013; Tang, Sisler, Grishkewich, & Tam, 2017).

En el área de alimentos, se ha propuesto usar los NCC como agente texturizante o sustituto de grasa (Habibi, Lucia, & Rojas, 2010), para la formación de emulsiones de Pickering (Tang et al., 2017), y para el desarrollo de empaques prácticos y biodegradables, sustituyendo el uso de derivados petroquímicos, combinándolos con PHVB (Ferreira, Mariano, Rabelo, Gouveia, & Lona, 2018; Mondal, 2017; Siqueira, Bras, & Dufresne, 2010). De igual manera se han generado películas solubles en agua para empaque de frutas y vegetales, mediante la combinación con goma guar, lo cual incrementa la firmeza de la película y disminuye la permeabilidad al oxígeno (Cheng, Zhang, Cha, Yang, & Jiang, 2016).

Para la obtención de NCC, en los últimos años se ha dado mucho enfoque en el aprovechamiento de diversos residuos agroindustriales, los cuales tienen alta concentración de celulosa. Por un lado, es una materia prima económica y por otro, su eliminación es simple (Brinchi et al., 2013). Estos residuos son considerados material lignocelulósico, por lo que para aislar la celulosa hay que retirar la lignina de la biomasa, lo cual implica varios retos.

En la actualidad, los procesos llevados a cabo para la deslignificación de residuos agroindustriales son llevados a cabo a pH extremo y a altas temperaturas, lo cual genera solventes orgánicos y compuestos fenólicos que resultan tóxicos. Por lo tanto, se propone la utilización de un hongo lignolítico, *Phanerochaete chrysosporium*, por su habilidad de descomponer matrices lignocelulíticas y remover compuestos tóxicos recalcitrantes por medio de la secreción de enzimas, tales como la Manganese Peroxidase (MnP), Lignin Peroxidase (LiP), Peroxidase Versátil (VP) y Lacasa (LP) (Coconi-Linares et al., 2014; Coconi-Linares, Ortiz-Vázquez, Fernández, Loske, & Gómez-Lim, 2015; Coconi-Linares, Fernández, Loske, & Gómez-Lim, 2018)

Desafortunadamente, el método biológico aún no es comercialmente viable debido a la baja velocidad de despolimerización de la lignina y la baja diversidad y producción de enzimas clave para la degradación de la biomasa. Por lo tanto, una alternativa atractiva para mejorar la degradación de la lignina es la sobreproducción de enzimas lignolíticas en huéspedes de una sola especie bajo condiciones de cultivo ya consolidadas para el proceso. Esta aproximación permite el incremento de la fermentación de la biomasa lignocelulítica, donde se pretende utilizar el hongo *Phanerochaete chrysosporium* recombinante (cepa TF9), el cual ha demostrado de manera exitosa la sobreexpresión de las cuatro enzimas clave para la deslignificación: MnP, LiP, VP y LP, y ha sido probada en un estudio con bagazo de caña para la posterior producción de biodiesel (Coconi-Linares et al., 2018, 2015).

II. ANTECEDENTES

II.1 Materia Prima

Algunos subproductos agroindustriales que representan una potencial fuente de NCC en México son los derivados de los cultivos de sorgo, y agave. Estos residuos se consideran lignocelulósicos, y se encuentran dentro de las distintas fuentes para la obtención de NCC, entre las cuales podemos encontrar también las fuentes animales, de algas, bacterias y tunicados. Estas fibras lignocelulósicas son consideradas una de las mejores fuentes para el aislamiento de NCC, pero también hay distintos factores a tomar en cuenta como la composición química y la estructura interna para las propiedades finales del producto (Trache, Hussin, Haafiz, & Thakur, 2017). Las materias primas propuestas para la obtención de los NCC se desglosan a continuación.

II.1.1. Sorgo

El peso seco de los residuos agrícolas del sorgo constituye aproximadamente el 74% de la cosecha, entre estos residuos se encuentran los tallos, el forraje y grandes cantidades de biomasa (Idris, Pandey, Rao, & Sukumaran, 2017). De acuerdo con la SAGARPA, en México se cultivan tres tipos de sorgo que se diferencian por el uso que se le da a la producción. El sorgo grano es el más sembrado (5,195,388.74 Ton) y abastece a la industria de alimentos balanceados para la ganadería; le sigue el sorgo forrajero (3,218,392.02 Ton) que se utiliza como forraje verde o seco y, finalmente, el sorgo escobero (7,596.08 Ton), cuya espiga es utilizada para la fabricación de escobas. Dependiendo de los diferentes cultivos de sorgo, serán los desechos que se obtendrán, pero en general representa un problema de contaminación. Este subproducto puede ser utilizado para la producción de NCC ya que el bagazo cuenta con un contenido reportado de celulosa aproximado del 50% en peso seco (Qiu, Yadav, & Yin, 2017).

II.1.2. Agave

Las bebidas alcohólicas tales como pulque, mezcal y tequila se obtienen de diferentes variedades de maguey o agave, planta suculenta producida principalmente en Jalisco, Guanajuato, Oaxaca, Nayarit, Michoacán y Tamaulipas. Para el caso de agave azul, por cada kg cosechado se producen 0.12 kg de residuos en base seca y en 2015 se produjeron 103,114.8 ton de bagazo (CRT, 2015; SIAP, 2016). La producción de tequila se ha visto incrementada de manera importante en los últimos años, en 2017 se destinaron 956.7 mil toneladas de agave y en lo que va del 2018 se han destinado 186 mil toneladas (CRT, 2017), lo cual ilustra la alta cantidad de bagazo generado. El bagazo de agave se usa como combustible para calderas, forraje, material de construcción y relleno de muebles. Sin embargo, usos como forraje y el material de construcción no son totalmente conveniente debido a la baja digestibilidad para la nutrición animal y su baja homogeneidad con la arcilla (Escoto et al., 2006), mientras que su uso como combustible representa una fuente de contaminación y el relleno de muebles sólo se practica de manera regional. Por ello, la utilización del bagazo de maguey para otros fines como la producción de NCC es muy atractiva.

II.2. Lignina

El término lignina deriva del latín “lignum” el cual significa madera. Esta representa uno de los tres componentes de la biomasa lignocelulósica, en conjunto con la celulosa y la hemicelulosa. La lignina es el segundo polímero más abundante en la naturaleza y se producen industrialmente al año aproximadamente 5×10^6 toneladas de lignina.

Químicamente es un material macromolecular reticulado derivado del emparejamiento oxidativo de monolignoles, principalmente alcoholes hidroxicinamilo; los tres mayores componentes son los alcoholes *p*-cumaril, coniferil y sinapil (Figura 1).

Las ligninas muestran composiciones específicas para cada planta, con motivos y pesos moleculares que varían dependiendo de la planta y los factores ambientales. La lignificación se obtiene mediante reacciones de reticulación de los

monómeros de lignina o mediante acoplamiento polímero-polímero mediante los radicales producidos mediante oxidasas. Los enlaces más comunes presentes en la estructura de la lignina son β -O-4, β -5, β - β , 5-5, 5-O-4 y β -1 (Figura 2).

Como resultado de su compleja estructura, casi el 98% de este polímero se quema como fuente de energía en la industria de papel. Por lo tanto, un gran reto biotecnológico es desarrollar tecnologías sustentables para convertir esta biomasa de residuo en biocombustibles, químicos y nuevos biomateriales (Abe, Dusek, & Kobayashi, 2010; Eriksson & Bermek, 2009; Pollegioni, Tonin, & Rosini, 2015).

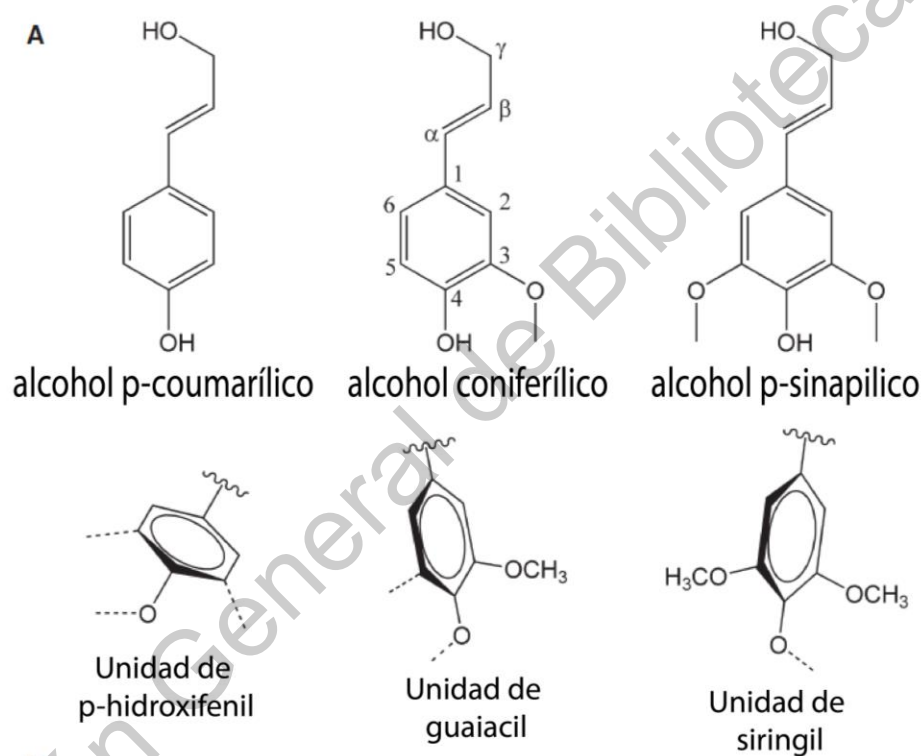


Figura 1. Estructura de los monómeros primarios y sus correspondientes unidades estructurales en la lignina (Pollegioni et al., 2015).

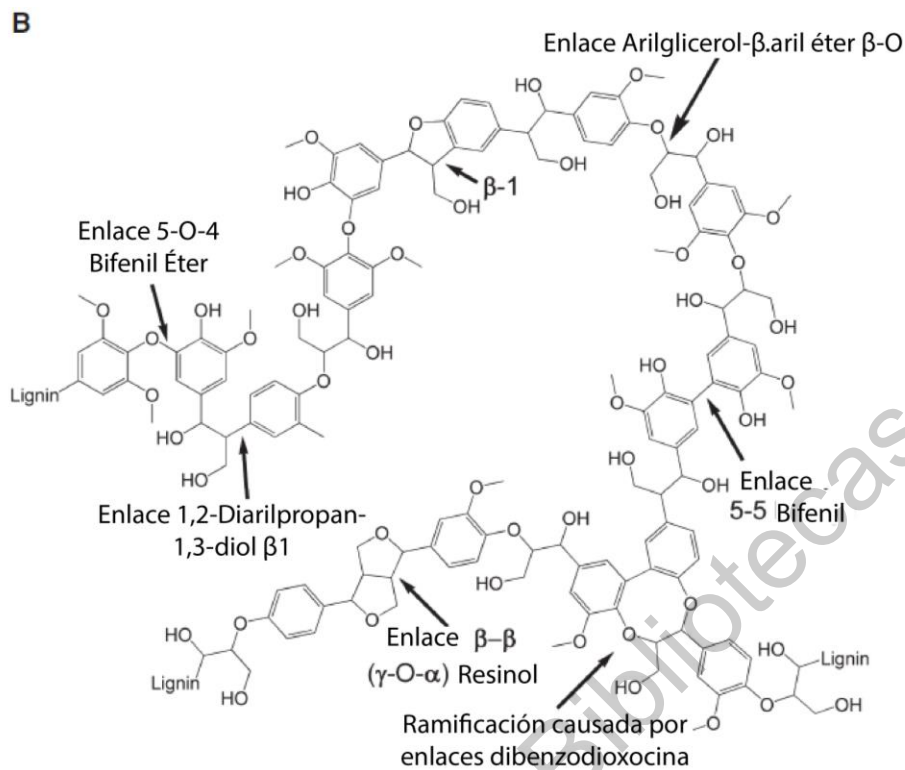


Figura 2. Representación esquemática de la estructura de la lignina, mostrando los enlaces más comunes (Pollegioni et al., 2015).

II.3. Celulosa

La celulosa es el polímero natural más abundante en la biósfera, con una producción global aproximada de 1.5×10^{12} toneladas al año. El uso de la celulosa como materia prima renovable y biodegradable en diversas aplicaciones es una solución que se propone para enfrentar los problemas ambientales y de reciclaje actuales.

La celulosa se encuentra distribuida en la naturaleza, ya sea en plantas, animales, algas, hongos y minerales. De todas estas, la mayor fuente de celulosa son las fibras de las plantas. Esta contribuye aproximadamente al 40% de la fracción de carbón de las plantas, sirviendo como elemento estructural en la compleja arquitectura de sus paredes celulares. La celulosa puede ocurrir de manera pura en las plantas, pero usualmente se encuentra acompañada de hemicelulosa, lignina y pequeñas cantidades de extractivos.

Independientemente de su fuente, la celulosa consiste de unidades de D-glucopiranosas unidas mediante enlaces β 1-4 glucosídicos (Figura 3). La celobiosa, con una longitud de 1.3 nm puede considerarse la unidad de repetición de la celulosa, al contener dos unidades de D-glucopiranosas (Rojas, 2016; Wüstenberg, 2015).

