



ENZYMATIC SACCHARIFICATION OF PRETREATED SUGARCANE BAGASSE BY HYDROGEN PEROXIDE FOR BIOETHANOL PRODUCTION†

[SACARIFICACIÓN ENZIMÁTICA DE BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR PRETRATADO CON PEROXIDO DE HIDROGENO PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL]

S. Pérez-Contreras¹, R. Hernández-Martínez^{2*}, F. Hernández-Rosas¹, J. A. Herrera-Corredor¹ and E. C. Varela-Santos³

¹Colegio de Postgraduados-Campus Córdoba, Carretera Federal Córdoba-Veracruz Km 348, Congregación Manuel León, Municipio Amatlán de los Reyes, 94946 Veracruz, México. Email: perez.serafin@colpos.mx, fhrosas@colpos.mx, jandreshc@colpos.mx

²CONACYT-Colegio de Postgraduados-Campus Córdoba, Carretera Federal Córdoba-Veracruz Km 348, Congregación Manuel León, Municipio Amatlán de los Reyes, 94946 Veracruz, México. Email: odracirhema@gmail.com

³Instituto Tecnológico Superior de Tierra Blanca. Av. Veracruz S/N Esq., Héroes de Puebla, Colonia Pemex, C.P. 95180, Tierra Blanca, Veracruz. Email: e.varela@itstb.edu.mx

*Corresponding Author

SUMMARY

Background. Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) is one of the main crops in Mexico; during the harvest 2021-2022, 54.6 million tons of raw milled sugarcane were industrialized, ranking sixth in production worldwide. However, during processing, several products and co-products are generated, including sugarcane bagasse, that is used to produce electricity by combustion, converting nearly 25% of its weight into greenhouse gases and generating environmental problems. For this reason, it is necessary to design processes aligned with the axes of sustainable development (environmental, social and economic) to promote valorization and diversification. **Objective.** To determine the effect of two pretreatments on the enzymatic saccharification of sugarcane bagasse for its subsequent conversion to bioethanol. **Methodology.** The production of enzymatic extracts by solid state fermentation (SSF) was carried out using sugarcane bagasse as support-substrate and autochthonous fungal strains as inoculum. For the enzymatic saccharification the sugarcane bagasse was pretreated with hydrogen peroxide and microwaves, for the hydrogen peroxide pretreatment the variables time (1, 3 and 6 h), ratio mL of peroxide per gram of bagasse (16. 6:1, 33.3:1 and 100:1), temperature (26, 50 and 70°C) and peroxide concentration (1, 3 and 5%); and for microwave pretreatment the variables microwave power (p30, p50 and p80) and time (5 and 10 min) were evaluated. For the enzymatic saccharification, enzymatic extracts produced by SSF and bagasse pretreated with hydrogen peroxide were used. Finally, fermentable sugars obtained from the enzymatic saccharification of sugarcane bagasse were used as a unique carbon source in alcoholic fermentation system. **Results.** The SSF results showed the presence of cellulase (2 U/g) and xylanase (61 U/g) activity. On the other hand, the results of pretreatment of sugarcane bagasse with hydrogen peroxide indicated that the best conditions were 100 mL of 3% hydrogen peroxide per gram of sugarcane bagasse at 50°C, while the best conditions of microwave pretreatment were 50p for 5 minutes. The enzymatic saccharification of sugarcane bagasse showed a maximum yield of reducing sugars when the sugarcane bagasse was pretreated with hydrogen peroxide, obtaining 0.41 g/g. Finally, the maximum ethanol concentration (4.32 g/L) was obtained after 48 hours of fermentation with commercial *Saccharomyces cerevisiae*. **Implications.** The sugar agroindustry in Mexico is limited to the production of sucrose and ethanol, being necessary a sustainable productive diversification. **Conclusions.** The isolation of autochthonous fungal strains allowed the production of cellulases and xylanases by solid fermentation with adequate specificity to hydrolyze/saccharify pretreated sugarcane bagasse and its subsequent conversion to ethanol. **Key words:** Sugarcane agroindustry; biomass valorization; solid state fermentation; enzymatic hydrolysis; bioprocess.

† Submitted March 15, 2023 – Accepted April 20, 2023. <http://doi.org/10.56369/tsaes.4831>



Copyright © the authors. Work licensed under a CC-BY 4.0 License. <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

ISSN: 1870-0462. ORCID: S. Pérez Contreras: <http://orcid.org/0000-0002-9337-2641>, R. Hernández Martínez: <http://orcid.org/0000-0002-3604-4668>, F. Hernández Rosas: <http://orcid.org/0000-0003-3718-3245>, J.A. Herrera Corredor: <http://orcid.org/0000-0002-2392-2521>, E.C. Varela Santos: <http://orcid.org/0000-0001-5498-340X>

RESUMEN

Antecedentes. La caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) es uno de los principales cultivos en México, tan solo, durante la zafra 2021-2022, se industrializaron 54.6 millones de toneladas de caña bruta molida, posicionándose como el sexto lugar en producción a nivel mundial. Sin embargo, durante el procesamiento se generan diversos productos y coproductos de los cuales se destaca el bagazo de caña, que en su mayoría se destina a la producción de energía eléctrica mediante combustión, convirtiendo cerca del 25 % de su peso en gases de efecto invernadero generando problemas ambientales. Por esta razón, es necesario diseñar procesos alineados a los ejes del desarrollo sustentable (ambiental, social y económico) para impulsar la valorización y diversificación. **Objetivo.** Determinar el efecto de dos pretratamientos sobre la sacarificación enzimática de bagazo de caña de azúcar para su posterior conversión a bioetanol. **Metodología.** Se realizó la producción de extractos enzimáticos por fermentación en estado sólido (FES) utilizando bagazo de caña como soporte-sustrato y cepas fúngicas autóctonas como inóculo. Para la sacarificación enzimática el bagazo de caña fue pretratado con peróxido de hidrógeno y microondas, para el pretratamiento con peróxido de hidrógeno se evaluaron las variables tiempo (1, 3 y 6 h), relación mL de peróxido por gramo de bagazo (16.6:1, 33.3:1 y 100:1), temperatura (26, 50 y 70°C) y concentración del peróxido (1, 3 y 5%); y para el pretratamiento con microondas se evaluaron las variables potencia de las microondas (p30, p50 y p80) y tiempo (5 y 10 min). Para la etapa de sacarificación enzimática fueron utilizados extractos enzimáticos producidos por FES y bagazo pretratado con peróxido de hidrógeno. Por último, los azúcares fermentables obtenidos de la sacarificación enzimática de bagazo de caña fueron empleados como única fuente de carbono en un sistema de fermentación alcohólica. **Resultados.** Los resultados de la FES mostraron la presencia de actividad celulasa (2 U/g) y xilanasa (61 U/g). Por otro lado, los resultados del pretratamiento de bagazo de caña con peróxido de hidrógeno indicaron que las mejores condiciones fueron 100 mL de peróxido de hidrógeno al 3% por cada gramo de bagazo de caña a 50°C, mientras que, las mejores condiciones del pretratamiento con microondas fueron 50p por 5 minutos. La sacarificación enzimática de bagazo de caña presentó un rendimiento de azúcares reductores máximo cuando el bagazo de caña fue pretratado con peróxido de hidrógeno obteniendo 0.41 g/g. Por último, la concentración máxima de etanol (4.32 g/L) fue obtenida tras 48 horas de fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* comercial. **Implicaciones.** La agroindustria azucarera en México se limita a la producción de sacarosa y etanol siendo necesaria una diversificación productiva sustentable. **Conclusiones.** El aislamiento de cepas fúngicas autóctonas permitió la producción de celulasas y xilanasas por fermentación en medio sólido con especificidad adecuada para hidrolizar/ sacarificar bagazo de caña de azúcar pretratado y su posterior conversión a etanol.

Palabras clave: Agroindustria de la caña de azúcar; valorización de biomasa; fermentación en medio sólido; hidrólisis enzimática; bioprocesos.

INTRODUCCIÓN

El cultivo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) es uno de los cultivos más importantes en México, en lo que respecta a su producción, durante la zafra 2021-2022 fueron industrializadas 54.6 millones de toneladas de caña bruta, lo que representa el sexto lugar en producción de caña de azúcar a nivel mundial (CONADESUCA, 2023), demostrando la importancia económica para el país. Sin embargo, durante la industrialización se generan coproductos como la vinaza, cachaza, melaza, residuos de cosecha o el bagazo, que no son valorizados adecuadamente o se hace un uso inadecuado de los mismos, generando problemas al medio ambiente. Aunado a esto, en México, la industrialización de la caña de azúcar se centra en la producción de sacarosa (azúcar refinada), dando menor importancia a productos y coproductos, los cuales pueden ser valorizados y con esto detonar la diversificación de esta agroindustria (Aguilar-Rivera *et al.*, 2017).

