Sociedad Mexicana de Ciencia y Tecnología Agropecuaria ISSN: 2448-6620

SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS TOLERANTES A LA RICINA PARA LA HIDRÓLISIS DE RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS DE HIGUERILLA

J. Gabriel Ramírez-Pimentel*, Carlos A. Flores-Gómez; Juan Carlos Raya-Pérez; Karla W. Luna Salas; Jean B. Ramírez-Guerrero; Brayant Adair Chablé-Salinas; Jorge Covarrubias-Prieto; César L. Aguirre Mancilla

Tecnológico Nacional de México/ Instituto Tecnológico de Roque. Km 8 Carretera Celaya-Juventino Rosas. Roque. Celaya, Guanajuato, México. C.P. 38110. Autor de correspondencia. Autor de correspondencia: *juan.rp1@roque.tecnm.mx

RESUMEN

Ricinus communis L. ha cobrado importancia como materia prima para la producción de biodiesel; sin embargo, el residuo del cultivo ha sido de difícil de integrar en procesos de aprovechamiento, debido a la presencia de toxinas y otros metabolitos que impiden incorporarse en forrajes, suplementos, e incluso, para tratamiento microbiológico. En otros cultivos, se ha implementado la bioconversión a etanol del residuo de cosecha, pero no presentan esta dificultad. El objetivo del presente trabajo de investigación fue obtener microorganismos aptos para el pretratamiento de residuos de higuerilla, tolerantes a la presencia de las toxinas y con capacidad de desdoblar los polímeros en azúcares fermentables, para la producción de etanol. Se implementaron tres sistemas de digestión sólida con residuos vegetales de higuerilla, se realizó siembra del lixiviado en dos medios formulados para la selección de microorganismos resistentes a los componentes del residuo vegetal. Se seleccionaron 17 cepas bacterianas y 10 fúngicas, a las que se evaluó la capacidad de hidrólisis de celulosa, finalizando con una cepa de bacteria y una de hongo, como candidatos para el pretratamiento propuesto.

Palabras clave: *Residuo lignocelulósico, Ricinus communis, Ricina, Actividad celulolítica.*

INTRODUCCIÓN

El cultivo de especies energéticas resistentes a condiciones limitantes, tales como sequía, salinidad, suelos erosionados, contaminados y otras condiciones, puede contribuir a la regeneración y aprovechamiento de tierras no aptas para la producción de alimentos. Entre estos destacan los cultivos que se utilizan para la producción de biocombustibles, como el biodiesel y el bioetanol. La higuerilla (*Ricinus communis* L.) es una planta oleaginosa que se ha cultivado para obtener el aceite de sus semillas; sin embargo, se ha observado que contiene potentes toxinas que han impedido su uso alimentario y forrajero; incluso se han reportado efectos sobre microorganismos para tratamiento biológico (Franke et al., 2019; Angulo Escalante, *et al.*, 2026).

En el grupo de investigación, se ha demostrado la posible degradación al incorporarse en sistemas de composteo, lo que indica que naturalmente se encuentran microorganismos tolerantes, que incluso pueden

consumir dicho residuo. Para residuos agrícolas ordinarios, numerosos reportes mencionan el efecto de la temperatura para la optimización de la descomposición de residuos lignocelulósicos en oligosacáridos y otros azucares más simples; aunado a esto, se reportó recientemente la incorporación de cierto tipo de sustancias que pueden acelerar los procesos enzimáticos e incrementan la liberación de azucares reductores hasta un 75%. El producto de este tipo de fermentación sólida puede lixiviarse y someterse a procesos de fermentación alcohólica con la consecuente obtención de bioetanol y un residuo estabilizado con usos diversos, como bioabono, biochar, reestructurantes de suelos y otros.