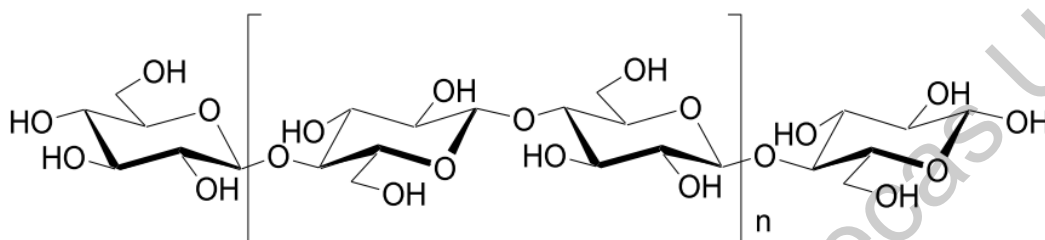


Figura 3. Estructura básica de la celulosa mostrando la unidad de celobiosa (Trache et al., 2017)

II.3.2. Nanocristales de Celulosa (NCC)

Los nanocristales de celulosa (NCC) consisten de partículas de celulosa en forma de esfera o agujas, transparentes, de bajo peso, de alta cristalinidad y resistencia, teniendo una dimensión igual o menor a 100nm. Estas partículas se obtienen usualmente a partir de hidrólisis ácida o enzimática controlada de cualquier fuente de celulosa y sus dimensiones van de 100-500 nm de largo o 10-20 nm de ancho. Van a poseer distinta geometría dependiendo de su fuente biológica. En la Figura 4 se muestran algunas de las propiedades de los NCC (Tang et al., 2017).

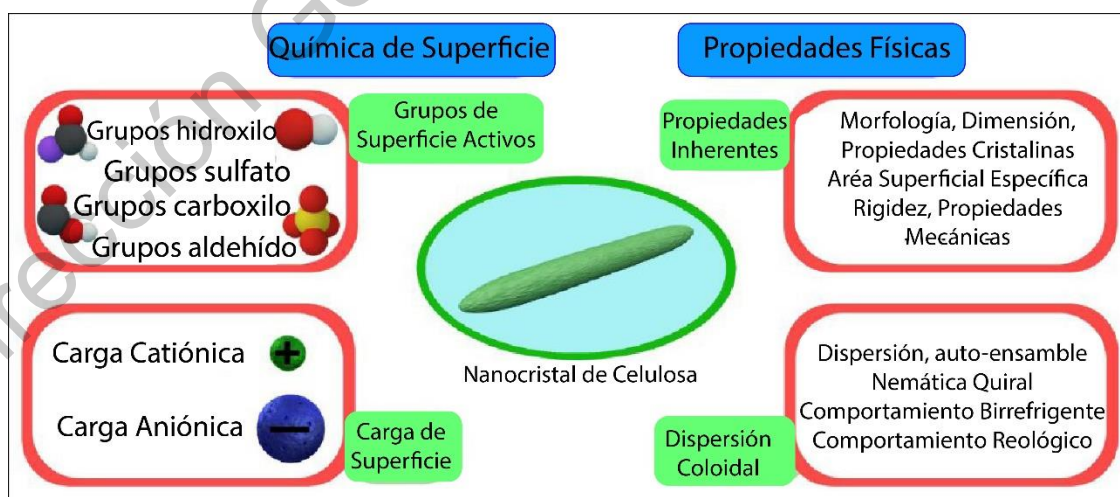


Figura 4. Propiedades de los Nanocristales de Celulosa (Tang et al., 2017).

En el Cuadro 1 se muestran las fuentes de biomasa residual reportados donde se han obtenido nanocelulosa, así como su procedimiento de obtención:

Cuadro 1. Métodos reportados para obtención de nanocelulosa a partir de biomasa residual (Jawaid, Boufi, & Khalil, 2017).

Biomasa residual	Procedimiento de obtención
Cascarilla de arroz y <i>Arundo donax</i>	Lixiviación ácida, tratamiento alcalino e hidrólisis sulfúrica concentrada
Rastrojo de maíz	Extracción química, blanqueamiento e hidrólisis ácida
Tallos de girasol	Tratamiento de explosión con vapor y procedimiento de hidrólisis
Fibras del cáñamo de <i>Carmagnola</i>	Tratamiento químico y de pectinasa seguido de hidrólisis ácida
Tronco de Palma	Hidrólisis ácida
Residuo de tela de algodón	Hidrólisis ácida
Fibras de chile	Hidrólisis ácida
Madera	Tratamiento iónico
Residuo de mazorca de maíz	Hidrólisis sulfúrica, hidrólisis con ácido fórmico, Oxidación mediada por TEMPO y refinamiento de pulpa
Cascarilla de avena	Tratamiento químico con cloruro de sodio e hidróxido de potasio, seguido de hidrólisis ácida
Pulpa de bagazo de caña de azúcar	Hidrólisis sulfúrica
Paja de trigo y cascarilla de soya	Tratamiento químico-mecánico
Fibra de coco	Tratamiento químico mecánico seguido de blanqueamiento y homogenización
Fruta de palma de aceite	Hidrólisis sulfúrica
Celulosa de madera dura	Pretratamiento oxidativo con sistema TEMPO
Madera, bambú, pajilla de trigo	Tratamiento químico-ultrasónico
Fibra de cascarilla de nuez de Areca	Tratamiento con álcali, hidrólisis ácida y blanqueamiento mecánico mediante molienda y homogenización
Cáscara de plátano	Hidrólisis ácido-básica
Paja de ajo	Tratamiento básico y blanqueamiento seguido de hidrólisis sulfúrica
Paja de <i>Xanthoceras sorbifolia</i>	Agitación mecánica asistida con ultrasonificación seguida de hidrólisis sulfúrica
Cáscara de maíz	Extracción química, blanqueamiento seguido de hidrólisis sulfúrica
Rastrojo de maíz	Extracción química, blanqueamiento seguido de hidrólisis ácida
Residuo de algodón	Hidrólisis ácida sin despulpado
Fibras de algodón	Hidrólisis ácida
Pulpa de bambú	Hidrólisis catalizada por FeCl ₃ asistida con ultrasonificación
Residuo de tela de algodón	Hidrólisis ácida

Residuo de camote	Hidrólisis sulfúrica acompañada de sonicación y homogenización
Fibras de bagazo de caña	Hidrólisis enzimática seguida de sonicación
Madera de álamo	Pretratamiento químico seguido de sonicación de alta intensidad
Fibras de hoja de piña	Explosión de vapor acoplada a tratamiento ácido
Polvo de celulosa microcristalina	Hidrólisis ácida
Cascarilla de soya	Hidrólisis sulfúrica

II.4. Obtención de NCC

La obtención de NCC a partir de materia celulósica ocurre en dos etapas, las cuales se muestran en la Figura 5. La primera es un pretratamiento del material, donde se remueven de manera completa los materiales de la matriz (hemicelulosa, lignina, etc.) y se aíslan las fibras de celulosa. El segundo paso consiste en un tratamiento químico controlado, generalmente hidrólisis, para remover las regiones amorfas del polímero de celulosa (Figura 5) (Brinchi et al., 2013).

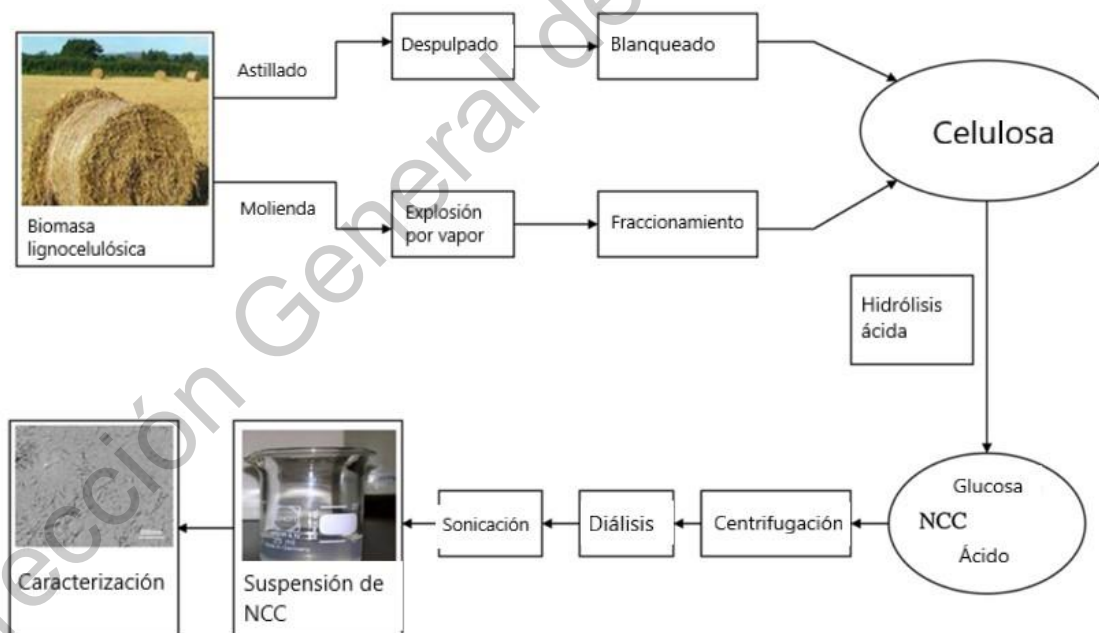


Figura 5. Metodología para la obtención de CNCs a partir de biomasa lignocelulósica (Espino et al., 2014).

II.4.1. Pretratamientos

II.4.1.1. Procesos químicos

Para el procesamiento químico, los métodos más comunes se basan en el proceso de Kraft, el cual utiliza hidróxido de sodio (NaOH) y sulfuro de sodio (Na₂S), seguido de un paso de blanqueamiento que puede involucrar dióxido de cloro (ClO₂), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), ozono (O₃) o ácido peracético. La extracción de Kraft sirve para la solubilización de la mayoría de la lignina y de la hemicelulosa, mientras que el blanqueamiento es utilizado para degradar los compuestos fenólicos con grupos cromóforos presentes en la lignina y para eliminar los subproductos generados por el rompimiento (Trache et al., 2017).

II.4.1.2. Procesos mecánicos

Estos métodos consumen altas cantidades de energía, y demandan generalmente altos niveles de presión o energía cinética. El producto, derivado del despulpado mecánico, comúnmente presenta composición general a la materia prima original. Algunos de estos métodos son la homogeneización a altas presiones, micro fluidización, criomolienda, ultra sonicación de alta intensidad y transformación en polvo (Trache et al., 2017).

II.4.1.3. Otros procesos

En los últimos años los procesos biológicos y enzimáticos han recibido la atención de algunos investigadores. Estos métodos dependen de la habilidad de ciertos microorganismos y las enzimas que secretan para atacar directamente la celulosa y cambiar la interfase entre la lignina y celulosa, para facilitar la remoción de la fracción de hemicelulosa asociada a la lignina. Estos procesos simplifican la extracción de la celulosa purificada con menor degradación y pulpas con mayor calidad (Trache et al., 2017).

II.4.2. Producción de NCC

El procedimiento general para la producción de NCC mediante hidrólisis ácida, después del pretratamiento deslignificante, consiste en los siguientes pasos (Brinchi et al., 2013):

1. Hidrólisis ácida del material celulósico puro bajo estrictas condiciones de temperatura, tiempo, agitación y con control de otras condiciones tales como la naturaleza y concentración del ácido y la relación de ácido-celulosa.
2. Dilución con agua para detener la reacción y lavados repetidos seguido de centrifugación.
3. Diálisis extendida contra agua destilada para remover moléculas de ácido libres.
4. Tratamiento mecánico, usualmente sonicación, para dispersar los nanocristales como una suspensión estable y uniforme.
5. Concentración y secado de la suspensión para producir CNC sólidos.

En la Figura 6 se desglosan tanto los métodos para aislamiento de celulosa como los de preparación de NCC.

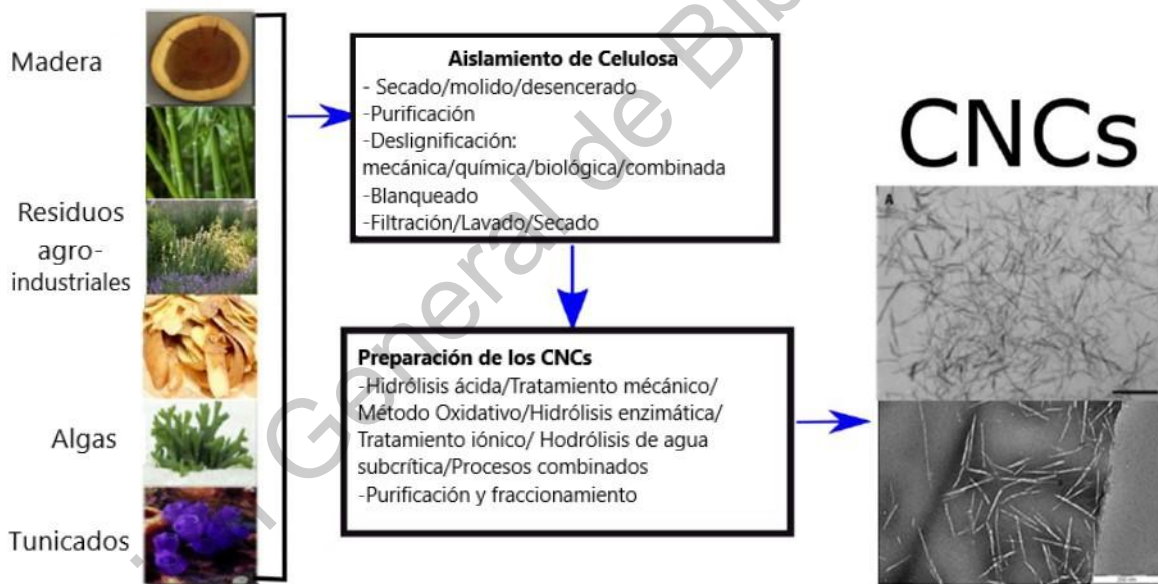


Figura 6 Distintos métodos para el aislamiento de celulosa y preparación de NCC (Trache et al., 2017)

II.5. *Phanerochaete chrysosporium*

Phanerochaete chrysosporium es un basidiomiceto pertenece a un grupo de hongos lignolíticos que secreta diversas enzimas oxido reductoras, incluyendo la Lignina Peroxidasa (LiP), Manganeso Peroxidasa (MnP), Peroxidasa Versátil (VP) y Lacasa (Lac). Este hongo es capaz de degradar compuestos aromáticos, pero en

especial, a la lignina, convirtiéndola a dióxido de carbono para así ganar acceso a los polímeros ricos en carbohidratos de las paredes celulares de las plantas (Martinez et al., 2004).