En México, el bagazo de caña es uno de los principales coproductos generados en la agroindustria azucarera y es utilizado principalmente para producir electricidad y vapor de alta presión a través de la combustión, lo que resulta en la emisión de gases de efecto

invernadero (Kumar *et al.*, 2021). Sin embargo, es un coproducto al cual se le puede dar valor agregado a gran escala e impulsar la diversificación productiva y con ello disminuir los problemas del medio ambiente. Es una materia prima barata que, debido a que está compuesta por celulosa (32-35 %), hemicelulosa (20-32 %), lignina (17-32 %) y cenizas (1-9 %) puede ser utilizada para diversos objetivos como son la producción de electricidad, enzimas, azúcares y biocombustibles como el bioetanol (Wu *et al.*, 2020). El bioetanol es el biocombustible con una demanda alta y en crecimiento, debido a esto la producción también ha aumentado año con año, en 2018, la producción mundial ascendió a los 110 mil millones de litros, sin embargo, es necesario el desarrollo de procesos viables tanto tecnológica como económicamente, en los que se aproveche de forma sostenible el carbono contenido en la biomasa (Dincer, 2018), y en este sentido el bagazo de caña es una buena opción. Sin embargo, para la producción de bioetanol son necesarias tres etapas: 1) Pretratamiento, 2) hidrólisis de la biomasa y 3) fermentación (Su *et al.*, 2020).

El objetivo de los pretratamientos es el reblandecimiento de la estructura recalcitrante de la biomasa, para que, en el caso particular de la hidrólisis

enzimática, estén disponibles los sustratos (celulosa y hemicelulosa), se disminuya el contenido de lignina y aumente la eficiencia en la etapa de hidrólisis (Sheng *et al.*, 2021). Este proceso puede ser logrado a través de diferentes métodos, como la decristalización, la solubilización de la hemicelulosa, o la modificación de la estructura de la lignina (Bychkov *et al.*, 2019). Por esta razón, se han investigado diferentes tecnologías de pretratamiento con el fin de mejorar la eficiencia de la conversión de la biomasa lignocelulósica. En ellos se incluyen técnicas mecánicas, biológicas, alcalinas, con ácidos diluidos, pretratamiento por explosión con fibras de amonio, tratamientos hidrotérmicos (vaporización, agua caliente), entre otras (Sankaran *et al.*, 2020). Sin embargo, el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica utilizando enfoques tradicionales requiere altas temperaturas y un alto consumo energético, lo que ha generado un interés cada vez mayor en el desarrollo de tecnologías más eficientes en términos energéticos, tales como el pretratamiento con microondas (Haldar y Purkait, 2021) y el pretratamiento con peróxido de hidrógeno alcalino (Niju *et al.*, 2020), y que a su vez, reduzcan la producción de inhibidores enzimáticos, por ejemplo el furfural (Niju y Swathika, 2019).

Por último, la hidrólisis enzimática, también conocida como sacarificación enzimática, es un proceso clave que tiene como objetivo liberar monosacáridos, o azúcares fermentables, a partir de la celulosa y la hemicelulosa (Kucharska *et al.*, 2020). Estos monosacáridos son la principal fuente de carbono para la producción de etanol (Lukajtis *et al.*, 2018), por lo que esta etapa resulta fundamental en la obtención de biocombustibles a partir de residuos agrícolas como el bagazo de caña. Sin embargo, el uso de enzimas encarece los procesos de sacarificación, ya que por lo general para realizar estos estudios se utilizan enzimas comerciales de alto costo. Sin embargo, una alternativa son microorganismos presentes en la biomasa lignocelulósica, que generalmente tienen la capacidad de producir enzimas hidrolíticas (Vázquez-Montoya *et al.*, 2020) que pueden ser explotados en sistemas de FES utilizando residuos o sustratos baratos que pueden ser aprovechados y valorizados (Moran-Aguilar *et al.*, 2021). Es por esto, que el objetivo del presente trabajo fue producir enzimas hidrolíticas utilizando bagazo de caña como soporte/sustrato por FES utilizando una cepa fúngica de *Trichoderma sp.* para la sacarificación de bagazo de caña y su posterior conversión a etanol.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Para la producción de enzimas hidrolíticas por FES se aislaron cepas fúngicas a partir de bagazo (Ingenio azucarero local) y hoja de caña de azúcar (Colegio de

Postgraduados, Campus Córdoba). La estrategia de aislamiento consistió en colocar muestras en una cámara húmeda a 30°C por 7 días, una vez que era visible el crecimiento de cepas fúngicas fueron transferidas a cajas petri que contenía agar cloranfenicol, rosa de bengala y diclorán (DIFCO®), las cepas seleccionadas fueron transferidas por la técnica de punta de hifa en cajas Petri con el mismo medio y fueron mantenidas a 30°C durante 5 días (Afolabi *et al.*, 2020; Martínez-Salgado *et al.*, 2021). Por último, una vez aisladas las cepas fueron transferidas a cajas petri que contenían agar papa dextrosa (APD) (Lacerda *et al.*, 2018). Las cepas fueron caracterizadas de acuerdo con sus características macroscópicas-microscópicas (Savín-Molina *et al.*, 2021) y fueron conservadas por liofilización en leche descremada al 10%. Por otro lado, la levadura utilizada en la fermentación alcohólica fue la cepa comercial de *Saccharomyces cerevisiae*.

Determinación cualitativa de cepas fúngicas para producir enzimas hidrolíticas

Para evaluar cualitativamente el potencial para la producción de celulasas, fueron inoculados discos miceliales (5 mm) en cajas petri que contenían (% p/v) agar 1.5, Carboximetil celulosa (CMC) 0.2, NaNO₃ 0.2, K₂HPO₄ 0.1, MgSO₄ 0.05, KCl 0.05, y peptona 0.2 (Arana-Cuenca *et al.*, 2019; Kasana *et al.*, 2008) y mantenidas a 30 °C durante tres días, para finalmente revelar el halo de actividad con solución rojo Congo al 1 % realizando lavados con NaCl (1 M) (Herrera, 2003; Soria-Noroña y López-Almeida, 2020). Para la detección de actividad xilanasas se siguió el mismo procedimiento descrito para la actividad celulasa, únicamente en el medio de cultivo fue sustituida la CMC por xilano de abedul (XA) (Arana-Cuenca *et al.*, 2019; Kasana *et al.*, 2008). Adicionalmente, con el objetivo de conocer que cepa pudiera tener mejor capacidad para producir enzimas hidrolíticas por FES, se determinó el índice de potencia (IP), de acuerdo con la siguiente ecuación (Soria-Noroña y López-Almeida, 2020):

$$IP = \frac{\text{Diámetro del Halo de Hidrólisis}}{\text{Diámetro de la Colonia}}$$

Fermentación en estado sólido

Para la producción de xilanasas y celulasas por FES el bagazo de caña de azúcar que se utilizó como soporte-sustrato fue lavado con agua fría y secado a 50°C por 24 h en un horno, seguido de un tamizado con un tamiz de malla 16 (1.1 mm) recuperando la fracción retenida en el tamiz. El bagazo tamizado fue impregnado con 20 mL de H₂SO₄ al 1 % (v/v) por cada gramo de bagazo y mantenido por 30 min, el bagazo fue neutralizado con NaOH al 1 M y secado en horno a 50°C hasta

alcanzar un porcentaje de humedad constante (inferior al 10 % en promedio) (Figuroa-Torres *et al.*, 2020).

La FES se llevó a cabo con 2.5 g de bagazo de caña pretratado ajustado a 70 % de humedad y una concentración de inóculo de 2×10^7 esporas/g de soporte, utilizando como sistema recipientes de cristal de 100 mL de capacidad con geometría uniforme. El porcentaje de humedad fue ajustado impregnando el sustrato con el medio Pontecorvo que contenía (g/L): 1.8 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.5 urea, 0.5 KH_2PO_4 , 0.2 KCl, 0.2 $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ y 0.3 mL/L de elementos traza (mg/L): 100 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 50 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 50 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 250 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 85 FeCl_3 , y 100 ZnSO_4 . La FES se realizó a 30 °C por 96 h en una cámara húmeda (Arana-Cuenca *et al.*, 2019).