Los biocombustibles son fuentes de energía renovales, su huella de carbono es casi nula ya que no inyectan a la atmosfera más carbono que se encontraba aislado en depósitos subterráneos (Jalilian et al., 2020; Somerville, 2007). El presente trabajo de investigación surge como propuesta para el aprovechamiento de los residuos lignocelulósicos resultantes de la producción de biodiesel a partir de higuerilla (*Ricinus communis* L.) al usarse como materia prima en la producción de otro biocombustible de importancia, el bioetanol. La producción de bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos consta de 4 etapas; el pretratamiento, hidrólisis o sacarificación, fermentación y destilación (Padella *et al*., 2019).

Existen reportes de que la planta *R. communis* inhibe el desarrollo de microorganismos debido a que contiene una proteína tóxica denominada Ricina (Al-Mamun et al., 2016; de Oliveira et al., 2010), Sin embargo, es posible efectuar un pretratamiento biológico si los microorganismos empleados están adaptados a este sustrato, presentan actividad hidrolítica de celulosa y baja utilización de los azúcares liberados (Canam et al., 2013). La celulosa es el biopolímero más abundante de la naturaleza y es también el mayor constituyente de la pared celular vegetal llegando a componer entre el 40 y 50 % en peso de la pared celular, es una cadena larga no ramificada compuesta por D-glucosa con un peso molecular entre 50,000 y 1’000,000 de Daltons (Shuler & Kargi, 2002; Weerasinghe et al., 2021). La hemicelulosa no es un compuesto bien definido, sino una clase de polímeros formados de pentosas y hexosas presentes en la pared celular vegetal. Su principal función es fortalecer la pared celular al atar las microfibrillas de celulosa (Scheller & Ulvskov, 2010; Burlacu et al., 2016). La hemicelulosa conforma entre el 25 – 35 % en peso de la pared celular. El tipo más abundante de hemicelulosa es el xilano (Bertella & Luterbacher, 2020).

La lignina es la fuente natural más grande de moléculas aromáticas y constituye entre el 15% y 20% en peso de la pared celular vegetal. Debido a su variabilidad y complejidad aunado a la dificultad de aislarla de forma tal que mantenga su estructura original la elucidación completa de su estructura y propiedades sigue siendo un desafío (Bertella & Luterbacher, 2020). El bioetanol es el biocombustible líquido más producido en el mundo mediante el proceso de fermentación de biomasa (Weerasinghe et al., 2021) y cada vez cobra más relevancia

ya que se está presentando como un gran candidato para la sustitución de los combustibles fósiles en los medios de transporte (Padella et al., 2019). Una de las condiciones clave para obtener una alta eficiencia en la bioconversión de la biomasa lignocelulósica es que se lleve a cabo un buen pretratamiento, el cual tiene la finalidad de incrementar la eficacia de la hidrólisis enzimática posterior al reducir la cantidad de celulosa cristalina, e hidrolizar parcialmente la hemicelulosa (Mikulski et al., 2019).

El pretratamiento biológico consiste en someter al sustrato lignocelulósico a microorganismos o sus enzimas para facilitar su conversión en etanol. Es prometedor debido a que no presenta formación de inhibidores durante el proceso, es amigable con el medio ambiente y es económico (Zhang et al., 2021; Heer & Sauer, 2008; Legodi et al., 2019). Las Bacterias presentan ciertas ventajas que las hacen buenas candidatas para efectuar el pretratamiento de los residuos lignocelulósicos tales como el hecho de tener un rápido crecimiento, poder expresar complejos multienzimáticos y algunas de ellas pueden resistir ambientes extremos (Liang et al., 2014). Entre las bacterias con actividad celulolítica se han reportado especies de *Triconympha*, *Clostridium*, *Actinomycetes*, *Bacteroides succinogenes*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Ruminococus albus*, *Methanobrevibacter ruminantium*, *Acinetobacter anitratus*, *Branhamella sp*. (Gupta et al., 2012), *Pseudomonas poae* (Abada et al., 2019), *Bacillus, Cryseobacterium* (Zhang et al., 2021), *Arthrobacter sp*., *Paenibacillus terrae* (Liang et al., 2014), *Nocardiopsis sp*. (Weerasinghe et al., 2021). Por otro lado, la estructura de las celulasas de los hongos suelen ser más simples comparados con el sistema propio de las bacterias y por lo general presentan un mayor rendimiento (Kumari et al., 2021). Entre los hongos que poseen actividad celulítica se encuentran especies de *Chaetomium, Fusarium Myrothecium, Trichoderma, Penicillium, Aspergillus* (Gupta et al., 2012), *Rhodotorula glutinis* (Herculano et al., 2011), *Pleurotus sp*. y *Talaromyces* (Zhang et al., 2021).