Phanerochaete chrysosporium ha sido el organismo modelo de los hongos lignolíticos para la degradación de lignina. Su sistema lignolítico se activa principalmente por la falta de nitrógeno, pero también puede ser activado por la falta de sulfuro o carbono (Kirk, Schultz, Connors, Lorenz, & Zeikus, 1978).

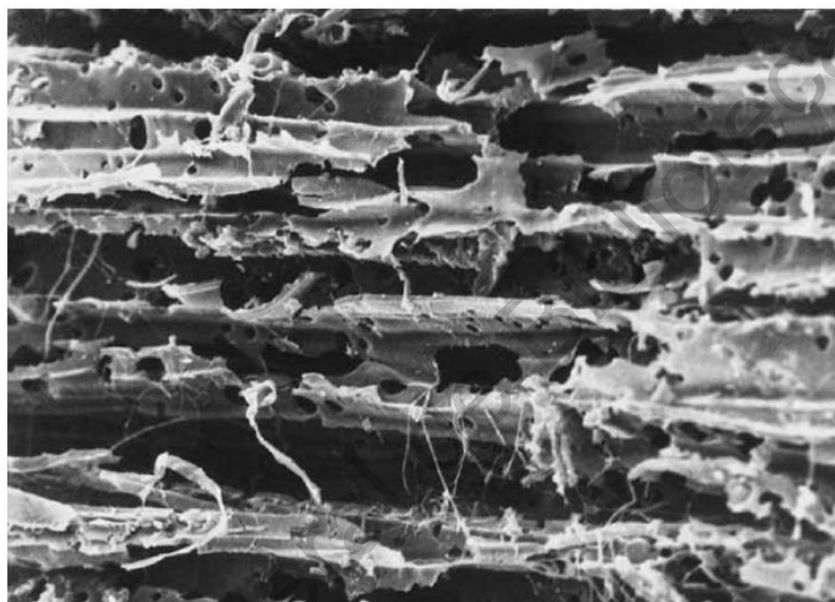


Figura 7. *Phanerochaete chrysosporium* degradando material lignolítico.

II.6. Enzimas deslignificantes

A lo largo de los años, se han reportado cuatro actividades enzimáticas capaces de despolimerizar paredes de lignina, tres peroxidases extracelulares: LP, MnP, VP y las lacasas. Estas enzimas han ganado atención debido a su capacidad de catálisis biológica en la biodegradación de material lignocelulítico (Pollegioni et al., 2015).

II.6.1. Lignina Peroxidasa

La LiP es una glicoproteína con un peso molecular de 38-46 kDa y pI de 3.2-4.0, la cual contiene un ión de hierro protoporfirina IX por cada mol de proteína y cataliza la despolimerización de lignina oxidativa dependiente de H₂O₂. Es

responsable también de la ruptura de enlaces éter β -O-4 y de los enlaces C α -C β en la lignina. Esta enzima presenta un gran potencial redox ($E_0 \approx 1.2V$), lo que le permite catalizar la oxidación de compuestos aromáticos no fenólicos incluso en la ausencia de un mediador. Un ejemplo de reacción catalizada por la LiP se muestra en la Figura 8 (Eriksson & Bermek, 2009; Pollegioni et al., 2015).

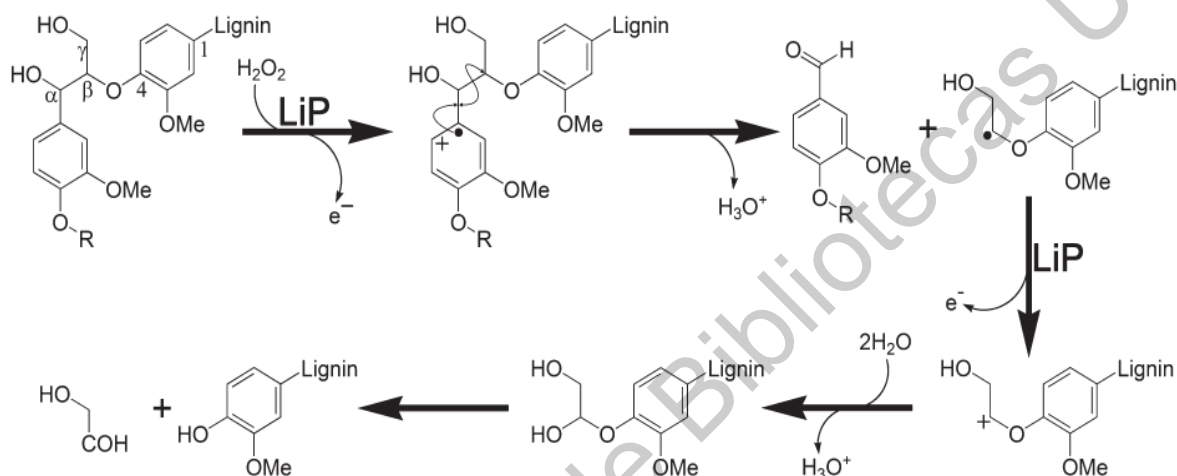
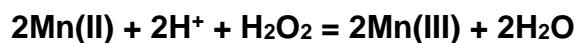


Figura 8. Mecanismo de reacción de LiP en un modelo de lignina con un compuesto éter β -aril arilglicerol (Pollegioni et al., 2015).

II.6.2. Manganeso Peroxidasa

La Manganeso Peroxidasa (MnP) es una hemoproteína glicosilada con un peso molecular de 40-50 kDa y representa la peroxidasa modificadora de lignina más producida comúnmente y es secretada por la mayoría de los basidiomicetos colonizadores de madera. La MnP cataliza la siguiente reacción:



La MnP es la única hemoperoxidasa con un mecanismo de reacción oxidativo con un solo electrón Mn^{2+} como se muestra en la Figura 9 (Pollegioni et al., 2015).

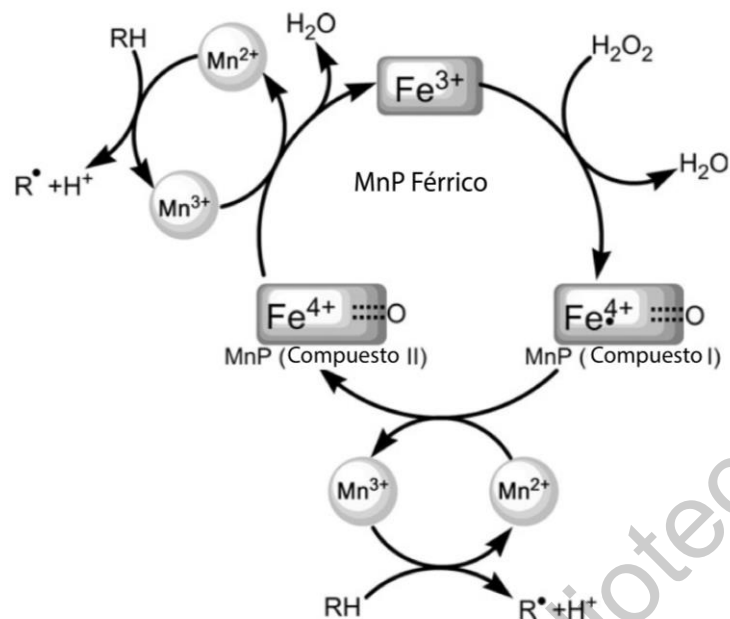


Figura 9. Ciclo catalítico de MnP (Pollegioni et al., 2015).

II.6.3. Peroxidasa versátil

La Peroxidasa versátil se caracteriza por una gran preferencia de sustrato y por compartir características con las familias de MnP y LiP. Aunque no se encuentra de manera natural en *Phanerochaete chrysosporium*, la cepa recombinante con la que se plantea trabajar sí puede expresar esta enzima (Coconi-Linares et al., 2014).

Dentro de esta enzima se han encontrado tres rutas putativas de alto alcance de transferencia de electrones para oxidar sustratos aromáticos con alto potencial redox. El modelo del ciclo catalítico de la VP implica la presencia de dos formas enzimáticas, por lo cual es capaz de realizar la oxidación del alcohol veratril y de ionizar Mn²⁺ como la MnP (Pollegioni et al., 2015).

II.6.4. Lacasa

La lacasa es una polifenol oxidasa que cataliza la siguiente reacción:



Las lacasas fúngicas se pueden encontrar como isoenzimas intra y extracelulares, difiriendo de su estado oligomérico y su nivel de glicosilación (10-45%). La lacasa en cuestión contiene cuatro iones de cobre en tres sitios diferentes.

En la forma de descanso de la enzima estos iones se encuentran en estado de oxidación +2 (Pollegioni et al., 2015). El ciclo catalítico propuesto para esta enzima se muestra en la Figura 10.

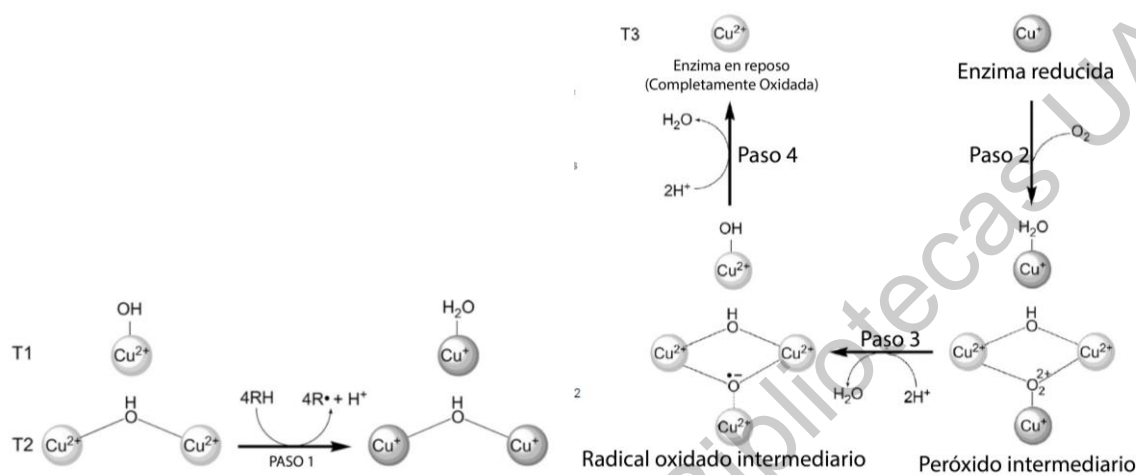


Figura 10. Ciclo catalítico propuesto de la Lacasa (Pollegioni et al., 2015).

II.7 Caracterización de los NCC

La caracterización de los NCC nos va a permitir conocer su calidad, rendimiento, así como sus potenciales aplicaciones. En el Cuadro 2 se muestran los métodos utilizados para la caracterización de los NCC.

Cuadro 2 Métodos utilizados para la caracterización de los NCC.

Método	Fundamento
Difracción de Rayos X (DRX)	Esta técnica utiliza la difracción de rayos X sobre muestra microcristalina, donde idealmente toda posible orientación cristalina se representa equitativamente. La orientación promedio resultante causa que el espacio tridimensional estudiado pueda ser estudiado en una sola dimensión considerando una sola difracción, lo que le da una huella única al material.
Análisis Termogravimétrico (TGA)	Técnica mediante la cual la masa de una sustancia se monitorea como una función de la temperatura o tiempo mientras la muestra se somete a un programa de temperatura controlada en una atmósfera controlada, por lo que su estado cambia.

Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	Técnica microscópica que involucra la creación de un haz de electrones energéticos enfocado finamente sobre una fuente de electrones. Después de la emisión de la fuente y la aceleración a alta energía, el haz de electrones se modifica mediante lentes y bobinas electromagnéticas que actúan sucesivamente para reducir el diámetro del haz y para escanear las interacciones de este mismo con el espécimen, lo cual genera una señal que es capaz de digitalizarse y generar un elemento visual.
Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)	Técnica microscópica mediante la cual un haz de electrones se transmite a través de una especie para formar una imagen. Esta especie tiene que ser especialmente delgada, menor a los 100nm, para poder generar esta imagen, la cual es generada a partir de la interacción de los electrones con la especie y se magnifica mediante pantallas fluorescentes, película fotográfica y un sensor con carga.
Espectroscopía Infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR)	Es un método de espectroscopía infrarroja, donde la radiación infrarroja pasa a través de la muestra. Una parte de esta radiación es absorbida por la muestra y otra pasa a través de ella (se transmite). El espectro resultante representa la absorción y transmisión molecular, creando una huella molecular única de la muestra. Ayuda a identificar materiales desconocidos, la calidad o consistencia de una muestra o la cantidad de componentes en una mezcla.

III. JUSTIFICACIÓN

Los NCC son un producto de alto valor agregado con uso potencial en la industria de alimentos, y actualmente la obtención de estos se lleva a cabo mediante un proceso químico que a gran escala resulta altamente contaminante, debido a la utilización de álcali en altas concentraciones, así como altas temperaturas lo cual conlleva igualmente a un uso de agua excesivo. Para evaluar la disminución del impacto ambiental del proceso, se propone la utilización de una cepa de *Phanerochaete chrysosporium* recombinante, hongo capaz de la deslignificación de la materia lignocelulítica en la primera etapa del proceso de obtención de NCC, así como el aprovechamiento de diversos residuos agroindustriales presentes en México, los cuales no están siendo explotados en su máximo potencial, tales como los residuos de la industria tequilera y del sorgo.