Las enzimas fueron recuperadas de acuerdo con la metodología descrita por Arana-Cuenca *et al.* (*ibídem*), por cada gramo de sustrato fermentado se agregaron 20 mL de agua purificada, la mezcla fue agitada durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente la mezcla fue filtrada al vacío y centrifugada a 10,000 rpm por 15 min a 4°C, el sobrenadante considerado como extracto enzimático fue recuperado y mantenido en congelación (-72°C), hasta su uso para la determinación de la actividad enzimática y/o sacarificación enzimática.

Actividad enzimática

La actividad Celulasa fue determinada mezclando 0.1 mL de extracto enzimático con 0.9 mL de una solución al 0.25 % (p/v) de carboximetil celulosa sódica (SIGMA®) en solución amortiguadora citratos pH 5.5 0.1 M. La mezcla fue mantenida a 40°C por 15 min, la reacción fue detenida agregando 1 mL de solución de ácido 3,5-Dinitrosalicílico (SIGMA®), la absorbancia fue determinada a 575 nm de acuerdo con la metodología reportada por Miller (1959), utilizando una curva patrón con glucosa (SIGMA®). La actividad xilanasa fue determinada mezclando 0.1 mL de extracto enzimático con 0.9 mL de una solución al 0.25 % (p/v) de Xilano de abedul (SIGMA®) en solución amortiguadora citratos pH 5.5 0.1 M. La mezcla fue mantenida a 40°C por 15 min, la reacción fue detenida agregando 1 mL de solución de ácido 3,5-Dinitrosalicílico (SIGMA®), la absorbancia fue determinada a 575 nm de acuerdo con la metodología reportada por Miller (1959), utilizando una curva patrón con xilosa (SIGMA®). Una unidad celulasa y xilanasa (U) fue definida como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μmol de azúcares reductores (glucosa y xilosa, respectivamente) por minuto. Las actividades enzimáticas fueron reportadas como unidades por gramo de sustrato seco (U/gss) (Figuroa-Torres *et al.*, 2020; Kumar y Shukla, 2018).

Pretratamiento con microondas y peróxido de hidrógeno

Para evaluar el efecto del pretratamiento con microondas sobre la sacarificación enzimática, el bagazo de caña fue lavado, secado y tamizado (tamaño de partícula ≤ 0.5 mm, malla 30), posteriormente se agregaron 20 mL de agua destilada por gramo de bagazo de caña. El tratamiento con microondas se realizó con el bagazo húmedo irradiando por 5 y 10 min a tres potencias (p) 30, 50 y 80 en un microondas comercial (General Electric®) (Kainthola *et al.*, 2019; Ma *et al.*, 2009).

Para evaluar el efecto del pretratamiento con peróxido de hidrógeno sobre la sacarificación enzimática, el bagazo de caña fue lavado, secado y tamizado (tamaño de partícula ≤ 0.5 mm, malla 30). Las variables fueron evaluadas en tres niveles: bajo, medio y alto. El tratamiento se inició con una relación mL de peróxido por gramo de bagazo de 33.3:1, temperatura de 26 °C, y por 1, 3 y 6 h. Una vez establecido el tiempo de pretratamiento más adecuado fue evaluado el efecto de la relación mL de peróxido por gramo de bagazo (16.6:1, 33.3:1 y 100:1) a 26 °C y concentración del peróxido de hidrógeno 3% (v/v). Posteriormente se realizó el tratamiento a tres temperaturas 26, 50 y 70°C a las condiciones de tiempo y relación de peróxido:bagazo fijadas anteriormente y una concentración del peróxido de hidrógeno 3% (v/v). Por último, se evaluaron tres concentraciones de peróxido de hidrógeno 1, 3 y 5% a las condiciones determinadas anteriormente.

Después de los pretratamientos se realizó una extracción agregando 20 mL de agua destilada por cada gramo de bagazo, la mezcla fue agitada por 5 min y centrifugada a 10 000 rpm a 4°C, a la fracción soluble se le determinó azúcares totales por el método fenol/sulfúrico (Başar *et al.*, 2021; Meléndez-Hernández *et al.*, 2021).

Sacarificación enzimática de bagazo de caña pretratado

La sacarificación enzimática fue realizada agregando 50 mg de bagazo pretratado a 10 mL de solución amortiguadora de citratos 0.1 M pH 5.5 agregando la cantidad de extracto enzimático equivalente a 36 U por gramo de bagazo, la mezcla de reacción fue mantenida a 150 rpm y 40 °C por 48 h. Transcurrido el tiempo, fueron cuantificados los azúcares reductores por el método DNS (Miller, 1959), utilizando una curva estándar de glucosa. Todos los experimentos incluyeron sistemas control, en los cuales el extracto enzimático fue sustituido por agua estéril.

Fermentación alcohólica

La fermentación alcohólica se realizó utilizando un medio de cultivo que contenía (g/L): 1 extracto de levadura, 10 azúcares fermentables obtenidos de la sacarificación enzimática de bagazo, 2 NH₄SO₄, 2 MgSO₄ 7H₂O, ajustando la levadura comercial a una concentración de 1 x 10⁶ células por mililitro de medio de cultivo. La fermentación fue realizada a 150 rpm y 30°C por 48 h. El caldo fermentado obtenido fue centrifugado a 10,000 rpm a 4°C por 15 min, el sobrenadante fue filtrado a través de una membrana de 0.45 µm y resguardado para la cuantificación de etanol y azúcares reductores (Figuroa-Torres *et al.*, 2020).

Cuantificación de etanol y azúcares reductores residuales

El etanol fue cuantificado por el método espectrofotométrico de dicromato de potasio reportado por Isarankura-Na-Ayudhya *et al.* (2007), usando solución 0.1 M de dicromato de potasio (HYCEL®) en ácido sulfúrico 5 M. La reacción fue llevada a cabo mezclando 300 µL de las muestras a analizar, con 3 mL de solución de dicromato, la mezcla fue mantenidas a temperatura ambiente por 30 min y la absorbancia fue medida a 600 nm. La concentración de etanol fue calculada usando una curva con etanol como estándar. Asimismo, los azúcares reductores residuales, presentes en las muestras de la fermentación, fueron cuantificados con el método de azúcares reductores DNS (Miller, 1959).

Diseño experimental y Análisis estadístico

Para los experimentos de pretratamiento y sacarificación enzimática, se empleó un diseño completamente al azar, con tres réplicas por cada tratamiento. Los datos relativos al efecto del pretratamiento con peróxido de hidrógeno que cumplieron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza fueron sometidos a un análisis de la varianza (ANOVA) utilizando el programa RStudio versión 2022.12.0+353. Las medias se compararon mediante la prueba de Tukey con una significancia del 5%. Los resultados que cumplieron con el supuesto de normalidad, pero no cumplieron el supuesto de homogeneidad de varianza (microondas y sacarificación), se sometieron a la prueba de Brown-Forsythe con test de comparaciones múltiples de Games-Howell utilizando el software RStudio.

Para verificar el supuesto de normalidad se empleó la prueba de Shapiro-Wilk con un intervalo de confianza de 95%. Para verificar el supuesto de homogeneidad de varianza se empleó la prueba de Bartlett con un intervalo de confianza de 95%, ambas pruebas se

realizaron utilizando el software Rstudio. El supuesto de independencia se verificó aleatorizando la aplicación de los tratamientos a las unidades experimentales, ya que estos tratamientos solo tienen efecto sobre la unidad experimental en cuestión y no intervienen de ninguna manera sobre los resultados de las demás muestras.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento de cepas fúngicas

De las muestras de bagazo y hoja de caña de azúcar se lograron aislar dos cepas fúngicas, una de cada muestra, ambas mostraron características macroscópicas similares: desarrollo micelial algodonoso de color amarillo, una coloración del medio de cultivo amarilla-café y la presencia de conidios amarillos-verdes después de 5 días, tal y como se puede observar en la figura 1 a y b. Las características macroscópicas de los aislados fúngicos corresponden a las características reportadas para especies del género *Trichoderma*, por lo cual es posible que pertenezcan a este género (Asis *et al.*, 2021; Zin y Badaluddin *et al.*, 2020).