Se sabe que ambos polímeros componentes de la pared celular, celulosas y hemicelulosas pueden convertirse en azúcares fermentables, mientras que la lignina debe eliminarse, puesto que es capaz de retener las enzimas por adsorsión, generar enlaces por puente de hidrógeno, uniones hidrofóbicas e interacciones electrostáticas, que reducen fuertemente la eficiencia de las enzimas (Yarbrough, Mittal, Mansfield, et al., 2015).

Históricamente, se han desarrollado distintos sistemas de composteo, digestión aeróbica, digestión anaeróbica, bokashi, biochar y otros más. Estos sistemas buscan estabilizar la materia orgánica para impedir la posterior proliferación de microorganismos y desarrollo de olores desagradables; sin embargo, si estos sistemas de descomposición son interrumpidos a diferentes tiempos, es posible obtener una gran cantidad de compuestos fermentables. Recientemente se han utilizado líquidos iónicos (ILs) para el pretratamiento de biomasa lignocelulósica debido a su excelente capacidad para destruir la estructura cristalina de la celulosa o para remover la lignina. Más recientemente se desarrollaron solventes eutécticos profundos (DESs), con capacidad

para remover selectivamente la lignina y preservar la hemicelulosa (Azzouz & Hayyan, 2023; Durand, Lecomte, & Villeneuve, 2013).

La incorporación de Poli-Etilen-Glicol (PEG) en presencia de Cloruro de Colina: 'Acido Oxálico ha mejorado notablemente el fraccionameinto de la hemicelulosa y estabilizado la materia orgánica. En este contexto, el objetivo del presente trabajo de investigación fue obtener microorganismos aptos para el pretratamiento de residuos de higuerilla, tolerantes a la presencia de las toxinas y con capacidad de desdoblar los polímeros en azúcares fermentables, para la producción de etanol.

MATERIALES Y MÉTODOS

El proyecto de investigación se desarrolló en el Laboratorio de Biología Molecular Agroalimentaria y en el campo experimental del TecNM-I. T. de Roque.

Establecimiento de la digestión en fase sólida: Se establecieron Pilas de residuo de planta de *R. communis* de 10 kg de peso fresco con inóculos preestablecidos generados con residuos vegetales agrícolas, incluída fronda de higuerilla, estiércol bovino, agregando los tratamientos con cloruro de colina y con inóculos enriquecidos provenientes de fermentación sólida de *R. communis*. Se realizaron muestreos semanales para determinar el grado de descomposición, presencia de microorganismos y liberación de azúcares reductores.

Aislamiento de Microorganismos. Las compostas que contenían residuos de *R.communis* fueron muestreadas suspendiendo el lixiviado en agua estéril y realozando diluciones de 10^{-1} a 10^{-6}, para inoculaer en medio de cultivo. Se realizó formularon dos medios *ad hoc* para diferenciar aquellos microorganismos tolerantes a los compuestos y toxinas presentes en los residuos de higuerilla, medio agar de papa-dextrosa (PDA) y medio de cultivo higuerilla-dextrosa (HDA).

La cuantificación de la concentración de azúcares reductores, para cada tratamiento, se realizó utilizando ácido 3,5-dinitrosalicilico (DNS), tanto en las diluciones para la curva de calibración como para las muestras problema, conforme a Jain et al., (2020). La medición de absorbancia se realizó mediante en espectrofotómetro (nanodrop^{MR} 2000c) a 540 nm. Bajo condiciones asépticas, se inocularon en cajas Petri con medio PDA y con medio HDA. En el centro de cada una de las cajas se colocó una gota de cada disolución y con ayuda perlas de vidrio estériles se esparció por toda la superficie del medio. Posteriormente incubó a temperatura ambiente (22-28C) en oscuridad. Una vez crecidos los microorganismos se procedió con su aislamiento, mediante la técnica de estría cruzada y en el caso de los hongos, por resiembra de puntas de hifa. Se contrastó el desarrollo

de ufc entre los dos tipos de medio para evaluar la proporción de microorganismos tolerantes en relación a los susceptibles.