IV. OBJETIVOS

IV.1. General

- Obtener y caracterizar NCC a partir de los residuos agroindustriales del agave y sorgo mediante la utilización de *Phanerochaete chrysosporium* para la etapa de deslignificación.

IV.2. Particulares

- Deslignificar los residuos agroindustriales del arroz, agave y sorgo mediante la utilización de *Phanerochaete chrysosporium*.
- Deslignificar los residuos agroindustriales del arroz, agave y sorgo mediante el proceso químico tradicional.
- Obtención de los NCC mediante la utilización del proceso de hidrólisis ácida tradicional.
- Caracterización de los NCC obtenidos, tanto por el proceso biológico como químico, para comparar eficiencias de producción y calidad.

V. METODOLOGÍA

V.1. Materiales

V.1.1. Materiales biológicos

La fibra de bagazo de agave azul (*Agave tequilana* Weber var. azul) fue proporcionado por Biosolutions (Biosolutions Plastics, San Pedro Garza García, NL, México). La fibra de sorgo fue obtenida en una parcela de cultivo de sorgo en Guanajuato, México. La cepa seleccionada para este trabajo fue *P. chrysosporium* TF9 recombinante, la cual sobreexpresa las oxidorreductasas MnP1, LiPH8, VPL2 y LAC111b, desarrollada por el grupo de trabajo del Dr. Miguel Ángel Gómez Lim, CINVESTAV Irapuato (Coconi-Linares et al., 2018).

V.1.2. Materiales químicos

El Hidróxido de Sodio, el ácido sulfúrico y el ácido acético glacial se adquirieron de JT Baker (Mallinckrodt Baker, Inc., Phillipsburg, NJ, USA). El clorito de sodio y la membrana para diálisis se adquirieron de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis MO, USA). El medio PDA es de MCD LAB (MCDLAP S.A. de C.V., Oaxaca, México). El medio Czapek fue preparado utilizando sacarosa (30.0 g/L), nitrato de sodio (2.0 g/L), fosfato de dipotasio (1.0 g/L), sulfato de magnesio (0.5 g/L), cloruro de potasio (0.5 g/L), sulfato ferroso (0.01 g/L) a pH 7.3 a 25°C. Otros químicos y solventes usados en los experimentos fueron de grado analítico.

V.2. Métodos

V.2.1. Pretratamiento de las muestras.

Los subproductos se lavaron con agua destilada 3 veces durante 10 minutos para la remoción del polvo e impurezas solubles. Las muestras se secaron a 50°C durante 24 horas en un horno de convección y almacenaron en bolsas de polietileno para su posterior utilización. Posteriormente, se redujo el tamaño de las fibras y se molieron en un molino de café, pasando por un tamiz de 20 µm (Espino et al., 2014).

V.2.2. Caracterización de la fibra

El contenido de humedad y ceniza fue determinado de acuerdo a la metodología de la AOAC (2000).

V.2.2.1. Cenizas

Se llevó a peso constante un crisol en mufla a 550°C para pesar 5g de muestra, posteriormente se calentó en mechero hasta que se dejaron de producir humos y luego se colocó dentro de la mufla calentando a 550°C hasta llegar a peso constante con la muestra completamente calcinada. Se utilizó la siguiente ecuación

$$\% \text{Cenizas} = \frac{P_{\text{ceniza}}}{P_{\text{muestra}}} \times 100$$

V.2.2.2. Humedad

Se llevó a peso constante un crisol en horno durante 3 horas. Posteriormente, 5g de muestra húmeda se pesaron en el crisol y se calentó entre 3 y 6 horas a 105 °C hasta peso constante. Se utilizó la siguiente ecuación:

$$\% \text{Humedad} = \frac{P_{\text{crisol+muestra húmeda}} - P_{\text{crisol+muestra seca}}}{P_{\text{muestra húmeda}}} \times 100$$

V.2.2.3. Lignina

El contenido de lignina fue determinado por las metodologías de la NREL/TP-510-42619 y NREL/TP-510-42618. Brevemente, se pesaron 300 mg de muestra en un frasco para esterilizar, se añadieron 3 mL de H₂SO₄ al 72% y se mezcló. Se llevó a baño a 30°C durante 1h, agitando cada 10 minutos para garantizar una hidrólisis uniforme. Terminando los 60 minutos, se añadieron 84 mL de agua desionizada, llevando la concentración del ácido al 4%, mezclando bien para homogeneizar. La mezcla de reacción se colocó en una autoclave a 121°C durante 1 hora. Terminando este tiempo, se pasaron los tubos a baño de hielo hasta llegar a temperatura ambiente. Se filtró el hidrolizado con constantes lavados de agua caliente en crisoles con filtro. Finalmente, se secó a 105°C la fracción sólida hasta peso constante. La lignina se calculó con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Lignina} = A \cdot 100 / W$$

Donde:

A= Pero de la lignina en gramos

W= Peso seco de la muestra en gramos

V.2.2.4. α -celulosa

El contenido de celulosa fue determinado de acuerdo a lo descrito por Mariano, Cercená, & Soldi et al, (2016). La α -Celulosa es la fracción de holocelulosa insoluble en NaOH 17.5% bajo ciertas condiciones. 0.5g de fibra fue colocada en un matraz donde 6 mL de una solución de NaOH al 17.5% se adiciono durante 10 minutos. La muestra se dejó reposar por otros 3 minutos. Posteriormente se añadieron 5 mL de la misma solución de NaOH y se agitó la solución durante 30 min. 15 mL de agua destilada se adicionaron y se agitó durante otros 30 minutos. La suspensión se filtró a través de un filtro de vidrio no. 2 y se lavó con una solución de NaOH 8.5% y una solución diluida de ácido acético. El filtrado se secó durante 4 horas a 105°C y la cantidad de α -celulosa se determinó por análisis gravimétrico de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de } \alpha - \text{celulosa} = \frac{\text{peso de } \alpha - \text{celulosa}}{\text{peso inicial de la muestra}} \times 100$$

V.2.2.5. Holocelulosa

La holocelulosa se determinó según la metodología de la American Standard D1104-56 descrita por Hakiri Acma et al., 2014. Se pesó 1g de la muestra en un matraz Erlenmeyer de 250 mL y se añadieron 150 mL de agua destilada (previamente calentada a 70°C). Con constante agitación, se añadieron 1g de NaClO₂ y 0.2 mL de ácido acético. Esta mezcla se llevó a 70°C durante 1h. Se añadió otro gramo de NaClO₂ y 0.2 mL de ácido acético cada hora 3 veces (4 horas) o hasta que la muestra se encontraba completamente blanca. Se detuvo la reacción en hielo y se filtró el material al vacío y lavó con agua destilada repetidas ocasiones. Se secó a 105 °C hasta peso constante.

La hemicelulosa fue calculada por la diferencia entre holocelulosa y hemicelulosa.

V.2.2. Fermentación en estado sólido

Se propagaron las cepas del hongo *Phanerochaete chrysosporium* y la cepa recombinante TF9 proporcionadas, evitando esporulación, en placas Petri a 25°C

en Agar Papa Dextrosa durante 8 días (Dong, Yang, Zhu, Wang, & Yuan, 2013). Las placas no utilizadas se almacenaron a 4°C hasta su posterior utilización.

Para determinar el mejor proceso de fermentación, se propusieron dos medios utilizados previamente para fermentación en estado sólido de distintos sustratos con cepas de *Phanerochaete chrysosporium* por Dong et al., (2013) y Coconi Linares et al., (2018).

Para preparar el medio propuesto por Coconi et al., se adicionaron en 100 mL de agua estéril 0.5g de nitrato de sodio (0.5%), 0.1g de cloruro de manganeso (0.1%) y 0.1g de tiamina (0.1%). Para la metodología de Dong et al. se preparó el medio Czapek como se describió previamente. En matraces Erlenmeyer de 250 mL se añadieron 5 g de biomasa. Para la metodología de Coconi et al. se añadieron 5 mL de medio (1:1) y para la metodología de Dong et al. se añadieron 10 mL de medio (1:2) según lo reportado por los autores. Todos los matraces se esterilizaron a 121°C durante 1 hora.

Posteriormente, para preparar el inóculo se realizaron 6 cortes de 5 mm de diámetro de micelio fresco. Se inocularon los matraces con los cortes de agar y se incubó durante 10 días a 37°C. Durante estos 10 días se mezcló manualmente el contenido cada dos días ya que el sustrato se compacta con el micelio. De igual manera si se observaba que se deshidrataba el sustrato, se añadían 2 mL de agua destilada estéril para rehidratación.

En todos los casos existió un control sin inocular y se realizó el experimento por triplicado.

Se realizó muestreo cada 2 días, donde la biomasa se diluyó en una mezcla de ácido acético:ácido nítrico (8:1) agitando moderadamente durante 1 h para posteriormente filtrar a través de papel filtro No. 1, todo esto para remover el micelio del hongo. La fracción sólida se secó en horno a 80°C hasta obtener peso constante y se evaluó el contenido de lignina y se determinó el pH.

V.2.3. Deslignificación mediante procesamiento químico.

500 mL de una solución de NaOH al 2% se agregaron a 25 g de muestra. Se la mezcla se calentó a 100°C durante 4 horas, con agitación constante. La pulpa

resultante se filtró y lavó hasta la neutralidad. Se secó durante 12 h a 50°C en un horno de convección (Santos et al., 2013).

V.2.4. Blanqueamiento del material deslignificado.

Posterior al tratamiento alcalino y a las fermentaciones, el material fue blanqueado para remover los remanentes de lignina y holocelulosa con una solución preparada en partes iguales (v:v) de una solución amortiguadora de acetato (27g NaOH y 75 mL ácido acético glacial, diluidos en 1L de agua) y una solución acuosa de clorito de sodio (1.7% pv de NaClO₂ en 1L de agua). El tratamiento alcalino se llevó a cabo durante 4h a 80°C. Este material se lavó repetidamente con agua destilada hasta pH neutro y fue secado subsecuentemente a 50°C durante 12h en un horno de convección. El contenido del material en estos experimentos fue del 5% (p/p). Este procedimiento se llevó a cabo 3 veces y se evaluó el contenido de lignina para determinar cuántos pasos son necesarios llevar a cabo con ambos pretratamientos.

V.2.5. Producción de los nanocristales de celulosa (NCC).

Se llevó a cabo la hidrólisis ácida de la pulpa blanqueada en H₂SO₄ 64% durante 20, 40 y 60 minutos a 50°C con agitación constante (5g de pulpa por 200mL de solución ácida). Se detuvo la reacción con agua destilada fría y se realizó una centrifugación a 10,000rpm/15 min/15°C para separar los nanocristales. La solución se dializó contra agua destilada hasta pH neutro (aproximadamente 3 días). Se almacenaron a 4°C para conservación y se liofilizó para obtener los nanocristales en estado seco.

V.2.6. Análisis de la Celulosa y los Nanocristales de Celulosa

V.2.6.1. Difracción de Rayos X (DRX)

Se llevó a cabo en difractor de rayos X, con radiación K α ($\lambda=1.54\text{\AA}$) generada a un voltaje de 45kV y corriente de 40 mA, con escaneo de 5° a 60°. El índice de cristalinidad de los nanocristales se evaluó con la ecuación de Busche-Diller y Zeronian:

$$I_c = 1 - \frac{I_1}{I_2}$$

Donde I_1 es la intensidad en el mínimo ($2\theta=18.8^\circ$) e I_2 es la intensidad asociada con la región cristalina de la celulosa ($2\theta=22.7^\circ$) (Espino et al., 2014).

V.2.7.2. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

La microestructura de las muestras liofilizadas fue observada con un microscopio de barrido electrónico (SEC, Mini-SEM SNE-3200M, South Korea) a un voltaje de aceleración de 20kV. Previo a utilizar el SEM, las muestras fueron cubiertas en oro usando un pulverizador iónico (MCM-100, SEC).

V.2.7.3. Espectroscopía Infrarroja de reflectancia total atenuada con transformada de Fourier (ATR-FTIR)

El análisis ATR-FTIR fue llevado a cabo para determinar los grupos funcionales que fueron convertidos y eliminados durante la degradación de las fibras, aislamiento de la celulosa y producción de los NCCs. Los espectros ATR-FTIR fueron recolectados en una cámara con temperatura y humedad controladas a 24°C y 40% respectivamente con el accesorio de ATR Golden Gate of Specac Ltd. (Orprington, U.K.) acoplado al equipo de FTIR Bruker Tensor 37 (Rheinstetten, Germany). Los espectros de las muestras fueron escaneados con longitudes de onda en el rango de 4000 cm^{-1} a 650 cm^{-1} . Los espectros son el promedio de 40 escaneos. El análisis de los datos espectrométricos fue llevado a cabo con el software Grams/AI 7.02 (Galactic Industries, Salem, NH, USA).

V.2.7.4. TEM

Las imágenes de TEM fueron obtenidas utilizando un microscopio de transmisión electrónica TEM Philips CM100 con un voltaje de operación de 80kV. La suspensión de la muestra fue depositada en el grid y se dejó reposar durante 5 minutos. Posteriormente, este fue teñido usando ácido fosfotungsténico 2% (PTA) durante 5 minutos y se dejó secar antes de capturar la imagen.