Así mismo, las cepas fúngicas fueron caracterizadas microscópicamente, los resultados mostraron conidios globosos nacidos en racimos, fiálides en forma de botella alargada, y conidióforos ramificados para ambas cepas, tal y como se puede observar en la figura 1 c y d. Los resultados son similares a los reportados por diversos autores para el género *Trichoderma* (Asis *et al.*, 2021; Barnett y Hunter, 1972; Naher *et al.*, 2021), particularmente para especies como *T. Reesei*, *T. Harzianum* y *T. Viride*. Por lo que, las cepas aisladas en el presente trabajo pueden pertenecer a este género, asimismo, Mendoza-Infante *et al.* (2022) y Rukmana *et al.* (2020) reportaron la presencia del género *Trichoderma* en paja y bagazo de caña de azúcar reforzando el resultado obtenido.

La capacidad de producción de enzimas hidrolíticas se determina por presencia de zonas claras alrededor de las colonias después del revelado con rojo Congo, este colorante interacciona con los polisacáridos unidos por enlaces β 1-3, (Matos *et al.*, 2018), debido a esto en las zonas donde los sustratos fueron hidrolizados por las enzimas, el colorante no forma el complejo, generando una zona transparente que es conocida como halo de hidrólisis. La estrategia ha sido utilizada por diversos autores para la selección de cepas productoras de enzimas celulasas y xilanasas para sistemas de FES (Arana-Cuenca *et al.*, 2019; Gordillo-Fuenzalida *et al.*, 2019; Ire *et al.*, 2018), y fermentación sumergida (Abd Elrsoul y Bakhiet, 2018; Saroj *et al.*, 2018; Vázquez-Montoya *et al.*, 2020).

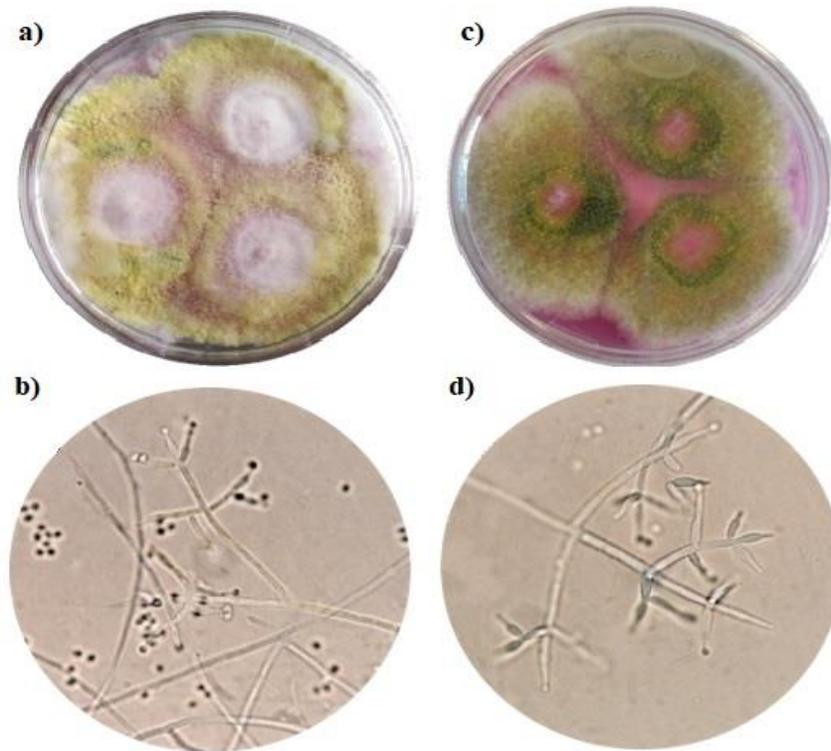


Figura 1. Caracterización de cepas fúngicas aisladas de bagazo de caña y hojas de caña de azúcar: a) macroscópica, b) microscópica; características de cepa aislada de hoja de caña de azúcar: c) macroscópica, d) microscópica.

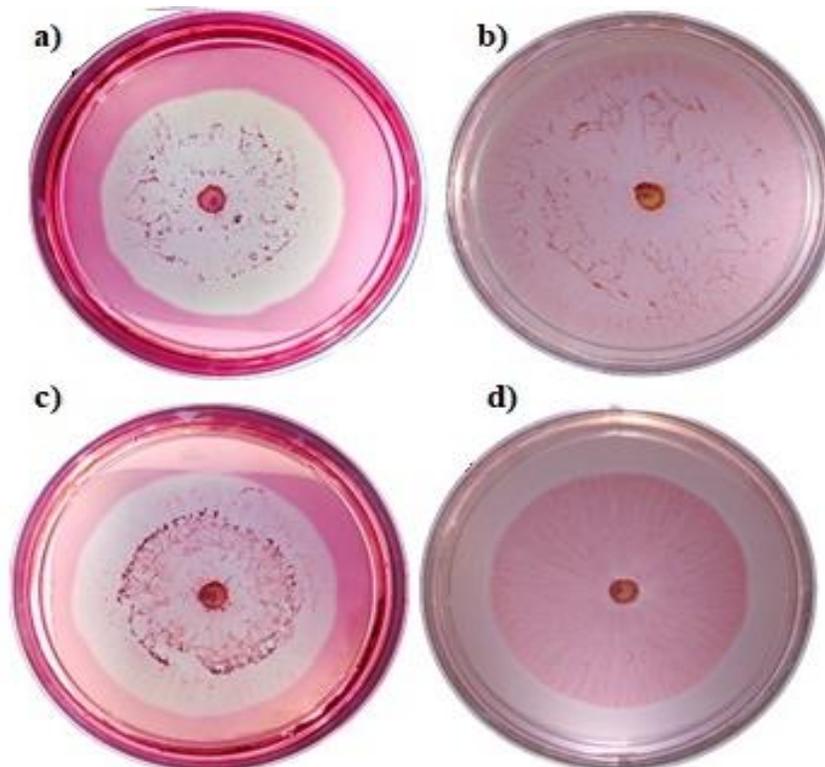


Figura 2. Halos de hidrólisis producto de la actividad hidrolítica. Cepa aislada de bagazo de caña: a) actividad celulasa, b) actividad xilanasa; cepa aislada de hoja de caña: c) actividad celulasa, d) actividad xilanasa.

Por otro lado, con el objetivo de seleccionar la cepa que pudiera presentar un mayor potencial para la producción de celulasas y xilanasas por FES, fue determinado el índice de potencia de las cepas. Los resultados de la tabla 1 son indicativo de que la cepa aislada de hojas de caña produce una mayor cantidad de xilanasas y celulasas por FES ya que el IP demuestra la relación entre su producción y el crecimiento micelar, demostrando una expresión de actividad de hidrolítica extracelular, (a mayor IP mayor actividad hidrolítica). Además, autores como Florencio *et al.* (2012) demostraron que cepas con un IP mayor, obtenido en pruebas en caja Petri, también presentaron una mayor actividad enzimática en sistemas de FES, por lo tanto, la cepa aislada de bagazo de caña fue utilizada en la FES para la producción de enzimas hidrolíticas.

Producción de xilanasas y celulasas por fermentación en estado sólido

Los resultados de la producción de celulasa y xilanasas por FES utilizando la cepa *Trichoderma sp.* aislada de hoja de caña de azúcar, mostraron que ambas actividades máximas fueron obtenidas después de 48 h de fermentación, obteniéndose 2.07 U/gss para la actividad celulasa y 61.62 U/gss para la actividad xilanasas, tal y como se puede observar en la figura 3.

Los resultados muestran que las actividades enzimáticas aumentan hasta llegar al máximo después de 48 h de FES y se mantienen constantes hasta las 72 h para posteriormente disminuir. El tiempo de máxima actividad enzimática reportado en el presente trabajo es inferior al reportado para la producción xilanasas y celulasas (72 h) por *A. niger* en FES utilizando bagazo de caña como soporte, sin embargo, los títulos de actividad celulasa obtenidos fueron inferiores 14.9 U/g para la actividad celulasa, mientras que los obtenidos para la actividad xilanasas (26.1 U/g) fueron superiores (Rodríguez-Zuñiga *et al.*, 2014). Asimismo, Moran-Aguilar *et al.* (2021) reportaron que la máxima actividad celulasa (1.12 U/gss) y xilanasas (1365 U/gss) fue obtenida después de 120 h de fermentación cuando se utilizó bagazo de caña de azúcar como sustrato y la cepa *A. niger*, este tiempo es mayor al obtenido en el presente trabajo para la mayor expresión de actividad enzimática. Así mismo, la actividad celulasa (2.07

U/gss) obtenida en el presente trabajo fue mayor a lo reportado por el mismo autor. Por otro lado, en menor tiempo se obtuvieron actividades enzimáticas mayores a lo reportado por autores como Figueroa-Torres *et al.* (2020) para la producción de estas mismas enzimas en donde obtuvieron 2 y 42 U/gss para la actividad celulasa y xilanasas respectivamente, con una cepa del género *Trichoderma*, sin embargo, es importante mencionar que el sustrato utilizado fue lirio acuático y un sistema de columna empacada con aireación constante. Por lo tanto, las actividades enzimáticas obtenidas en el presente trabajo se pueden considerar adecuadas para la hidrólisis enzimática de bagazo de caña de azúcar.