Selección de microorganismos capaces de degradar celulosa. Para la detección y selección de los microorganismos capaces de hidrolizar la celulosa, los microorganismos previamente aislados son cultivados en medio CMC con rojo Congo de composición: Carboximetilcelulosa (CMC) 2 g/L, KH2PO4 0.5 g/L, MgSO4 0.25 g/L, agar 15g/L, gelatina B 2 g/L, rojo Congo 0.2 g/L y agua destilada 1L a un pH entre 6.8 y 7.2 (Gupta et al., 2012; McDonald et al., 2012).

Ensayo enzimatico actividad hidrolítica de los microorganismos seleccionados. Para determinar la actividad enzimática de los microorganismos seleccionados se cultivaron en medio CMC con rojo Congo y se calculó el índice celulolítico (C.I.) (Gupta et al., 2012; Ghose,1987). Para la determinación de la concentración de azúcares reductores se desarrolló un programa escrito en Julia Programming Language v.1.4.5, a fin de obtener un modelo matemático. Se construyó una curva de calibración empleando soluciones de dextrosa en concentración de 0, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 300, 400, 500 y 1000 µg/mL y se sometieron a análisis colorimétrico por triplicado con el reactivo DNS, al igual que las muestras problema: CN1, CN2, PH1 y PH2. Se realizó el ajuste los datos de calibración al modelo lineal obtenido, así como la ubicación de las muestras problema en el mismo, los datos graficados son el promedio de las 3 réplicas y las barras de error muestran la desviación estándar. Los parámetros del modelo se encontraron mediante regresión lineal obteniéndose una ecuación que proporciona la concentración de azúcares reducidos en función de la absorbancia medida:

$C(A)=745.235x+3.81918$ [=] µg/ml

El modelo presentó una bondad de ajuste $R^2 = 0.9845916742145162$.

Los experimentos se realizaron bajo un diseño completamente al azar con tres repeticiones, tanto para la cuantificación de microorganismos tolerantes a la ricina como para la actividad celulolítica de los aislados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se registraron los porcentajes de humedad correspondientes a cada una de las 4 muestras de pretratamiento biológico y se presentan en el Cuadro 1. Se observa que las muestras correspondientes a la composta de novo (CN1 y CN2) presentaron un mayor porcentaje de humedad comparadas con las muestras que pasaron por el pretratamiento biológico en las compostas preestablecida (PH1 y PH2).

Cuadro 1. Porcentaje de humedad de residuos lignocelulósicos post pretratamientos biológicos.

Muestra	Humedad %

CN1	77.017355
CN2	72.678583
PH1	70.6483841
PH2	60.2964197

Se logró observar que se obtuvo una mayor cantidad de azúcares reductores en el pretratamiento biológico brindado en la composta *de novo* establecimiento frente al de la composta preestablecida (Cuadro 2). Esto indica que el pretratamiento biólogico brindado en la composta *de novo* establecimiento es mejor ya que produce mayores cantidades de azucares reductores que posteriormente pueden ser aprovechados en la etapa fermentativa y obtener una mejor producción de biotanol.

Cuadro 2. Determinación de la concentración de azúcares reductores en las muestras de *R. communis* sometidas a la fermentación en estado sólido.

Muestra	Absorbancia* a 540 nm	Desviación estándar	Concentración de azúcares reductores [µg/mL]
CN2	0.973666667	0.013892444	729.4293145
CN1	0.567000000	0.006082763	426.3672244
PH1	0.278666667	0.000577350	211.4912343
PH2	0.018000000	0.010016653	17.23340277

*Absorbancia promedio con n = 3.