V.3. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se expresaron como la media \pm la desviación estándar. Se realizó el análisis de varianza (ANOVA), en un diseño unifactorial y las diferencias entre las medias se analizaron por el método de Tukey, utilizando el programa R 3.4.1.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VI.1 Caracterización de materia prima

La composición de los residuos agroindustriales objeto de estudio se muestra en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Análisis proximal de materia prima

	Fibra de Agave	Tallo de Sorgo	Panoja de Sorgo
Celulosa (%)	32.85±0.32 ^b	34.67±0.16 ^a	21.45±1.56 ^c
Hemicelulosa (%)	38.36±0.32 ^a	29.24±0.16 ^b	20.69±1.56 ^c
Lignina (%)	20.7±0.03 ^a	17.03±1.9 ^a	19.82±4.19 ^a
Cenizas (%)	7.08±0.89 ^b	8.47±0.15 ^a	5.04±0.15 ^c
Humedad (%)	3.87±0.06 ^c	9.23±0.07 ^b	9.81±0.07 ^a

Los resultados se presentan como la media \pm la desviación estándar de 3 réplicas. Letras diferentes por cada línea representan diferencia significativa con la prueba de TUKEY ($\alpha=0.05$).

Cada fuente de material lignocelulósico va a tener distintos porcentajes de celulosa, hemicelulosa y lignina, los cuales van a depender completamente de su fuente, por lo que no es de sorprender que, con el análisis estadístico, las muestras presentan diferencia significativa.

La materia lignocelulósica llega a tener porcentajes de celulosa que van del 30 al 88%, así como porcentajes de lignina desde el 1% hasta el 45% (Brinchi et al., 2013), por lo que resulta indispensable evaluar el porcentaje de estos componentes para determinar el interés de estas materias para la producción de nanocristales de celulosa. Como podemos observar, tanto para la fibra de agave como para el tallo de sorgo, se obtuvieron porcentajes por encima del 30%, por lo que se determina proseguir el trabajo de investigación con estos materiales, no así con la panoja de sorgo, que con un 21.45%, presenta un porcentaje muy bajo para el aislamiento de la celulosa.

El residuo de agave analizado muestra un porcentaje de celulosa menor a lo previamente reportado por Espino et al. (2014) y Robles et al. (2018), quienes reportaron porcentajes de 45.5 y 54.6% respectivamente. De igual manera, Alonso-Gutiérrez (2005) reportó un porcentaje de 43% de celulosa en agave azul. De todos estos trabajos también es interesante observar que la hemicelulosa representa aproximadamente la mitad que la celulosa, mientras que en la muestra de agave

objeto de estudio el porcentaje de hemicelulosa es mayor al de celulosa. Al obtener un porcentaje de hemicelulosa más alto que el de la celulosa, durante el trabajo va a ser necesario la utilización de diversos pasos de blanqueamiento para garantizar la remoción de esta. El residuo de agave analizado presenta porcentaje de lignina un poco más alto a los valores reportados en la bibliografía que van de 15 a 18.7 (Espino et al., 2014), por lo que es interesante la materia prima para observar la acción de las cepas de *Phanerochaete chrysosporium* para su remoción.

En cuanto al tallo de sorgo, los datos obtenidos son menores a los reportados por Idris et al. en 2017, para celulosa (39.58%) y lignina (21.72%). En cuanto a la hemicelulosa, reportaron un 20.15%.

VI.2 Fermentación en estado sólido

Para evaluar el procedimiento de deslignificación biológica se utilizaron dos cepas de *P. chrysosporium*, una cepa nativa y una transformante TF9, ambas proporcionadas por el grupo de trabajo del Dr. Miguel Angel Gómez Lim CINVESTAV Irapuato (Coconi-Linares et al., 2018, 2014, 2015). Para los fines de este trabajo, que son la eliminación de lignina en los subproductos agrícolas se utilizó la cepa TF9 (Figura 11) reportada por Coconi-Linares et al, la cual presentó en su trabajo la mayor degradación de lignina en bagazo de caña de azúcar y trigo.

De manera adicional, se consideró trabajar la fermentación hasta los 10 días debido a la degradación de celulosa por parte del hongo después de este tiempo se refleja en producción de glucosa (Coconi-Linares et al., 2018). Esto se realiza para obtener un tiempo de fermentación ideal para la máxima remoción de lignina sin afectar los porcentajes de celulosa presentes en los materiales.

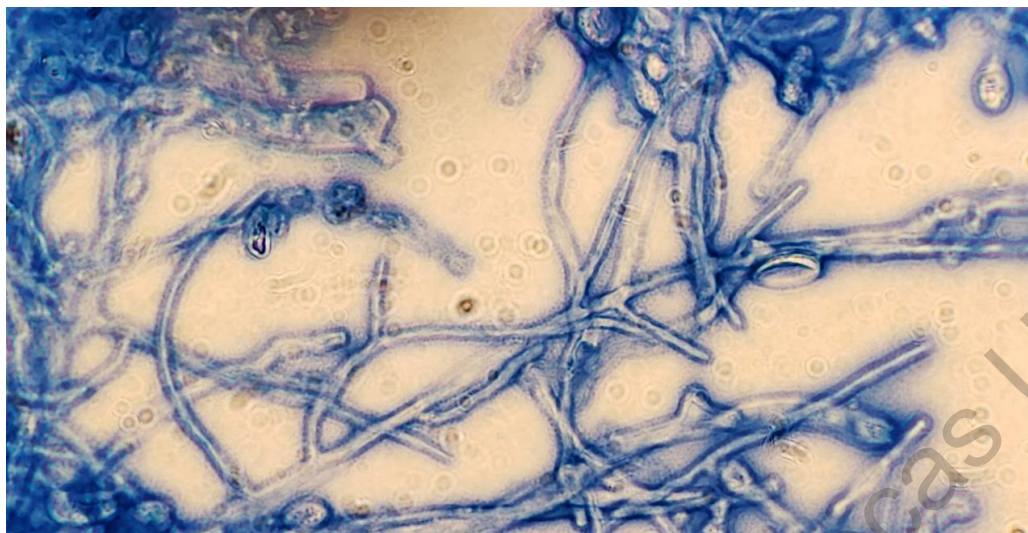


Figura 11. Cuerpo fructífero de *P. chrysosporium* TF9 en microscopio, objetivo 40X.

En el Cuadro 4 se presentan los valores de % lignina durante la fermentación del residuo de agave y la *Figura 12* presenta la gráfica correspondiente. Se puede observar que existe una mayor eficiencia de deslignificación con la cepa transformante que con la nativa, llegando a un porcentaje de deslignificación de 63.32 y 69.51% en los medios de Dong (RATD) y Coconi (RATC), respectivamente. Con la cepa nativa se consiguieron porcentajes de deslignificación de 33.52% y de 34.21% en RACC y RACD, respectivamente. Estos porcentajes logrados con la cepa transformante TF9 son similares a los reportados por Coconi et al., 2018, en bagazo de caña de azúcar (66.03%) y en residuos de trigo (59.22%).

Cuadro 4. Porcentajes de lignina durante las fermentaciones en estado sólido de la fibra de agave con la cepa control de *P. chrysosporium* y la transformante TF9 con ambos medios de cultivo.

Lignina (%)	Residuo de Agave <i>P. chrysosporium</i>		Residuo de Agave <i>P. chrysosporium</i> TF9	
	Medio Dong et al.	Medio Coconi et al.	Medio Dong et al.	Medio Coconi et al.
Tiempo de Fermentación (Días)				
0	20.17±0.16 ^a	20.47±0.93 ^a	20.65±0.91 ^a	20.73±0.36 ^a
2	18.26±0.22 ^a	18.35±0.45 ^a	17.6±0.99 ^a	19.1±0.6 ^a
4	16.47±0.32 ^a	16.65±0.8 ^a	15.4±0.52 ^a	15.3±0.7 ^a
6	15.18±0.15 ^a	16.05±0.61 ^a	8.47±0.41 ^b	14.45±0.32 ^a
8	14.2±0.16 ^a	14.25±0.18 ^a	7.69±0.82 ^c	9.27±0.64 ^b
10	13.27±0.26 ^a	13.61±0.53 ^a	6.29±0.61 ^c	7.6±0.41 ^b

Los resultados se presentan como la media ± la desviación estándar de 3 réplicas. Letras diferentes por cada línea representan diferencia significativa con la prueba de TUKEY ($\alpha=0.05$).

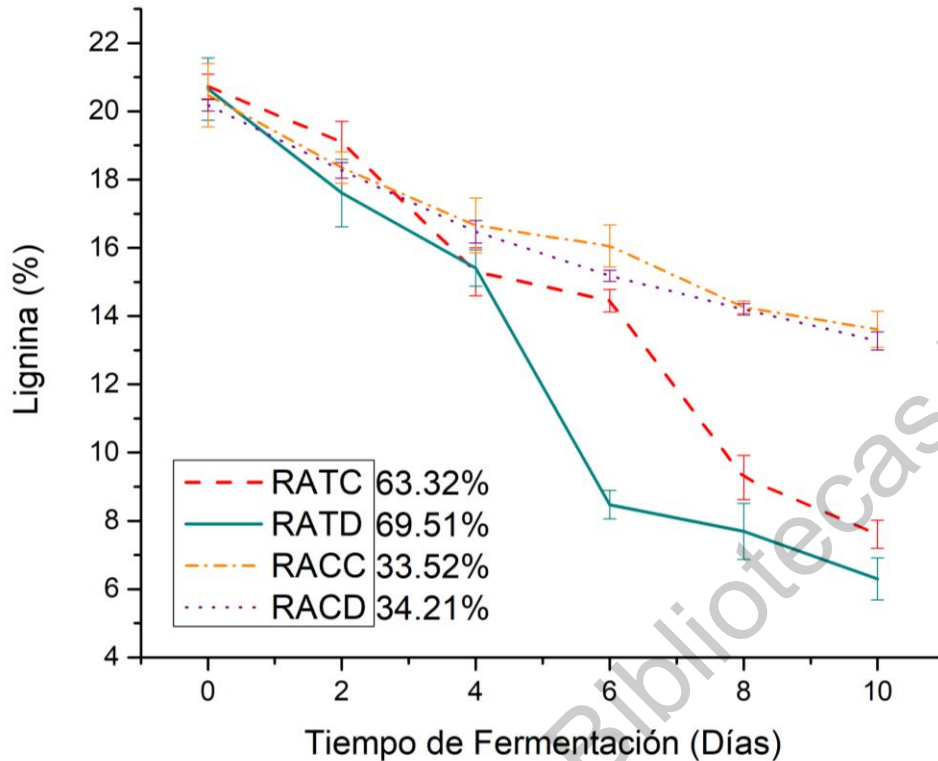


Figura 12. Concentración y porcentaje final de lignina durante las fermentaciones en estado sólido de la fibra de agave.

También se observa que se obtiene una mayor deslignificación utilizando el medio RATD. Esto puede deberse a la presencia inicial de glucosa, así como otros componentes que asisten la fermentación del hongo sin llevarlo a condiciones limitantes como lo hace el medio propuesto por Coconi y colaboradores. Esta influencia del medio también se puede observar en los resultados presentados en el Cuadro 5 y su gráfica correspondiente (Figura 12). Se puede observar cómo el medio del experimento RATD es más ácido durante todo el proceso de fermentación debido a la presencia de la glucosa, la cual confiere esa acidez al medio. Se podría inferir que el pH del medio asistió la fermentación a ser un poco más efectiva, así como la misma presencia de la glucosa. Con el análisis estadístico se demuestra que la fermentación RATD es mejor que la RATC, presentando diferencia significativa en la prueba de Tukey en el cambio de pH del día 8 al 10 ($\alpha=0.05$).

Cuadro 5. pH durante las fermentaciones en estado sólido de la fibra de agave con la cepa control de *P. chrysosporium* y la transformante TF9 con ambos medios de cultivo.

pH	Residuo de Agave <i>P. chrysosporium</i>		Residuo de Agave <i>P. chrysosporium</i> TF9	
	Medio Dong et al.	Medio Coconi et al.	Medio Dong et al.	Medio Coconi et al.
Tiempo de Fermentación (Días)				
0	4.65±0.07 ^b	7.42±0.12 ^a	4.65±0.16 ^b	7.25±0.03 ^a
2	4.79±0.17 ^b	7.21±0.08 ^a	4.56±0.08 ^b	7.19±0.07 ^a
4	4.36±0.3 ^c	7.14±0.05 ^b	4.08±0.13 ^c	7.69±0.2 ^a
6	4.45±0.1 ^b	6.99±0.04 ^a	4.64±0.32 ^b	6.81±0.31 ^a
8	4.41±0.1 ^b	6.89±0.04 ^a	4.17±0.29 ^b	7.08±0.24 ^a
10	3.89±0.16 ^c	6.02±0.08 ^a	2.02±0.03 ^d	4.41±0.22 ^b

Los resultados se presentan como la media ± la desviación estándar de 3 réplicas. Letras diferentes por cada línea representan diferencia significativa con la prueba de TUKEY ($\alpha=0.05$).

Al final de las fermentaciones con la cepa transformante se observa el salto drástico de pH en el cambio de día 8 al día 10, observando una diferencia significativa entre la cepa transformante y la cepa nativa, tanto en el medio Dong como en el Coconi, respectivamente. Este se puede suponer debido a un aumento de concentración de la glucosa, derivada de la fermentación de la celulosa, determinando así el tiempo ideal para detener el proceso biotecnológico.

En cuanto a los residuos del tallo de sorgo, el comportamiento de la fermentación fue muy similar a los resultados obtenidos con el residuo de agave, solamente con un porcentaje un poco menor de eficiencia, pero demostrando que el uso del medio TSTD en las fermentaciones así como la cepa transformante, ayuda a obtener los mejores rendimientos de remoción de lignina, obteniendo porcentajes de remoción de 63.72% para la cepa transformante con el medio propuesto por Dong et al. (TSTD) y de 59.89% para el medio propuesto por Coconi et al. (TSTC). Significativamente no hay diferencia estadística entre los resultados de TSTD y TSTC, pero como en el agave hubo mejor porcentaje de deslignificación con RATD, se recomienda usar el medio Dong para metodologías a futuro. En cuanto a la cepa nativa se obtuvieron porcentajes de remoción de lignina de 34.11% y de 39.25% para la cepa nativa en medio Coconi y en medio Dong, respectivamente.