Pretratamiento con microondas y peróxido de hidrógeno

Los resultados de los pretratamientos con peróxido de hidrógeno que se muestran en la tabla 2 indican que las variables más importantes para el pretratamiento con peróxido de hidrógeno son el tiempo de reacción y la concentración de peróxido utilizada, ya que, en ambos tratamientos se muestran diferencias significativas entre los niveles de tratamiento. Por otro lado, la relación peróxido: bagazo y la temperatura no mostraron diferencias significativas en la concentración de azúcares totales obtenidos. Los resultados obtenidos en el presente trabajo difieren de lo reportado por Başar *et al.* (2021), quienes obtuvieron una mayor solubilización de azúcares empleando 13.33 mL/g (Peróxido de hidrógeno alcalino/pasto varilla), en comparación con el pretratamiento con 14.28 mL/g, evidenciando un efecto significativo de la relación peróxido:bagazo sobre la solubilización de azúcares. No obstante, es relevante señalar que la composición del pasto difiere de la composición del bagazo de caña de azúcar (Başar *et al.*, 2021; Wu *et al.*, 2020). Debido a que el objetivo del pretratamiento con peróxido de hidrógeno fue ablandar los componentes recalcitrantes del bagazo de caña de azúcar para facilitar la sacarificación enzimática, se decidió continuar la experimentación con el bagazo de caña de azúcar pretratado por 6 horas con 100 mL de peróxido de hidrogeno al 3 % por cada gramo de bagazo a 50 C, que libero 0.330 g azucares totales por cada gramo de bagazo.

Tabla 1. Índice de potencia para las cepas aisladas.

Fuente de carbono	Origen de la cepa	Diámetro colonia (cm)	Diámetro del halo de hidrólisis (cm)	IP±Error Estándar
Carboximetil celulosa	BC	3.13	3	0.95 ± 0.010
	HC	2.33	2.31	0.99 ± 0.025
Xilano de abedul	BC	3.93	3.63	0.92 ± 0.024
	HC	3.13	3.26	1.04 ± 0.011

BC: Bagazo de caña, HC: Hojas de caña, IP: Índice de potencia. **Nota:** datos promedio de 3 repeticiones.

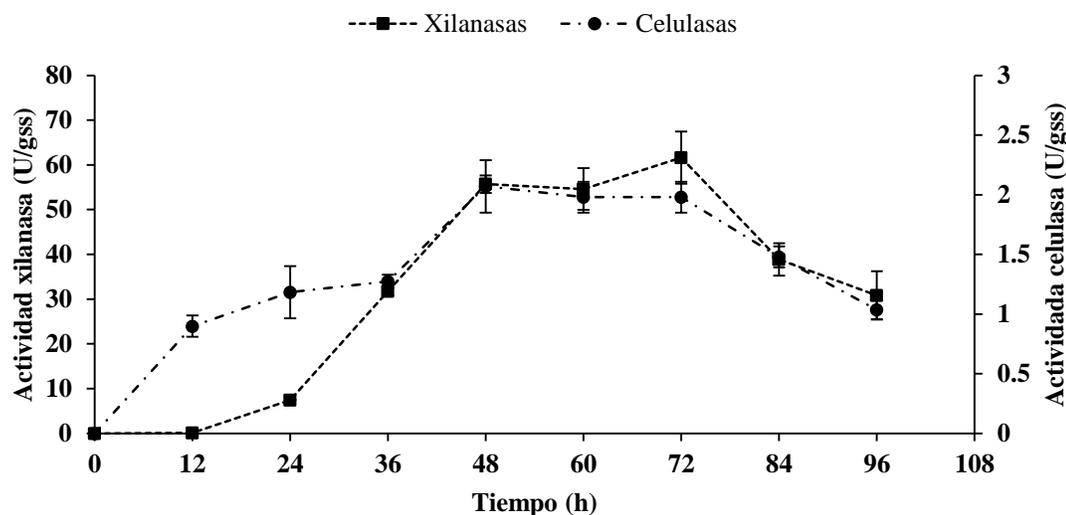


Figura 3. Perfil de actividad celulasa y xilanasa por *Trichoderma sp.* aislada de hoja de caña de azúcar en fermentación en estado sólido.

Tabla 2. Azúcares totales (mg azúcar/g bagazo) liberados en el pretratamiento de bagazo de caña con peróxido de hidrógeno en distintas condiciones.

Variable	Nivel			
	Control	Bajo	Medio	Alto
Tiempo de reacción	0.053±0.001 ^d	0.115±0.006 ^c	0.151±0.003 ^b	0.180±0.017 ^a
Relación peróxido: bagazo	0.048±0.003 ^b	0.173±0.031 ^a	0.184±0.029 ^a	0.239±0.055 ^a
Temperatura ⁺	0.087±0.007 ^b	0.288±0.015 ^a	0.330±0.041^a	0.410±0.153 ^a
Concentración de peróxido	0.046±0.005 ^d	0.119±0.007 ^c	0.205±0.016 ^b	0.261±0.020 ^a

*Los valores representan la media±DE (Desviación estándar). Las medias con letras distintas por columna son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$ y ⁺Games_Howell, ≤ 0.05).

Asimismo, los resultados de los pretratamientos con microondas no mostraron diferencias estadísticamente significativas ni a las diferentes potencias, ni a los diferentes tiempos de tratamiento, en cuanto al contenido de azúcares totales, sin embargo, debido a que el objetivo de los pretratamientos es ablandar las estructuras recalcitrantes mediante la modificación de la lignina, hemicelulosa y celulosa, así como solubilizar otros compuestos orgánicos como proteínas, carbohidratos y lípidos el pretratamiento con microondas puede impactar en la reducción del índice de cristalinidad así como el grado de polimerización de la celulosa (Hoang *et al.*, 2021), lo cual puede impactar sobre la eficiencia de la sacarificación enzimática en muestras de biomasa lignocelulósica, por lo que el efecto real de estos pretratamientos se reflejara en el ensayo de sacarificación enzimática, esto para ambos pretratamientos, en este caso se decidió sacarificar enzimáticamente el bagazo pretratado a una potencia de 50 por 5 minutos.

Sacarificación enzimática de bagazo de caña pretratado

Los resultados de la sacarificación de bagazo de caña utilizando los extractos enzimáticos producidos por FES utilizando *Trichoderma sp.* aislada hoja de caña de azúcar mostró que el pretratamiento con peróxido de hidrógeno fue el mejor pretratamiento para la sacarificación enzimática en comparación con el pretratamiento con microondas (Figura 4). La concentración de azúcares fermentables obtenida del pretratamiento con peróxido de hidrógeno fue de 2.07 g/L con un rendimiento de 0.41 g de azúcares reductores por gramo de bagazo seco sacarificado. Por otro, lado, la concentración obtenida de azúcares reductores después del pretratamiento con microondas fue de 0.385 g/L con un rendimiento de 0.077 g de azúcares reductores por cada gramo de bagazo, esta concentración de azúcares reductores fue menor a la obtenida con el bagazo sin pretratar que fue de 0.540 g/L con un rendimiento de 0.081 g de azúcares reductores por cada gramo de bagazo. Dicho resultado

pudo deberse a que el tratamiento con microondas genero compuestos que pueden inhibir la actividad enzimática de las celulasas y xilanasas, tal es el caso de los compuestos fenólicos derivados de la lignina que han sido reportados como altamente inhibidores de celulasas debido a que generan su precipitación y la aparición de estos compuestos dependen del tipo de pretratamiento y el material pretratado (Zhai *et al.*, 2022), motivo por el cual se puede inferir que el pretratamiento con peróxido de hidrogeno no genera la aparición de estos compuestos en el bagazo de caña y tanto la celulosa como la hemicelulosa se encuentran disponibles para las enzimas.