Aislamiento y selección de microorganismos capaces de degradar celulosa y tolerantes a las toxinas de *R.communis*. Los microorganismos presentes en las compostas fueron abundantes, aproximadamente 2.4 x 10^8 ufc por cada gramo de composta, cultivables en medio PDA; sin embargo, la población tolerante a las toxinas y compuestos presentes en el residuo de higuerilla representó el 9.08%±3.33, lo que confirma la actividad antimicrobiana presente en los residuos y la factibilidad de aislamiento de cepas resistentes (Figura 1).

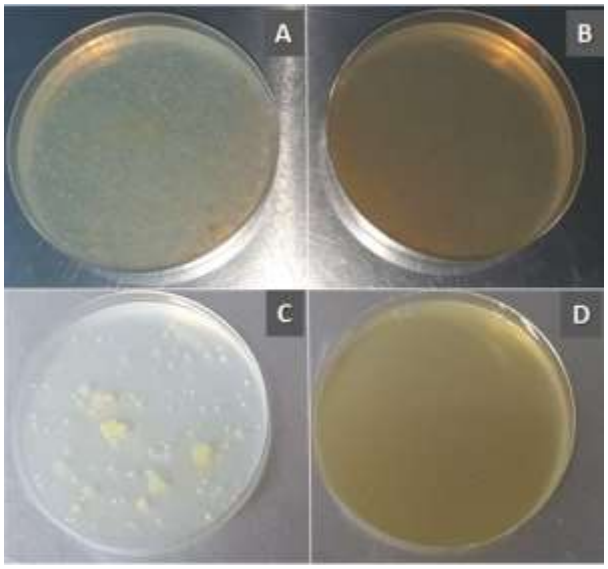

Figura 1. Selección de microorganismos resistentes a ricina y metabolitos de *R. communis*. A, Dilución 10 $^{-3}$ sobe medio PDA. B, dilución 10^{-3} sobre medio HDA. C, Dilución 10 $^{-6}$ sobe medio PDA. D, dilución 10^{-6} sobre medio HDA. Se observan colonias con diferente morfología, destacándose la abundancia en el medio PDA.

En un primer ensayo, se aislaron 17 cepas bacterianas, de las cuales sólo una presentó actividad celulolítica y fue denominada como B17; también se aislaron 10 hongos de los cuales solo 2 presentaron actividad hidrolítica para celulosa, fue seleccionado el que presentó el mayor índice celulolítico y fue denominado como H1. La bacteria B17 formó colonias brillantes circulares de bordes ligeramente irregulares, primero de color blancas amarillentas y posteriormente presentó pigmentación color magenta comenzando desde el centro hacia los bordes y bajo luz UV presentó una leve fluorescencia. En la Figura 10C puede observarse el halo de decoloración en el medio CMC- rojo Congo que es indicador de la actividad celulolítica.

La colonia del hongo H1 a nivel macroscópico es grande, redonda, de color blanco, aspecto filamentoso, en el centro presentó pigmentación amarillenta, el micelio es más denso en el centro, la colonia presenta un borde espiculado, de elevación convexa umbilicada. también se observa el halo de decoloración en el medio CMC-rojo Congo; indicador de la actividad celulolítica del hongo H1.

La Bacteria B17 fue sometida a tinción de gram y fue analizada mediante microscopía de Contraste Diferencial interferencial (DIC, Nomarski), revelánode como bacilo corto gram negativo (Figura 2 A).
El hongo H1 se trata de un hongo filamentoso septado, presenta macroconidias en forma de canoas con 5 septos. El hongo H1 presenta clamidosporas campaniformes de pedicelo corto, poco numerosas que surgen del borde lateral de las hifas y abundancia de mesoconidias, las mesoconidias son lisas de forma elíptica a forma de huso, de entre 2 a 5 septos, sin pico terminal, características compatibles con el género *Fusarium* (Figura 2B y C).

