

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL



DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Producción de enzimas ligninocelulosicas a partir del uso de residuos de
Agave Salmiana como soporte-sustrato

Por:

ISELA ALMARAZ PERALTA

TESIS

**Presentada como requisito parcial
para obtener el título de:**

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Buenavista, Saltillo, Coahuila, Noviembre del 2016.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISION DE CIENCIA ANIMAL

Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos

**Producción de enzimas ligninocelulosicas a partir del uso de residuos de
Agave Salmiana como soporte-sustrato**

Por:

Isela Almaraz Peralta

Tesis

Se somete bajo revisión del jurado examinador como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

APROBADA POR:



Dr. Armando Robledo Olivo

Asesor principal



Dr. Mario Alberto Cruz Hernández

Co-Asesor



Dra. D. Gabriela Martínez Vázquez

Co-Asesor



Dr. Jose Dueñez Alanis

Coordinador de la división de Ciencia Animal

Buenvista Saltillo, Coahuila, México; Noviembre 2016



AGRADECIMIENTOS

A Dios por hacer posible mi existencia, por darme la oportunidad de alcanzar un logro más en mi vida, haberme dado fortaleza y sabiduría para alcanzar mi meta, Gracias, porque todo lo que soy es por ti.

A mis padres (Angélica Peralta Ordaz y Juan Luis Almaraz Gudiño) con eterno cariño por su apoyo incondicional confianza y consejos pero sobre todo por el amor que me brindan día con día.

A mi pareja Jorge Alberto Ramos Cruz, por tu amor y apoyo incondicional mi vida a tu lado es plena y feliz.

A mi asesor el Dr. Armando Robledo Olivo por el apoyo atención y tiempo sobre todo la paciencia que me tuvo para sacar adelante este trabajo que me fortalece profesionalmente.

A mis compañeros y amigos de generación Teresa Rebollar, Isamar Morales, Elena Pérez, Alfredo Aguilar, Itzel Cervantes, Talia Alcocer y Evelin Del Toro por haber compartido momentos de estudio y diversión brindarme su amistad y el apoyo en todo momento.

DEDICATORIA

A lo más valioso que tengo en la vida: mi familia.

En primer lugar a mis padres que me han sacado adelante con gran esfuerzo y dedicación. Son ellos mi mejor ejemplo de persona, ellos quienes se han desvelado, han sufrido y han luchado por buscar mi bienestar , mis padres que siempre me han dado todo lo que han podido sin pedirme nada a cambio, esos seres por los que soy quien soy. Los amo.

A mi gran amor por estar en momentos difíciles y aun así creer en mí y colaborar para poder salir adelante. Gracias por tu amor incondicional.

A mis hermanos a quienes amo con todo mi corazón, además de ser mis hermanos han sabido ser amigos ya que han cuidado de mí toda la vida y me han brindado su apoyo en todo momento. A mis cuñadas por sus palabras de aliento y compañía, a mis sobrinas hermosos angelitos traviesos que con sus sonrisas me alegran aun en momentos difíciles. Las amo.

A mi familia en general que me brindan momentos buenos y malos gracias por sus palabras de aliento a lo largo de mi carrera y así poder lograr este triunfo.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
JUSTIFICACIÓN	4
HIPÓTESIS	5
OBJETIVOS	5
5.1 Objetivo general	5
5.2 Objetivos específicos.....	5
ANTECEDENTES	6
6.1 Desechos agroindustriales y caracterización físico-química.	6
6.2 Estructura de la biomasa lignocelulosica.....	6
6.2.1 Celulosa	7
6.2.2 Hemicelulosa	7
6.2.3 Lignina.....	8
6.3 Fermentación en estado sólido (FES)	8
6.4 Etapas de la FES.....	9
6.5 Factores que influyen en la FES	9
6.5.1 Humedad y Actividad de agua (Aw)	9
6.5.2 Transferencia de calor y temperatura.....	10
6.5.3 Tamaño y porosidad de partícula	10
6.5.4 pH.....	10
6.6 Microorganismos responsables de la degradación de materia vegetal	11
6.7 Mohos empleados en FES	11
6.8 Enzimas.....	12
6.8.1 Importancia de las enzimas	13

6.8.2 Enzimas responsables de la degradación del material vegetal	13
6.8.3 Sinergismo entre enzimas celuloticas	15
MATERIALES Y MÉTODOS	18
7.1 Obtención de microorganismo.....	18
7.2 Preparación del sustrato.....	18
7.3 Índice de absorción de agua	19
7.4 Actividad de agua (Aw).....	19
7.5 Punto crítico de humedad.....	19
7.6 Evaluación del potencial de uso de soporte para fermentación sólida	19
7.7 Extracto enzimático	20
7.8 Determinación de pH.....	20
7.9 Contenido de azúcares totales	21
7.10 Contenido de azúcares reductores.....	21
7.11 Determinación de actividad Xilanasa en extracto enzimático	22
7.12 Determinación de actividad Celulasa en extracto enzimático.....	23
7.12.1 Determinación de la actividad endo-glucanasa	23
7.12.2 Determinación de la actividad Exo-glucanasa.....	24
7.12.3 Determinación de la actividad β -glucosidasa.	25
7.13 Determinación de actividad Lacasa.....	25
RESULTADOS	27
8.1 Características físico químicas	27
8.3 Cinética de fermentación sobre residuo de <i>Agave Salmiana</i>	28
8.3.1 Azúcares totales.....	28
8.3.2 Azúcares reductores.....	29
8.3.3 Actividad Xilanasa	29