El resultado de la sacarificación enzimática obtenido en el presente trabajo fue mejor al obtenido por Nogueira *et al.* (2021), quienes alcanzaron una eficiencia de 0.061g de azúcares reductores por gramo de bagazo de piña pretratado con peróxido de hidrógeno, sacarificado con celulasas comerciales (9 FPU/g), esta diferencia puede deberse al uso exclusivo de enzimas celulasas, en comparación al presente trabajo, en el que los extractos enzimáticos contaban con actividad xilanasa y celulasa, asimismo, debido a que las enzimas fueron producidas utilizando bagazo de caña de azúcar como soporte/ sustrato existe la posibilidad de que la especificidad sea mayor que la de

las enzimas comerciales. Por otro lado, Figueroa-Torres *et al.* (2020) utilizando enzimas producidas a partir de lirio acuático como soporte/sustrato, reportan valores superiores de azúcares reductores por gramo de lirio acuático sacarificado (0.46 y 0.51 g) a los obtenidos en el presente trabajo. Sin embargo, es importante mencionar que el pretratamiento utilizado fue explosión con vapor, el cual es diferente al aplicado en la presente investigación al igual que el material sacarificado. Los azúcares fermentables obtenidos del pretratamiento con peróxido de hidrogeno sacarificados enzimáticamente fueron utilizados como fuente de carbono para la producción de etanol.

Fermentación alcohólica

Los resultados de la fermentación alcohólica con la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* comercial y como única fuente de carbono los azúcares reductores/fermentables obtenidos de la sacarificación enzimática mostró que la máxima producción de etanol se obtuvo después de 48 h, con un máximo de 4.32 g/L con un rendimiento de 0.17 g de etanol por cada gramo de bagazo de caña de azúcar sacarificado y durante la fermentación se consumió aproximadamente el 90% de los azúcares fermentables, dichos resultados se pueden observar en la figura 5.

Tabla 3. Azúcares totales liberados (mg/g) en el pretratamiento de bagazo de caña con microondas en distintas condiciones.

Tiempo	Potencia			
	Control	30	50	80
5 min	25.33±0.604 ^a	23.92±0.903 ^a	27.39±1.494^a	27.41±3.668 ^a
10 min	20.69±0.56 ^a	26.04±0.5.75 ^a	21.72±5.703 ^a	24.74±0.974 ^a

*Los valores representan la media±DE (Desviación estándar). Las medias con letras distintas por columna son estadísticamente diferentes (Games_Howell, $p \leq 0.05$).

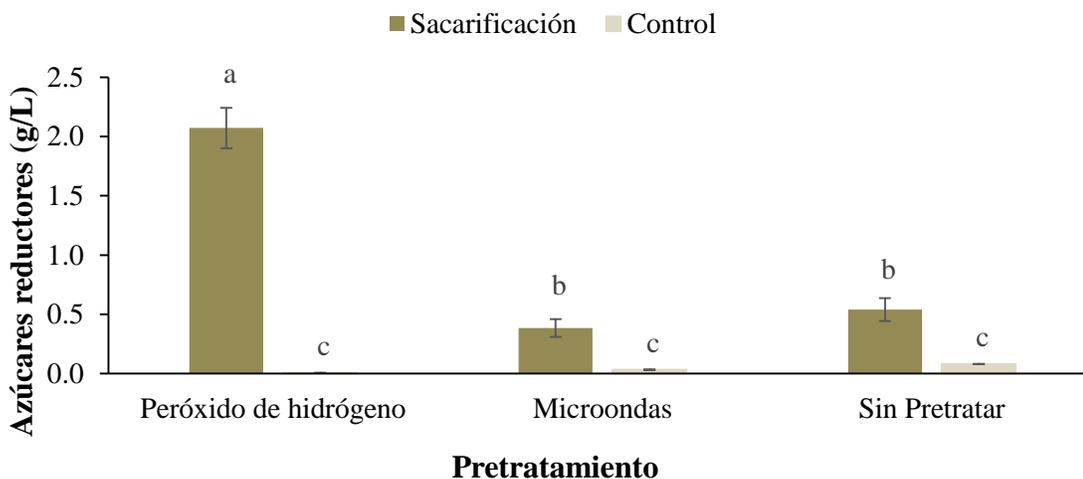


Figura 4. Sacarificación enzimática de bagazo de caña de azúcar pretratado con peróxido de hidrogeno y microondas. Las medias con letras distintas por columna son estadísticamente diferentes (Games_Howell, $p \leq 0.05$).

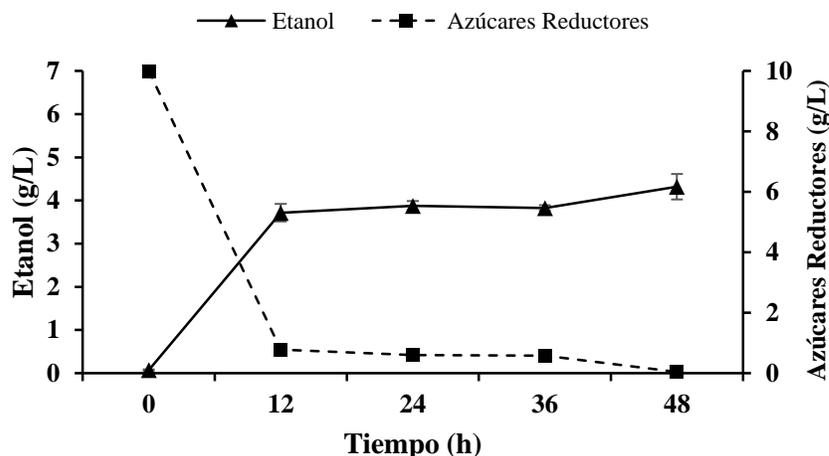


Figura 5. Perfil de producción de etanol utilizando azúcares obtenidos de la sacarificación enzimática de bagazo de caña de azúcar y una levadura comercial.

Los rendimientos de etanol obtenidos en la presente investigación fueron inferiores a los reportados por Prajapati *et al.* (2020) para la producción de bioetanol a partir de bagazo de caña quienes obtuvieron 0.415 gramos de etanol por cada gramo de bagazo pretratado y Jugwanth *et al.* (2020) quienes obtuvieron 0.49 gramos de etanol por cada gramo de azúcar equivalente a glucosa obtenido de la sacarificación de bagazo, Araujo-Guilherme *et al.* (2019) obtuvieron 0.34 g etanol/g de glucosa y Huang *et al.* (2015) de 0.42 g etanol/g de celulosa de bagazo de caña. Sin embargo, es importante mencionar que en los trabajos de referencia utilizaron cepas con capacidad para fermentar hexosas y pentosas, y enzimas comerciales de sistemas de sacarificación y fermentación simultánea.

CONCLUSIÓN

El aislamiento de cepas fúngicas autóctonas permitió la producción de celulasas y xilanasas por fermentación en medio sólido con especificidad adecuada para hidrolizar/ sacarificar bagazo de caña de azúcar pretratado y su posterior conversión a etanol. El pretratamiento con peróxido de hidrógeno alcalino permitió la correcta sacarificación del bagazo de caña. Sin embargo, las condiciones del pretratamiento con microondas no condujeron a un aumento de la sacarificación enzimática respecto al bagazo sin pretratar. El presente trabajo tiene como perspectiva optimizar la fermentación sólida para aumentar la actividad enzimática, así como también, la caracterización de las enzimas, parámetros de los pretratamientos y de la fermentación alcohólica.

Acknowledgement

To the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for the scholarship 960408 granted to carry out the Master's degree studies of the first author.

Funding. This research was funding by CONACYT through a master's scholarship. This master's degree was carried out in Colegio de Postgraduados Campus Córdoba.

Conflict of interests. The authors declare that there is no conflict of interests related to this publication

Compliance whit ethical standards. The authors having not to declare, due the nature of this publication.

Data availability. The data are available with the corresponding author on request.

Author contribution statement (CRediT)

S. Pérez-Contreras: Conceptualization, Formal analysis, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Resources, Writing - original draft, Writing review and editing. **R. Hernández-Martínez:** Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Project administration, Resources, Supervision, writing - original draft, writing - review and editing. **F. Hernández-Rosas:** Conceptualization, Formal analysis, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Resources, Writing - original draft, Writing - review and editing. **J. A. Herrera-Corredor:** Conceptualization, Formal analysis, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Resources, Writing - original draft, Writing - review and editing. **E.C. Varela-Santos:** Conceptualization,

Formal analysis, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Resources, Writing - original draft, Writing- review and editing.