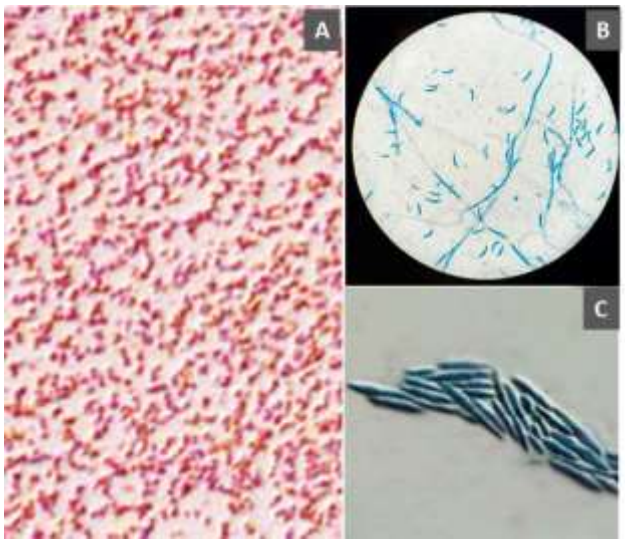

Figura 2. Microfotografías de los microorganismos aislados. A, Bacteria B17. Bacilo corto gram negativo. B, Micelio y macroconidias del hongo H1. C, Detalle de conidias del hongo H1, bajo óptica DIC.

De acuerdo con este modelo, el índice celulolítico relativamente estable y elevado se obtiene a partir de las 50 h lo que permitirá fijar el tiempo de residencia del sustrato en el proceso de pretratamiento cuando se emplee como inóculo la bacteria B17.

CONCLUSIONES

Fue posible aislar microorganismos capaces de crecer en los residuos lignocelulósicos de higuerilla con resistencia a sus toxinas y metabolitos

Los microorganismos aislados son capaces de desarrollarse en el sustrato lignocelulósico de higuerilla y presentan la capacidad de hidrolizarlo presentándose como buenos candidatos para efectuar el pretratamiento biológico de dicho sustrato. Pueden crecerse de manera rápida bajo condiciones de laboratorio, obteniendo altas concentraciones para utilizarse como inóculo.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Tecnológico Nacional de México por el apoyo recibido en el proyecto clave 22814.25-P

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Al-Mamun, M. A., Akter, Z., Uddin, M. J., Ferdaus, K. M. K. B., Hoque, K. M. F., Ferdousi, Z., & Reza, M. A. (2016). Characterization and evaluation of antibacterial and antiproliferative activities of crude protein extracts isolated from the seed of Ricinus communis in Bangladesh. BMC Complementary and Alternative Medicine, 16(1), 1–10. https://doi.org/10.1186/s12906-016-1185-y

Angulo-Escalante, Miguel Angel; Cruz-Lachica, Isabel; Salazar-Villa, Edith; Rojo-Báez, Indira; Soto-Landeros, Federico; Márquez Zequera Isidro; Báez-Parra Karla Marina (2026). Actividad antimicrobiana y cuantificación de ricinina en *Ricinus communis* frente a bacterias fitopatógenas. Revista Mexicana de Fitopatología. 44(1):1-9.

Bertella, S., & Luterbacher, J. S. (2020). Lignin Functionalization for the Production of Novel Materials. Trends in Chemistry, 1–14. https://doi.org/10.1016/j.trechm.2020.03.001

Burlacu, A., Petrw_a, C., & Israel-Roming, F. (2016). Microbial xylanase : A Review.

Canam, T., Town, J., Iroba, K., Tabil, L., & Dumonceaux, T. (2013). Pretreatment of Lignocellulosic Biomass Using Microorganisms: Approaches, Advantages, and Limitations. In S. S. Silva, A.K.C., Da (Ed.), Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass—Techniques, Applications and Commercialization (1st ed., pp. 181–206). IntechOpen. https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/55088

de Oliveira, A. S., Oliveira, M. R. C., Campos, J. M. S., Lana, R. P., Machado, O. L. T., Retamal, C. A., Detmann, E., & Filho, S. C. V. (2010). In vitro ruminal degradation of ricin and its effect on microbial growth. Animal Feed Science and Technology, 157(1–2), 41–54. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2010.01.006