Cuadro 6. Porcentajes de lignina durante las fermentaciones en estado sólido del tallo de sorgo con la cepa control de *P. chrysosporium* y la transformante TF9 con ambos medios de cultivo.

Lignina (%)	Tallo de Sorgo <i>P. chrysosporium</i>		Tallo de Sorgo <i>P. chrysosporium</i> TF9	
	Medio Dong et al.	Medio Coconi et al.	Medio Dong et al.	Medio Coconi et al.
Tiempo de Fermentación (Días)				
0	19.17±0.26 ^a	18.85±0.29 ^a	18.8±0.25 ^a	18.9±0.68 ^a
2	17.45±0.27 ^a	17.09±0.21 ^a	15.31±0.51 ^b	16.29±1.21 ^a
4	16.18±0.34 ^a	16.24±0.19 ^a	11.03±0.65 ^c	12.93±0.3 ^b
6	14.73±0.21 ^a	15.34±0.42 ^a	9.32±0.61 ^c	11.82±0.21 ^b
8	13.52±0.35 ^a	13.86±0.32 ^a	7.16±0.33 ^b	7.67±0.73 ^b
10	11.65±0.35 ^a	12.42±0.33 ^a	6.82±0.48 ^b	7.58±0.17 ^b

Los resultados se presentan como la media ± la desviación estándar de 3 réplicas. Letras diferentes por cada línea representan diferencia significativa con la prueba de TUKEY ($\alpha=0.05$).

Los comportamientos de pH también demuestran medios más ácidos con el medio Dong que con el medio de Coconi, siendo el final de la fermentación para la transformante, el salto de pH entre los días 8 y 10, como se observa en el Cuadro 7.

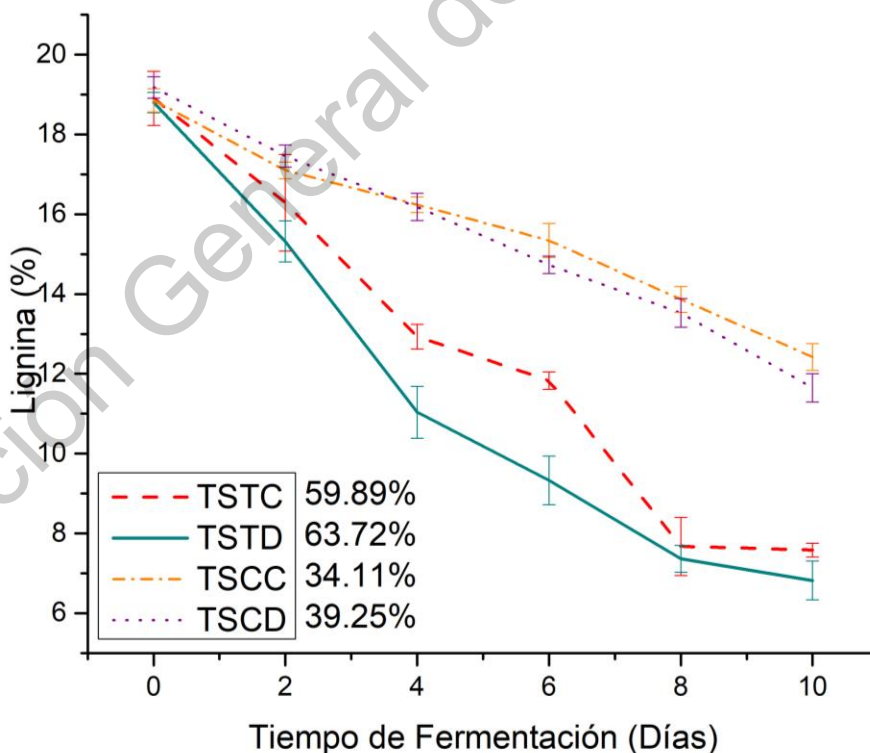


Figura 13. Concentración y porcentaje final de lignina durante las fermentaciones en estado sólido del tallo de sorgo.

Cuadro 7. pH durante las fermentaciones en estado sólido del tallo de sorgo con la cepa control de *P. chrysosporium* y la transformante TF9 con ambos medios de cultivo.

pH	Tallo de Sorgo <i>P. chrysosporium</i>		Tallo de Sorgo <i>P. chrysosporium</i> TF9		
	Días de Fermentación	Medio Dong et al.	Medio Coconi et al.	Medio Dong et al.	Medio Coconi et al.
0		5.12±0.1 ^b	7.15±0.04 ^a	5.05±0.06 ^b	7.19±0.07 ^a
2		5.03±0.06 ^b	7.12±0.04 ^a	4.98±0.07 ^b	7.1±0.1 ^a
4		4.93±0.04 ^b	7.06±0.02 ^a	4.67±0.04 ^c	6.98±0.02 ^a
6		4.99±0.02 ^b	6.99±0.04 ^a	4.72±0.02 ^c	7.02±0.01 ^a
8		5.23±0.03 ^b	7.02±0.04 ^a	4.69±0.02 ^c	6.78±0.03 ^a
10		4.76±0.26 ^b	6.88±0.03 ^a	2.43±0.35 ^c	4.62±0.09 ^b

Los resultados se presentan como la media ± la desviación estándar de 3 réplicas. Letras diferentes por cada línea representan diferencia significativa con la prueba de TUKEY ($\alpha=0.05$).

Como se puede observar en los resultados de las fermentaciones, tanto para el tallo de sorgo como para el residuo de agave, los mejores procedimientos de remoción de lignina ocurren con la cepa transformante TF9 de *P. chrysosporium*, recomendando como mejora en el proceso, un mayor control en la humectación del medio, evitando la deshidratación del proceso, así como implementar un sistema que permita una mayor superficie de contacto. Así, también se observa que el hongo es capaz de realizar la fermentación sin un iniciador, como se maneja en el trabajo de Coconi et al, pero la presencia de uno, así como otros aditivos para la fermentación, cambian las condiciones del medio, como el pH, para volverlo más efectivo.

También se observa que la cepa transformante es casi el doble de efectiva que la cepa nativa en ambos casos, gracias a la coexpresión y sobreexpresión de las enzimas logradas por la transformación del hongo.

VI.3 Purificación de la celulosa

Para obtener la celulosa, posterior al tratamiento biológico, se tienen que eliminar los remanentes de lignina, así como la hemicelulosa, otro factor importante en las matrices lignocelulósicas. Este proceso, referido como blanqueamiento, es importante realizarlo más de una ocasión para garantizar la remoción de estos

compuestos y tener la celulosa con el grado de pureza más alto posible (Silvério, Flauzino Neto, Dantas, & Pasquini, 2013).

Cuadro 8. Concentración de lignina en los distintos pasos de deslignificación y blanqueamientos de los tratamientos químico y biológico.

Lignina (%)	Residuo de Agave		Tallo de Sorgo	
	Tratamiento Químico	Tratamiento Biológico	Tratamiento Químico	Tratamiento Biológico
Fibra Nativa	20.7±0.03 ^a		17.03±1.9 ^a	
Deslignificación	17.63±2.14 ^a	6.29±0.61 ^b	5.39±0.05 ^b	6.82±0.48 ^b
1er Blanqueamiento	8.7±0.14 ^a	4.08±0.28 ^b	3.98±0.95 ^b	3.93±0.17 ^b
2do Blanqueamiento	2.88±0.79 ^a	1.58±0.51 ^a	1.22±1 ^a	1.5±0.43 ^a

Los resultados se presentan como la media ± la desviación estándar de 3 réplicas. Letras diferentes por cada línea representan diferencia significativa con la prueba de TUKEY ($\alpha=0.05$).

Por lo tanto, se realizaron blanqueamientos consecutivos hasta que la lignina en las muestras fuera indetectable. Mediante el método gravimétrico se determinó que la remoción de lignina se alcanzaba en el tercer blanqueamiento (Cuadro 8. *Concentración de lignina en los distintos pasos de deslignificación y blanqueamientos de los tratamientos químico y biológico.*). En el caso del residuo de agave, el tratamiento químico de deslignificación basado en el uso de NaOH produce material con un 17.63 % de lignina. Comparando el resultado con la remoción biológica de lignina (6.29%) es evidente la mejora sustancial del procedimiento, siendo estadísticamente significativa. En el caso del sorgo, no se encontró diferencia significativa entre el tratamiento químico y biológico en la etapa de deslignificación, por lo que se recomienda utilizar en un futuro el procedimiento biotecnológico propuesto debido a su menor impacto ambiental.

Debido a lignina residual y hemicelulosa es importante llevar a cabo procedimientos de blanqueado. Se observó que después de tres tratamientos de blanqueado no se detectó lignina por el método gravimétrico para ambos tratamientos. Aunque se logra la remoción de lignina en el proceso de

blanqueamiento se recomienda buscar otros procedimientos libres de cloro para trabajos futuros. El mismo comportamiento se observó para el sorgo. Es importante señalar que el tratamiento químico es más efectivo para deslignificar el material de sorgo que el de agave, alcanzando 71.26 % y 14.95% de deslignificación respectivamente.

VI.4 Análisis de celulosa aislada

VI.4.1 Espectroscopía de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier

A diferencia de la metodología gravimétrica, la lignina se puede detectar al momento de observar el espectro infrarrojo de las muestras. Se realizó el espectro del segundo y tercer blanqueamiento en ambos tratamientos químico y biológico (Figura 14), mostrando aquí el segundo blanqueamiento del biológico y el tercero del químico, donde se observa la menor concentración de lignina en las muestras. La lignina presenta sus principales vibraciones en las ondas de 1450 cm^{-1} , 1516 cm^{-1} y 1612 cm^{-1} , correspondiente a los anillos aromáticos presentes en su estructura.

De igual manera la banda en 1060 cm^{-1} es correspondiente a la vibración del anillo glucosídico correspondiente a la celulosa, y la onda en 3411 cm^{-1} también corresponde a la celulosa, siendo causa las vibraciones de los grupos hidroxilo presentes en la molécula, observando por lo tanto, que la celulosa es el componente con mayor presencia después de los tratamientos de blanqueamiento, con algunas fracciones de lignina aún presentes pero en un porcentaje muy bajo (Bae et al., 2017; Johar, Ahmad, & Dufresne, 2012; Nascimento et al., 2016; Robles et al., 2018).

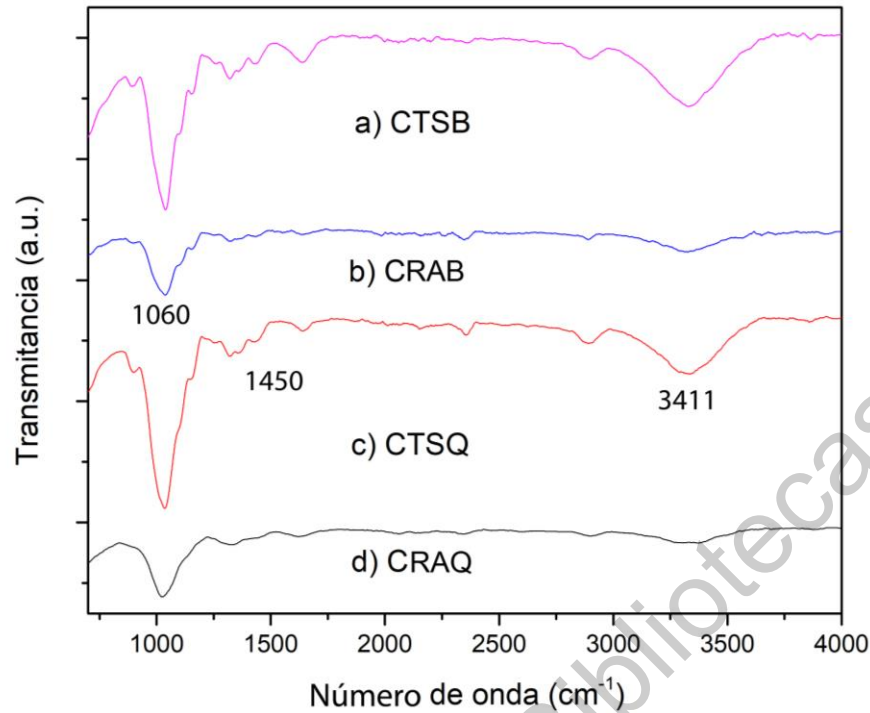


Figura 14. Espectro infrarrojo de las muestras de celulosa aislada.

VI.4.2 Difracción de Rayos X

Como se observa en la Figura 15, encontramos los picos característicos de la celulosa en el plano de difracción, los cuales son el ángulo 22.6° , 16.7° y 15° (Mondragon et al., 2014). A partir de la ecuación de Busche-Diller y Zeronian, se obtuvo la cristalinidad de las muestras de celulosa como se muestra en el , siendo las muestras tratadas biológicamente las que presentaron mayor cristalinidad, comparando con las tratadas químicamente. Se sugiere la hipótesis en que a las regiones amorfas que pueden haber sido removidas durante los procedimientos, tanto de deslignificación como de blanqueamiento, dejando mayores zonas cristalinas de celulosa expuestas.

Cuadro 9. Se observan datos de cristalinidad un poco más altos o similares a algunos reportados por la bibliografía, como el de 56.5 de fibra blanqueada de arroz (Johar et al., 2012), 74% para fibra blanqueada de *Agave angustifolia* (Rosli, Ahmad, & Abdullah, 2013), 68.4% para bagazo de caña de azúcar (Feng et al., 2018), entre otros. Esta cristalinidad se debe a las regiones cristalinas presentes en

la celulosa, lo cual se demuestra en los espectros obtenidos, siendo las muestras tratadas biológicamente las que presentaron mayor cristalinidad, comparando con las tratadas químicamente. Se sugiere la hipótesis en que a las regiones amorfas que pueden haber sido removidas durante los procedimientos, tanto de deslignificación como de blanqueamiento, dejando mayores zonas cristalinas de celulosa expuestas.