REFERENCIAS

- Abd, E. R., and Bakhiet, S. E. A., 2018. Optimization of factors influencing cellulase production by some indigenous isolated fungal species. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 11(1), pp. 31-36. Disponible en línea: <https://jjbs.hu.edu.jo/files/v11n1/Paper%20Number%205m.pdf>
- Afolabi, C. G., Ezekiel, C. N., Ogunbiyi, A. E., Oluwadairo, O. J., Sulyok, M., and Krska, R., 2020. Fungi and mycotoxins in cowpea (*Vigna unguiculata* L) on Nigerian markets. *Food Additives y Contaminants: Part B*, 13(1), pp. 52–58. <https://doi.org/10.1080/19393210.2019.1690590>
- Aguilar-Rivera, N., Debernardi-Vázquez, T. J., and Herrera-Paz, H. D., 2017. Byproducts, coproducts and derivatives of the sugar agroindustry. *Agroproductividad*, 10(11), pp. 13–20. Disponible en línea: <https://revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/71/67>
- Arana-Cuenca, A., Tovar-Jiménez, X., Favela-Torres, E., Perraud-Gaime, I., González-Becerra, A. E., Martínez, A., Moss-Acosta, C. L., Mercado-Flores, Y., and Téllez-Jurado, A., 2019. Use of water hyacinth as a substrate for the production of filamentous fungal hydrolytic enzymes in solid-state fermentation. *3 Biotech*, 9(1), pp. 1–9. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1529-z>
- Araujo-Guilherme, A., Dantas, P. V. F., de Araújo Padilha, C. E., Dos Santos, E. S., and de Macedo, G. R., 2019. Ethanol production from sugarcane bagasse: Use of different fermentation strategies to enhance an environmental-friendly process. *Journal of environmental management*, 234, pp. 44-51. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.12.102>
- Asis, A., Shahriar, S. A., Naher, L., Saallah, S., Fatihah, H. N. N., Kumar, V., and Siddiquee, S., 2021. Identification patterns of *Trichoderma* strains using morphological characteristics, phylogenetic analyses and lignocellulolytic activities. *Molecular biology reports*, 48(4), pp. 3285–3301. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06321-0>
- Barnett, H. L. and Hunter, B. B., 1972. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. 3rd Edition, Burgess Publishing Co., Minneapolis.
- Başar, İ. A., Çoban, Ö., Göksungur, M. Y., Eskicioğlu, Ç., and Perendeci, N. A., 2021. Enhancement of lignocellulosic biomass anaerobic digestion by optimized mild alkaline hydrogen peroxide pretreatment for biorefinery applications. *Journal of Environmental Management*, 298, 113539p. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113539>
- Bychkov, A., Podgorbunskikh, E., Bychkova, E., and Lomovsky, O., 2019. Current achievements in the mechanically pretreated conversion of plant biomass. *Biotechnology and Bioengineering*, 116(5), pp. 1231–1244. <https://doi.org/10.1002/bit.26925>
- CONADESUCA., 2023. Comité Nacional para el Desarrollo Sustentable de la Caña de Azúcar (CONADESUCA). 9º Informe Estadístico del Sector Agroindustrial de la Caña de Azúcar en México. Disponible en línea: https://www.siiiba.conadesuca.gob.mx/siiiba/docext/9no_informe_estadistico.pdf
- Dincer, I., 2018. Comprehensive energy systems. Elsevier. pp. 875-908. Disponible en línea: <https://www.sciencedirect.com/referencework/9780128149256/comprehensive-energy-systems>
- Figueroa-Torres, L. A., Lizardi-Jiménez, M. A., López-Ramírez, N., Varela-Santos, E. C., Hernández-Rosas, F., Favela-Torres, E., and Hernández-Martínez, R., 2020. Saccharification of water hyacinth biomass by a combination of steam explosion with enzymatic technologies for bioethanol production. *3 Biotech*, 10(10), 432p. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02426-8>
- Florencio, C., Couri, S., and Farinas, C. S., 2012. Correlation between agar plate screening and solid-state fermentation for the prediction of cellulase production by *Trichoderma* strains. *Enzyme research*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/793708>
- Gordillo-Fuenzalida, F., Echeverría-Vega, A., Cuadros-Orellana, S., Faundez, C., Kähne, T., and Morales-Vera, R., 2019. Cellulases production by a *Trichoderma* sp. Using food manufacturing wastes. *Applied Sciences*,

- 9(20), 4419p.
<https://doi.org/10.3390/app9204419>
- Haldar, D., and Purkait, M. K., 2021. A review on the environment-friendly emerging techniques for pretreatment of lignocellulosic biomass: Mechanistic insight and advancements. *Chemosphere*, 264, 128523p.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128523>
- Herrera, O., 2003. Obtención y selección de cepas de *Aspergillus niger* sobreproductoras de Fitasa [Tesis para obtener el grado de Maestro en Biotecnología]. Universidad Autónoma Metropolitana. Disponible en línea: https://smbb.mx/congresos%20smbb/puertovallarta03/TRABAJOS/AREA_XII/CARTEL/CXII-21.pdf
- Hoang, A. T., Nižetić, S., Ong, H. C., Mofijur, M., Ahmed, S. F., Ashok, B., and Chau, M. Q., 2021. Insight into the recent advances of microwave pretreatment technologies for the conversion of lignocellulosic biomass into sustainable biofuel. *Chemosphere*, 281, 130878p.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130878>
- Huang, Y., Qin, X., Luo, X.-M., Nong, Q., Yang, Q., Zhang, Z., Gao, Y., Lv, F., Chen, Y., and Yu, Z., 2015. Efficient enzymatic hydrolysis and simultaneous saccharification and fermentation of sugarcane bagasse pulp for ethanol production by cellulase from *Penicillium oxalicum* EU2106 and thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* ZM1-5. *Biomass and Bioenergy*, 77, pp. 53-63.
<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.03.020>
- Ire, F. S., Okoli, A. O., and Ezebuio, V., 2018. Production and optimization of cellulase from *Penicillium* sp. Using corn-cob and pawpaw fibre as substrates. *Journal of Advances in Microbiology*, 8(2), pp. 1-10.
<https://doi.org/10.9734/JAMB/2018/39227>
- Isarankura-Na-Ayudhya, C., Tantimongcolwat, T., Kongpanpee, T., Prabkate, P., and Prachayasittikul, V., 2007. Appropriate Technology for the Bioconversion of Water Hyacinth (*Eichhornia crassipes*) to Liquid Ethanol: Future Prospects for Community Strengthening and Sustainable Development. *Excli J*, 61.
<https://doi.org/10.17877/DE290R-344>
- Jugwanth, Y., Sewsynker-Sukai, Y., and Gueguim Kana, E. B., 2020. Valorization of sugarcane bagasse for bioethanol production through simultaneous saccharification and fermentation: Optimization and kinetic studies. *Fuel*, 262, 116552p.
<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2019.116552>
- Kainthola, J., Shariq, M., Kalamdhad, A. S., and Goud, V. V., 2019. Enhanced methane potential of rice straw with microwave assisted pretreatment and its kinetic analysis. *Journal of environmental management*, 232, pp. 188-196.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.11.052>
- Kasana, R. C., Salwan, R., Dhar, H., Dutt, S., & Gulati, A., 2008. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine. *Current microbiology*, 57(5), pp. 503-507.
<https://doi.org/10.1007/s00284-008-9276-8>
- Kucharska, K., Słupek, E., Cieśliński, H., and Kamiński, M., 2020. Advantageous conditions of saccharification of lignocellulosic biomass for biofuels generation via fermentation processes. *Chemical Papers*, 74, pp. 1199-1209.
<https://doi.org/10.1007/s11696-019-00960-1>
- Kumar, A., Kumar, V., and Singh, B., 2021. Cellulosic and hemicellulosic fractions of sugarcane bagasse: Potential, challenges and future perspective. *International Journal of Biological Macromolecules*, 169, pp. 564-582.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.175>
- Kumar, V., and Shukla, P., 2018. Extracellular xylanase production from *T. lanuginosus* VAPS24 at pilot scale and thermostability enhancement by immobilization. *Process Biochemistry*, 71, pp. 53-60.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.05.019>
- Lacerda, L. T., Gusmão, L. F., and Rodrigues, A., 2018. Diversity of endophytic fungi in *Eucalyptus microcorys* assessed by complementary isolation methods. *Mycological Progress*, 17(6), pp. 719-727.
<https://doi.org/10.1007/s11557-018-1385-6>
- Lukajtis, R., Rybarczyk, P., Kucharska, K., Konopacka-Lyskawa, D., Słupek, E.,