Franke, H., Scholl, R., & Aigner, A. (2019). Ricin and Ricinus communis in pharmacology and toxicology-from ancient use and "Papyrus Ebers" to modern perspectives and "poisonous plant of the year 2018." Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 392(10), 1181–1208. https://doi.org/10.1007/s00210-019-01691-6

Ghose, T. K. (1987). Measurement of cellulase activities. Pure and Applied Chemistry, 59(2), 257–268. https://doi.org/doi:10.1351/pac198759020257

Gupta, P., Samant, K., & Sahu, A. (2012). Isolation of Cellulose-Degrading Bacteria and Determination of Their Cellulolytic Potential. 2012. https://doi.org/10.1155/2012/578925

Heer, D., & Sauer, U. (2008). Identification of furfural as a key toxin in lignocellulosic hydrolysates and evolution of a tolerant yeast strain. Microbial Biotechnology, 1(6), 497–506. https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2008.00050.x

Herculano, P. N., Lima, D. M. M., Fernandes, M. J., Neves, R. P., de Souza-Motta, C. M., & Porto, A. L. F. (2011). Isolation of Cellulolytic Fungi from Waste of Castor (Ricinus communis L.). Current Microbiology, 62, 1416–1422. https://doi.org/10.1007/s00284-011-9879-3

Jain, A., Jain, R., & Jain, S. (2020). Quantitative Analysis of Reducing Sugars by 3, 5-Dinitrosalicylic Acid (DNSA Method). In Basic Techniques in Biochemistry, Microbiology and Molecular Biology. (1st ed., pp. 181–183). Springer Protocols Handbooks. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9861-6_43

Jalilian, N., Najafpour, G. D., & Khajouei, M. (2020). Macro and Micro Algae in Pollution Control and Biofuel Production – A Review. ChemBioEng Reviews, 7(1), 18–33. https://doi.org/10.1002/cben.201900014

Kumari, A. V. A. G., Sunilson, J. A. J., Prema, M., & Vinayagamurthi, M. R. (2021). Isolation and Screening of Cellulolytic Fungi from Mangrove Ecosystem. 1–8. https://doi.org/https://doi.org/10.1063/5.0058314

Legodi, L. M., La Grange, D., van Rensburg, E. L. J., & Ncube, I. (2019). Isolation of Cellulose Degrading Fungi from Decaying Banana Pseudostem and Strelitzia alba. Enzyme Research, 2019, 1390890. https://doi.org/10.1155/2019/1390890

McDonald, J. E., Rooks, D. J., & McCarthy, A. J. (2012). Methods for the isolation of cellulose-degrading microorganisms. In Methods in Enzymology (1st ed., Vol. 510). Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415931-0.00019-7

Mikulski, D., Kłosowski, G., Menka, A., & Koim-Puchowska, B. (2019). Microwave-assisted pretreatment of maize distillery stillage with the use of dilute sulfuric acid in the production of cellulosic ethanol. Bioresource Technology, 278(November 2018), 318–328. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.068

Padella, M., O'Connell, A., & Prussi, M. (2019). What is still limiting the deployment of cellulosic ethanol? Analysis of the current status of the sector. Applied Sciences (Switzerland), 9(21). https://doi.org/10.3390/app9214523

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

Shuler, M. L., & Kargi, F. (2002). Bioprocess Engineering: Basic Concepts (2nd ed.). Prentice Hall.

Somerville, C. (2007). Biofuels. Current Biology, 17(4), 115–119. https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.01.010

Weerasinghe, W. M. L. I., Madusanka, D. A. T., & Manage, P. M. (2021). Isolation and identification of cellulase producing and sugar fermenting bacteria for second-generation bioethanol production. International Journal of Renewable Energy Development, 10(4), 699–711. https://doi.org/10.14710/ijred.2021.35527

Zhang, Z., Shah, A. M., Mohamed, H., Tsiklauri, N., & Song, Y. (2021). Isolation and Screening of Microorganisms for the Effective Pretreatment of Lignocellulosic Agricultural Wastes. BioMed Research International, 2021, 5514745. https://doi.org/10.1155/2021/5514745