Cuadro 9. Cristalinidad de las distintas muestras de celulosa.

	RAQ	RAB	TSQ	TSB
Crl (%)	65.03	69.91	63.59	63.88

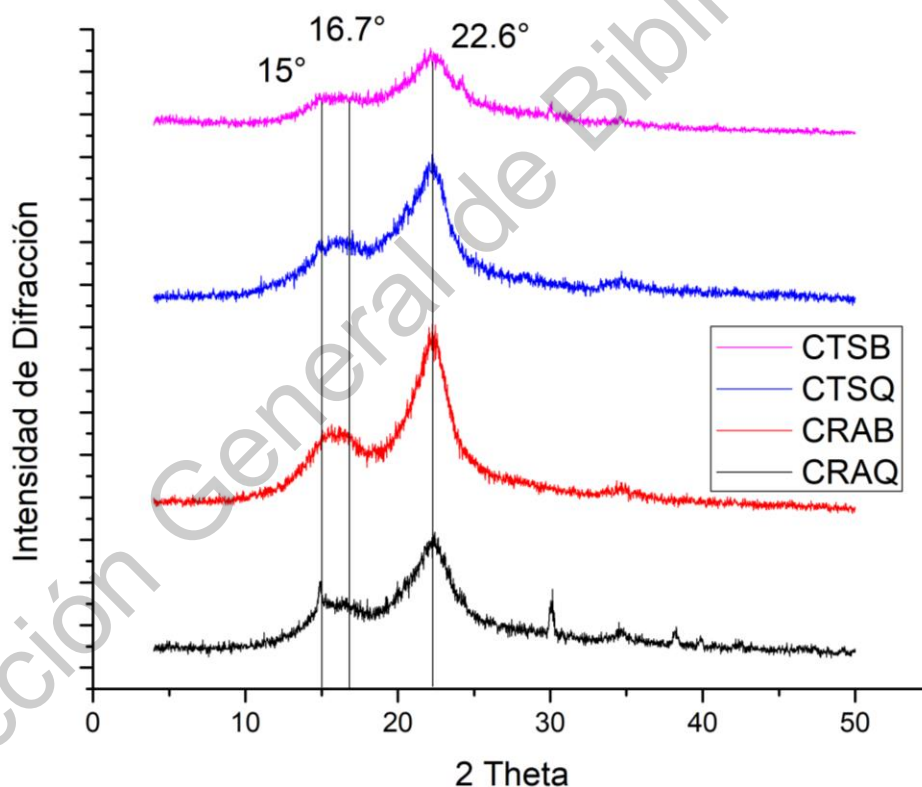


Figura 15. Lectura de difracción de rayos X (XRD) de muestras de celulosa de las distintas muestras y tratamientos.

VI.4.3. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Mediante las imágenes de SEM de las muestras aisladas de celulosa, se puede observar que la mayoría de las regiones amorfas de hemicelulosa y lignina fueron removidas, que, en conjunto con los demás análisis, se puede verificar el alto grado de pureza de la celulosa extraída.

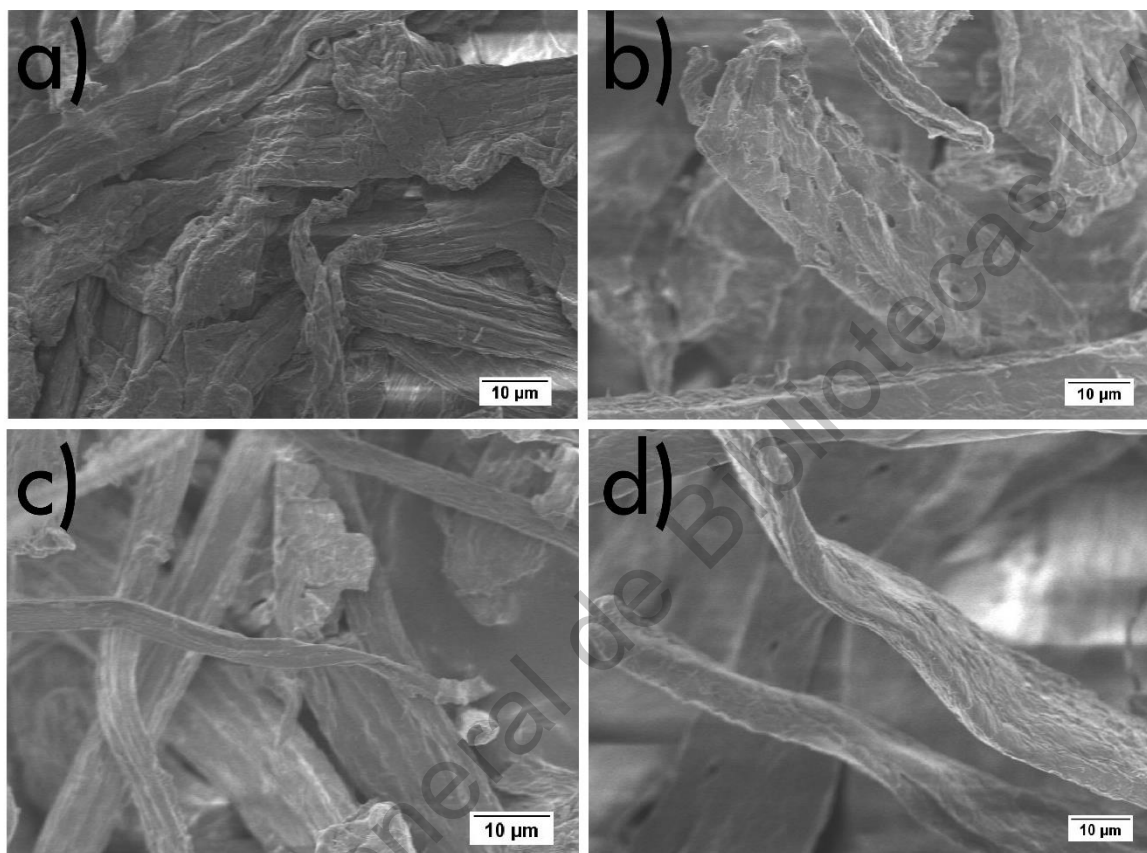


Figura 16. Observación de celulosa aislada en SEM. A) TSB, B) TSQ, C) RAB, D) RAQ.

Comparando con reportes previos, esta estructura lisa se puede observar en la superficie de la celulosa blanqueada, en el caso de materiales como la cascarilla de arroz (Islam, Kao, Bhattacharya, Gupta, & Choi, 2017) así como en bagazo de caña de azúcar (Oliveira, Bras, Pimenta, Curvelo, & Belgacem, 2016). Esto se debe a la acción de los distintos químicos y del hongo, aunque no se observa una diferencia fuerte entre las fibras tratadas con el hongo con las fibras tratadas químicamente. Esto se debe a los posteriores pasos de blanqueamiento, los cuales homogeneizan de cierta manera las fibras.

VI.5 Análisis de producto de hidrólisis ácida de la celulosa

VI.5.1 Espectroscopía de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier

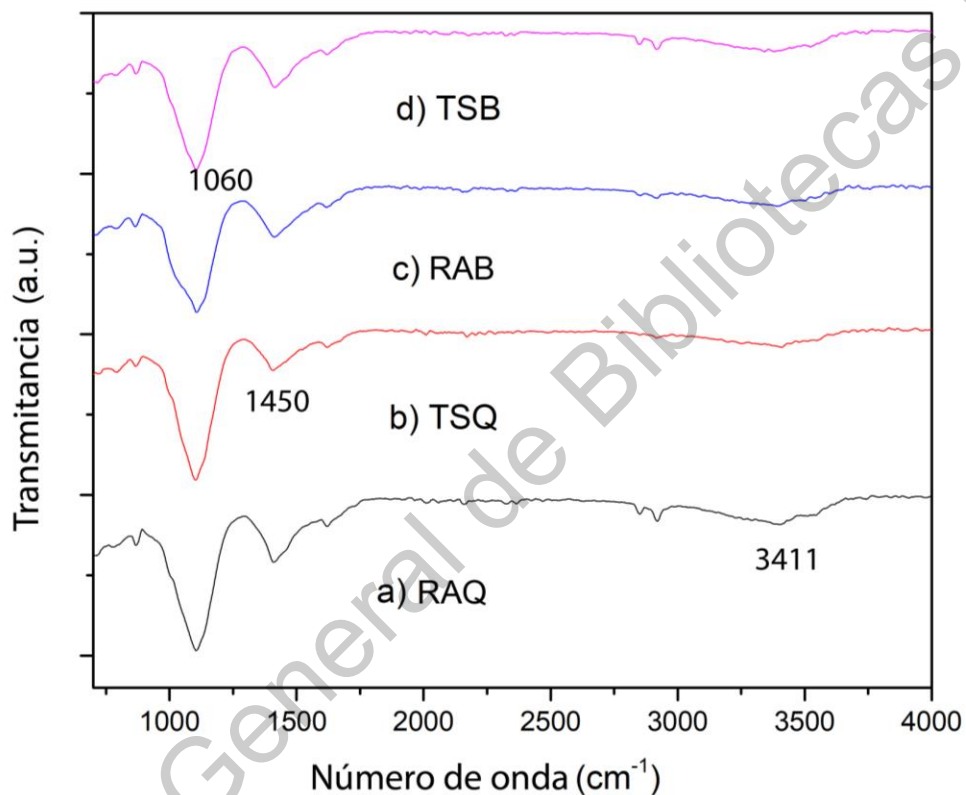


Figura 17. Espectro infrarrojo de las muestras de supuestos NCC.

A diferencia, como se observa en la imagen 19, en el intento de producción de NCC, la banda característica de celulosa en 1060cm^{-1} permanece, pero la banda en 1450cm^{-1} correspondiente a lignina aumenta su intensidad. Esto nos puede hablar de una permanencia de lignina, así como una degradación de la celulosa debido a la acción hidrolítica del ácido sulfúrico en la producción de nanocristales de celulosa. Hay que tomar en cuenta que la lignina se degrada en un proceso con altas temperaturas y presiones con ácido sulfúrico al 72%, por lo que, si no se removió de manera eficiente en las etapas de blanqueamiento, esta va a

permanecer en la estructura en procesos posteriores. También se considera que el procedimiento de producción de nanocristales de celulosa es muy delicado, ya que se busca romper la parte amorfa de la celulosa y que permanezca únicamente la cristalina, por lo que si se excede ya sea en concentración de ácido, temperatura o duración de la hidrólisis, se puede estar también degradando la celulosa cristalina, lo que se supone que ocurrió en este experimento (Silvério et al., 2013).

VI.5.2. Difracción de Rayos X

De manera teórica, la cristalinidad del material tiene que aumentar con la producción de los nanocristales de celulosa, pero en este caso, no se puede calcular con los parámetros propuestos por la aparición de diversas intensidades de difracción en el material obtenido, que no coinciden con los de celulosa, más que pequeñas intensidades presentes den 22.6° y 15° . Se observan también nuevos picos con intensidad en 29.3° , 31.6° y 45.3° , que demuestran presencia de zonas cristalinas en el material, pero también zonas amorfas o de lignina. De esta manera podemos aseverar que una fracción de celulosa sigue presente en el material, pero al remover las zonas amorfas y parte de la celulosa, nos encontramos que la lignina residual puede permanecer en la matriz, opacando la intensidad de difracción de la celulosa.

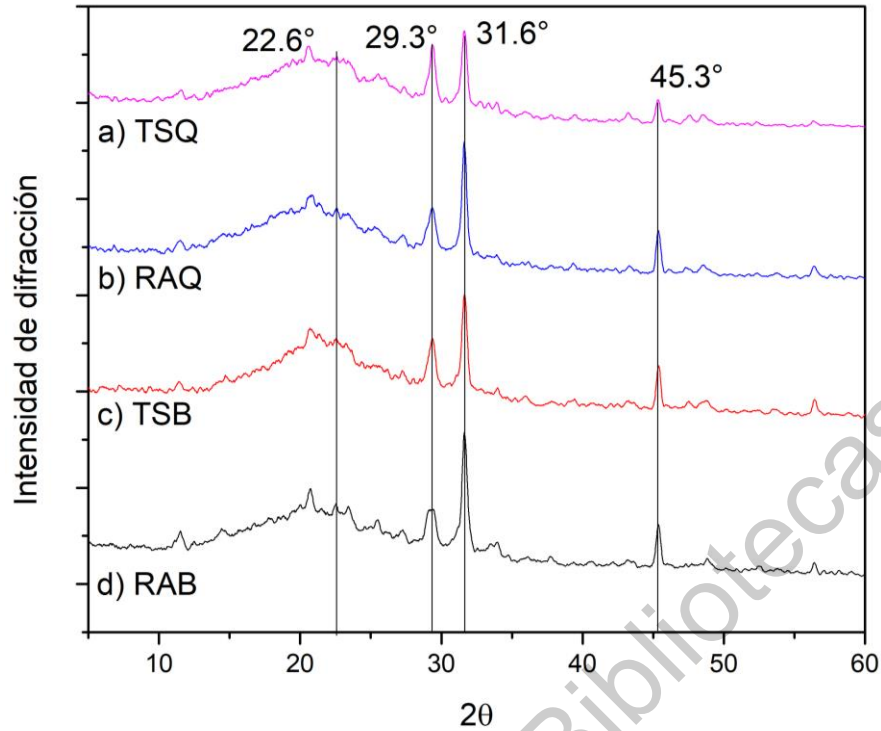


Figura 18. Lectura de difracción de rayos X (XRD) de supuestas muestras de NCC de las distintas muestras y tratamientos.