- Wychodnik, K., and Kamiński, M., 2018. Optimization of saccharification conditions of lignocellulosic biomass under alkaline pretreatment and enzymatic hydrolysis. *Energies*, 11(4), 886p. <https://doi.org/10.3390/en11040886>
- Ma, H., Liu, W.-W., Chen, X., Wu, Y.-J., and Yu, Z.-L., 2009. Enhanced enzymatic saccharification of rice straw by microwave pretreatment. *Bioresource technology*, 100(3), pp. 1279–1284. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.08.045>
- Martínez-Salgado, S. J., Andrade-Hoyos, P., Romero-Arenas, O., Villa-Ruano, N., Landeta-Cortés, G., and Rivera-Tapia, J. A., 2021. Control in vitro de Fusarium sp. Asociado al cultivo de cebolla mediante Trichoderma harzianum. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 39(2), Art. 2. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2101-4>
- Matos, M., Valdivia, A., Rodríguez, Z., Bocourt, R., Brizuela, M. A., Portilla, Y., Rubio, Y., & Ramírez, H. L., 2018. Production of xylanases by Bacillus subtilis E44 under submerged fermentation conditions. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 52(3). Disponible en línea: <https://www.redalyc.org/journal/1930/193060480010/193060480010.pdf>
- Meléndez-Hernández, P. A., Hernández-Beltrán, J. U., Hernández-Guzmán, A., Morales-Rodríguez, R., Torres-Guzmán, J. C., and Hernández-Escoto, H., 2021. Comparative of alkaline hydrogen peroxide pretreatment using NaOH and Ca (OH) 2 and their effects on enzymatic hydrolysis and fermentation steps. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 11(5), pp. 1897–1907. <https://doi.org/10.1007/s13399-019-00574-3>
- Mendoza-Infante, N. G., Debernardi de la Vequia, H., Hidalgo-Contreras, J., Mugica-Alvarez, V., & Hernandez-Martinez, R., 2022. Fungal microbiota of sugarcane straw and their ability to produce hydrolytic enzymes. *Revista de la facultad de agronomía de la universidad del zulia*, 39(1). [https://doi.org/10.47280/RevFacAgron\(LUZ\).v39.n1.08](https://doi.org/10.47280/RevFacAgron(LUZ).v39.n1.08)
- Miller, G. L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31(3), pp. 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Moran-Aguilar, M. G., Costa-Trigo, I., Calderón-Santoyo, M., Domínguez, J. M., and Aguilar-Uscanga, M. G., 2021. Production of cellulases and xylanases in solid-state fermentation by different strains of Aspergillus niger using sugarcane bagasse and brewery spent grain. *Biochemical Engineering Journal*, 172, 108060p. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2021.108060>
- Naher, L., Fatin, S. N., Sheikh, M. A. H., Azeez, L. A., Siddiquee, S., Zain, N. M., and Karim, S. M. R., 2021. Cellulase Enzyme Production from Filamentous Fungi Trichoderma reesei and Aspergillus awamori in Submerged Fermentation with Rice Straw. *Journal of Fungi*, 7(10), 868p. <https://doi.org/10.3390/jof7100868>
- Niju, S., Nishanthini, T., and Balajii, M., 2020. Alkaline hydrogen peroxide-pretreated sugarcane tops for bioethanol production—A process optimization study. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 10(1), pp. 149–165. <https://doi.org/10.1007/s13399-019-00524-z>
- Niju, S., and Swathika, M., 2019. Delignification of sugarcane bagasse using pretreatment strategies for bioethanol production. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 20, 101263p. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101263>
- Nogueira, D. P., Vasconcelos, L. C., Castiglioni, G. L., Freitas, F. F., and Seolatto, A. A., 2021. Comparative study of the efficiency of pretreatment with alkaline hydrogen peroxide in pineapple bagasse in different granulometries submitted to acid and enzymatic saccharification. *Research, Society and Development*, 10(1). <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i1.9902>
- Prajapati, B. P., Jana, U. K., Suryawanshi, R. K., and Kango, N., 2020. Sugarcane bagasse saccharification using Aspergillus tubingensis enzymatic cocktail for 2G bioethanol production. *Renewable Energy*, 152, pp. 653–663. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.01.063>
- Rodríguez-Zúñiga, U. F., Neto, V. B., Couri, S., Crestana, S., and Farinas, C. S., 2014. Use of spectroscopic and imaging techniques to evaluate pretreated sugarcane bagasse as a substrate for cellulase production under solid-state fermentation. *Applied biochemistry and*

- biotechnology*, 172(5), pp. 2348-2362.
<https://doi.org/10.1007/s12010-013-0678-0>
- Rukmana, S., Ansori, A. N., Kusala, M. K., Utami, U., Wahyudi, D., and Mandasari, A. A., 2020. Molecular identification of trichoderma isolates from sugarcane bagasse based on internal transcribed spacer (ITS) rDNA. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 13(7), pp. 3300-3304.
<https://doi.org/10.5958/0974-360X.2020.00585.5>
- Sankaran, R., Cruz, R. A. P., Pakalapati, H., Show, P. L., Ling, T. C., Chen, W.-H., and Tao, Y., 2020. Recent advances in the pretreatment of microalgal and lignocellulosic biomass: A comprehensive review. *Bioresource technology*, 298, 122476p.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122476>
- Saroj, P., Manasa, P., and Narasimhulu, K., 2018. Characterization of thermophilic fungi producing extracellular lignocellulolytic enzymes for lignocellulosic hydrolysis under solid-state fermentation. *Bioresources and Bioprocessing*, 5(1), pp. 1-14.
<https://doi.org/10.1186/s40643-018-0216-6>
- Savín-Molina, J., Hernández-Montiel, L. G., Ceiro-Catasú, W., Ávila-Quezada, G. D., Palacios-Espinosa, A., Ruiz-Espinoza, F. H., and Romero-Bastidas, M., 2021. Caracterización morfológica y potencial de biocontrol de especies de Trichoderma aisladas de suelos del semiárido. *Revista mexicana de fitopatología*, 39(3), pp. 435-451.
<https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2106-7>
- Sheng, Y., Lam, S. S., Wu, Y., Ge, S., Wu, J., Cai, L., Huang, Z., Van Le, Q., Sonne, C., and Xia, C., 2021. Enzymatic conversion of pretreated lignocellulosic biomass: A review on influence of structural changes of lignin. *Bioresource technology*, 324, 124631p.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124631>
- Soria-Noroña, L. C., and López-Almeida, J. V., 2020. Determinación del Índice de Potencia lipolítico y proteolítico en bacterias psicrótolerantes de las aguas termales de los Ilinizas. *Dominio de las Ciencias*, 6(2), pp. 1091-1196.
<https://doi.org/10.23857/dc.v6i2.1269>
- Su, T., Zhao, D., Khodadadi, M., and Len, C., 2020. Lignocellulosic biomass for bioethanol: Recent advances, technology trends, and barriers to industrial development. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 24, pp. 56-60.
<https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2020.04.005>
- Vázquez-Montoya, E. L., Castro-Ochoa, L. D., Maldonado-Mendoza, I. E., Luna-Suárez, S., and Castro-Martínez, C., 2020. Moringa straw as cellulase production inducer and cellulolytic fungi source. *Revista argentina de microbiología*, 52(1), pp. 4-12.
<https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.02.005>
- Wu, X., Luo, N., Xie, S., Zhang, H., Zhang, Q., Wang, F., and Wang, Y., 2020. Photocatalytic transformations of lignocellulosic biomass into chemicals. *Chemical Society Reviews*, 49(17), pp. 6198-6223.
<https://doi.org/10.1039/D0CS00314J>
- Zhai, R., Hu, J., and Jin, M., 2022. Towards efficient enzymatic saccharification of pretreated lignocellulose: Enzyme inhibition by lignin-derived phenolics and recent trends in mitigation strategies. *Biotechnology Advances*, 61, 108044p.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.108044>
- Zin, N. A., and Badaluddin, N. A., 2020. Biological functions of Trichoderma spp. for agriculture applications. *Annals of Agricultural Sciences*, 65(2), pp. 168-178.
<https://doi.org/10.1016/j.aogas.2020.09.003>