VI.5.3 Microscopía Electrónica de Barrido

Al observar en una mayor amplificación en TEM, se siguen observando los aglomerados y ahora las partículas se observan en formas cuasi esféricas, descartando la presencia de nanocristales de celulosa. Al comparar estas imágenes con los datos obtenidos de FTIR y de XRD, se puede concluir que la mejor metodología de purificación y extracción de celulosa es el tratamiento biológico, observando partículas con menor grado de impurezas. Para la futura obtención de CNCs se recomienda un mayor grado de purificación, ya que la lignina no se degrada a altas concentraciones de ácido (se degrada a 72% con alta temperatura) y esta queda presente aún después del aislamiento de nanopartículas, por lo que se tiene la hipótesis de que se elimina la celulosa amorfa y queda únicamente la celulosa cristalina en menor concentración.

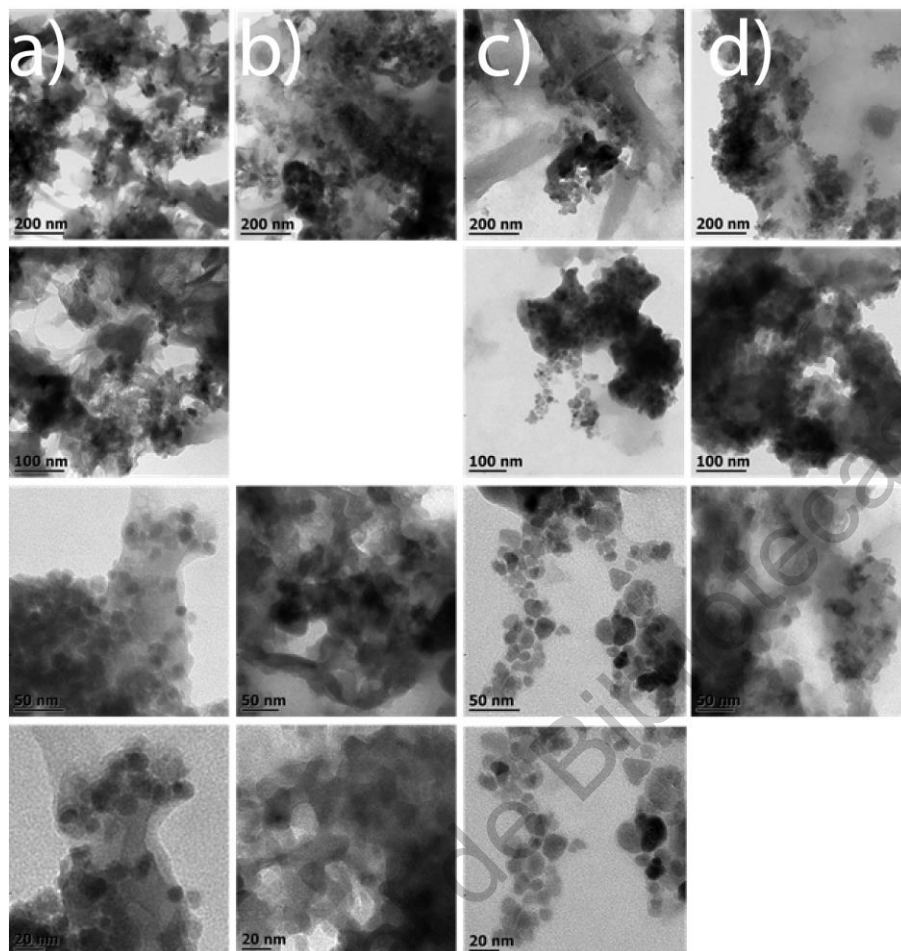


Figura 19. Observaciones en TEM de supuestos NCC de las distintas muestras.
A) RAB, B) RAC, C) TSB, D) TSC.

VII. CONCLUSIONES

Se desarrolló e implementó una nueva metodología de deslignificación con cepas de *P. chrysosporium*, una nativa y otra transformante, para la remoción de lignina mediante un proceso biotecnológico de residuos de fibra de agave y de tallo de sorgo.

Se logró deslignificar en un 68.43% los residuos de agave y en un 63.72% el tallo de sorgo en medio Czapek mediante el tratamiento con el transformante TF9 de *Phanerochaete chrysosporium*. Así, se considera viable la sustitución del tratamiento alcalino, donde se obtienen porcentajes de deslignificación de 71.26% para tallo de sorgo y 14.95% para residuo de agave, con el procedimiento biotecnológico propuesto,

Se obtuvo el aislamiento de celulosa a partir de los residuos agroindustriales propuestos con un blanqueamiento posterior al proceso biotecnológico, obteniendo una cristalinidad de la misma en 69.91% para residuo de agave y de 63.88% para el residuo de sorgo, siendo más altas que las obtenidas mediante el proceso químico.

Se realizó el procedimiento de obtención de NCC, observando resultados que difieren con la bibliografía en DRX y FTIR, pero aun así observando lo que pueden ser “nano-varillas” de celulosa en SEM. Se propone volver a realizar y mejorar el procedimiento de la hidrólisis ácida para el aislamiento final del nanomaterial para posteriores aplicaciones.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abe, A., Dusek, K., & Kobayashi, S. (2010). *Biopolymers: Lignin, Proteins, Bioactive Nanocomposites. Advances in Polymer Science 232* (Vol. 232). Berlin: Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-13630-6>
- Bae, D. H., Choi, H. J., Choi, K., Nam, J. Do, Islam, M. S., & Kao, N. (2017). Fabrication of phosphate microcrystalline rice husk based cellulose particles and their electrorheological response. *Carbohydrate Polymers*, 165, 247–254. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.02.037>
- Brinchi, L., Cotana, F., Fortunati, E., & Kenny, J. M. (2013). Production of nanocrystalline cellulose from lignocellulosic biomass: Technology and applications. *Carbohydrate Polymers*, 94(1), 154–169. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.01.033>
- Cheng, S., Zhang, Y., Cha, R., Yang, J., & Jiang, X. (2016). Water-soluble nanocrystalline cellulose films with highly transparent and oxygen barrier properties. *Nanoscale*, 8(2), 973–978. <https://doi.org/10.1039/C5NR07647A>
- Coconi-Linares, N., Fernández, F., Loske, A. M., & Gómez-Lim, M. A. (2018). Enhanced Delignification of Lignocellulosic Biomass by Recombinant Fungus *Phanerochaete chrysosporium* Overexpressing Laccases and Peroxidases. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 1–13. <https://doi.org/10.1159/000485976>
- Coconi-Linares, N., Magaña-Ortíz, D., Guzmán-Ortiz, D. A., Fernández, F., Loske, A. M., & Gómez-Lim, M. A. (2014). High-yield production of manganese peroxidase, lignin peroxidase, and versatile peroxidase in *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(22), 9283–9294. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6105-9>
- Coconi-Linares, N., Ortiz-Vázquez, E., Fernández, F., Loske, A. M., & Gómez-Lim, M. A. (2015). Recombinant expression of four oxidoreductases in *Phanerochaete chrysosporium* improves degradation of phenolic and non-

phenolic substrates. *Journal of Biotechnology*, 209, 76–84.

<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.06.401>

Dong, X. Q., Yang, J. S., Zhu, N., Wang, E. T., & Yuan, H. L. (2013). Sugarcane bagasse degradation and characterization of three white-rot fungi. *Bioresource Technology*, 131, 443–451. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.182>

Eriksson, K.-E. L., & Bermek, H. (2009). Lignin, Lignocellulose, Ligninase. In *Encyclopedia of Biodiversity* (pp. 373–384). Elsevier.

Espino, E., Cakir, M., Domenek, S., Román-Gutiérrez, A. D., Belgacem, N., & Bras, J. (2014). Isolation and characterization of cellulose nanocrystals from industrial by-products of Agave tequilana and barley. *Industrial Crops and Products*, 62, 552–559. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.09.017>

Feng, Y. H., Cheng, T. Y., Yang, W. G., Ma, P. T., He, H. Z., Yin, X. C., & Yu, X. X. (2018). Characteristics and environmentally friendly extraction of cellulose nanofibrils from sugarcane bagasse. *Industrial Crops and Products*, 111(March 2017), 285–291. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.10.041>

Ferreira, F. V., Mariano, M., Rabelo, S. C., Gouveia, R. F., & Lona, L. M. F. (2018). Isolation and surface modification of cellulose nanocrystals from sugarcane bagasse waste: From a micro- to a nano-scale view. *Applied Surface Science*, 436, 1113–1122. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2017.12.137>

Habibi, Y., Lucia, L. A., & Rojas, O. J. (2010). Cellulose Nanocrystals : Chemistry , Self-Assembly , and Applications. *Chemical Reviews*, 110, 3479–3500. <https://doi.org/10.1021/cr900339w>

Idris, A. S. O., Pandey, A., Rao, S. S., & Sukumaran, R. K. (2017). Cellulase production through solid-state tray fermentation, and its use for bioethanol from sorghum stover. *Bioresource Technology*, 242, 265–271. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.092>

Islam, M. S., Kao, N., Bhattacharya, S. N., Gupta, R., & Choi, H. J. (2017). Potential aspect of rice husk biomass in Australia for nanocrystalline cellulose

production. *Chinese Journal of Chemical Engineering*.

<https://doi.org/10.1016/j.cjche.2017.07.004>

Jawaid, M., Boufi, S., & Khalil, A. (2017). *Cellulose-Reinforced Nanofibre Composites*. Woodhead Publishing.

Johar, N., Ahmad, I., & Dufresne, A. (2012). Extraction, preparation and characterization of cellulose fibres and nanocrystals from rice husk. *Industrial Crops and Products*, 37(1), 93–99.

<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.12.016>

Kirk, T. K., Schultz, E., Connors, W. J., Lorenz, L. F., & Zeikus, J. G. (1978). Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of Microbiology*, 117(3), 277–285.

<https://doi.org/10.1007/BF00738547>

Mariano, M., Cercená, R., & Soldi, V. (2016). Thermal characterization of cellulose nanocrystals isolated from sisal fibers using acid hydrolysis. *Industrial Crops and Products*, 94, 454–462. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.09.011>

Martinez, D., Larrondo, L. F., Putnam, N., Sollewijn Gelpke, M. D., Huang, K., Chapman, J., ... Rokhsar, D. (2004). Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. *Nature Biotechnology*, 22(6), 695–700. <https://doi.org/10.1038/nbt967>

Mondal, S. (2017). Preparation, properties and applications of nanocellulosic materials. *Carbohydrate Polymers*, 163, 301–316.

<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.12.050>

Mondragon, G., Fernandes, S., Retegi, A., Peña, C., Algar, I., Eceiza, A., & Arbelaiz, A. (2014). A common strategy to extracting cellulose nanoentities from different plants. *Industrial Crops and Products*, 55, 140–148.

<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.02.014>

Nascimento, D. M. do, Dias, A. F., Araújo Junior, C. P. de, Rosa, M. de F., Morais, J. P. S., & Figueirêdo, M. C. B. de. (2016). A comprehensive approach for

obtaining cellulose nanocrystal from coconut fiber. Part II: Environmental assessment of technological pathways. *Industrial Crops and Products*, 93, 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.02.063>

Oliveira, F. B. de, Bras, J., Pimenta, M. T. B., Curvelo, A. A. da S., & Belgacem, M. N. (2016). Production of cellulose nanocrystals from sugarcane bagasse fibers and pith. *Industrial Crops and Products*, 93, 48–57. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.04.064>

Pollegioni, L., Tonin, F., & Rosini, E. (2015). Lignin-degrading enzymes. *FEBS Journal*, 282(7), 1190–1213. <https://doi.org/10.1111/febs.13224>

Qiu, S., Yadav, M. P., & Yin, L. (2017). Characterization and functionalities study of hemicellulose and cellulose components isolated from sorghum bran, bagasse and biomass. *Food Chemistry*, 230, 225–233. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.028>

Robles, E., Fernández-Rodríguez, J., Barbosa, A., Gordobil, O., Carreño, N. L. V, & Labidi, J. (2018). Production of cellulose nanoentities from blue agave waste treated with environmentally friendly processes. *Carbohydrate Polymers*, Submitted. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.01.015>

Rojas, O. J. (2016). *Cellulose Chemistry and Properties : Fibers , Nanocelluloses and Advanced Materials*. *Advances in Polymer Science* 271. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-26015-0>

Rosli, N. A., Ahmad, I., & Abdullah, I. (2013). Isolation and characterization of cellulose nanocrystals from agave angustifolia fibre. *BioResources*, 8(2), 1893–1908. <https://doi.org/10.15376/biores.8.2.1893-1908>

Santos, R. M. dos, Flauzino Neto, W. P., Silvério, H. A., Martins, D. F., Dantas, N. O., & Pasquini, D. (2013). Cellulose nanocrystals from pineapple leaf, a new approach for the reuse of this agro-waste. *Industrial Crops and Products*, 50, 707–714. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.08.049>

Silvério, H. A., Flauzino Neto, W. P., Dantas, N. O., & Pasquini, D. (2013).

Extraction and characterization of cellulose nanocrystals from corncob for application as reinforcing agent in nanocomposites. *Industrial Crops and Products*, 44, 427–436. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.10.014>

Siqueira, G., Bras, J., & Dufresne, A. (2010). Cellulosic bionanocomposites: A review of preparation, properties and applications. *Polymers*, 2(4), 728–765. <https://doi.org/10.3390/polym2040728>

Tang, J., Sisler, J., Grishkewich, N., & Tam, K. C. (2017). Functionalization of cellulose nanocrystals for advanced applications. *Journal of Colloid and Interface Science*, 494, 397–409. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2017.01.077>

Trache, D., Hussin, M. H., Haafiz, M. K. M., & Thakur, V. K. (2017). Recent progress in cellulose nanocrystals: sources and production. *Nanoscale*, 9(5), 1763–1786. <https://doi.org/10.1039/C6NR09494E>

Wüstenberg, T. (2015). *Cellulose and cellulose derivatives in the food industry*. Weinheim: Wiley.