8.3.4 Actividad Celulasa exo, endo y beta glucosidasa.....	30
8.3.5 Actividad Lacasa	34
DISCUCIONES	35
9.1 Pruebas físico-Químicas	35
9.2 Azucares totales en extractos enzimáticos y soporte húmedo y seco.....	36
9.3 Azucares reductores en extractos enzimáticos	36
9.4 Actividad enzimática xilanasa.....	37
9.5 Actividad enzimática Celulasa endo, exo y beta glucosidasa.....	38
9.6 Actividad lacasa	39
CONCLUSION	40
BIBLIOGRAFIA	41

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 0. Esquema estructura de lignocelulosa.....	7
Figura 1. Azucares totales.....	28
Figura 2. Azucares reductores.....	29
Figura 3. Actividad xilanasa.....	30
Figura 4. Actividad endo glucanasa.....	31
Figura 5. Actividad exo glucanasa.....	32
Figura 6. Actividad beta glucanasa.....	33
Figura 7. Actividad lacasa.....	34
Tabla 1. Resultados Físico Químicos.....	27

RESUMEN

En este estudio fue estimado el efecto de actividad enzimática sobre el medio de crecimiento de la cepa M4 de una especie de hongo sobre residuo de *Agave Salmiana* material ligninocelulosico. Se realizaron pruebas físico-químicas tales como pH, IAA, PCH, Aw, azucares totales y reductores, para evaluar su potencial para el uso como soporte para la fermentación sólida y la producción enzimática. El material ligninocelulosico fue colocado en cajas Petri, humedecido a un 70% e inoculado de las esporas del microorganismo 1×10^{-7} por g de soporte incubado durante 7 días a 30 ± 1 °C. En este periodo se adquirieron tiempos de 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 y 168 h de donde se obtuvieron los extractos enzimáticos a partir de una extracción de proteínas de cada caja con crecimiento fúngico. Para medir la actividad enzimática se requieren pruebas químicas que ayudan a detectar la funcionalidad, se requiere de enzimas capaces de degradar la biomasa como la actividad lacasa, celulosa en sus actividades endo, exo y β -glucosidasa y actividad xilanasa Siguiendo los procedimientos y tratamientos adecuados para cada análisis se tuvieron resultados relevantes en producción de azucares totales y reductores valores más altos 52.58 y 15.65 mg/ml respectivamente en sustrato enzimático. Las actividades enzimáticas se reportaron en U/gss, con incrementos variados los valores superiores 1230.41 en xilanasa, 12.67, 29.11, 1.82 para exo, endo y β glucanasa, U/L 1.22 actividad lacasa. Los resultados indican que las condiciones de producción de enzimas ligninocelulosicas y la degradación de sustrato son óptimos para su productividad.

Palabras Clave: *Enzimas ligninocelulosicas, fermentación estado sólido, Agave Salmiana, Pared celular.*

INTRODUCCION

En las últimas décadas, varias enzimas industriales como lo son las celulasas, xilanasas, mananas, glucanasa, ligninasas, pectinasas y lacasas (enzimas ligninocelulosicas) están ganando enorme atención por sus potenciales aplicaciones biotecnológicas sobre material celulósico en productos de valor añadido. El material lignocelulósico (MLC) está conformado por tres estructuras principales: lignina, celulosa y hemicelulosa. Sin embargo, dependiendo del tipo de MLC se encuentran otras estructuras en menores o mayores proporciones, como son el xilano, la pectina, entre otros.

Algunos microorganismos son capaces de producir enzimas extracelulares que degradan MLC y hacen posible su reciclaje. El uso de hongos ligninocelulosicos en la degradación de diferentes residuos agroindustriales se ha vuelto cada vez más interesante.

La capacidad de degradación, está relacionada con las actividades hidrolíticas (principalmente celulasas y hemicelulasas) y ligninolíticas extracelulares, enzimas oxidativas (lacasas, peroxidasas de lignina y/o manganeso peroxidasa) [1].

Las enzimas siempre han jugado un papel importante en la producción de la variedad de productos comerciales de muchas industrias como el procesamiento de alimentos, producción de bebidas, alimentos para animales, cuero, textiles y detergente [2]. Estas enzimas no sólo hacen que el proceso ambientalmente sea benigno sino que también mejoran la productividad. Tal es el caso la maceración y la extracción de color de los jugos de deslavado enzimático, la fabricación de pasta, mejoramiento de las propiedades nutricionales de la alimentación animal, la producción de oligosacáridos, la clarificación de zumos, y el desarrollo de biosensores, etc. [3], [4] y finalmente el coste de la formación del producto.

La producción de enzimas es de alto precio; por lo que una alternativa para abatir costos es obtenerlas de sub-productos agroindustriales a partir de hongos filamentosos aislados de los mismos residuos, como bagazos de agave y caña,

rastrojos de maíz entre otros. La ventaja de utilizar hongos aislados de los subproductos agroindustriales es que ya estarían adaptados al sustrato para la producción de las enzimas antes mencionadas.

Para la utilización de los residuos de *Agave Salmiana*, provenientes de los desechos de la industria mezcalera o tequilera, es necesario saber su composición, con el fin de escoger y aplicar el tratamiento adecuado. También se requiere saber cómo actúan y/o funcionan las enzimas ligninocelulosicas que son el recurso más amigable con el medio ambiente para degradar este tipo de materiales.

Finalmente, se ha estimado que los mayores retornos en ahorro de costos de procesamiento degradativo de material lignocelulósico se verán mediante la mejora de la conversión de biomasa en azúcares (aumentar el rendimiento de hidrólisis, eliminación o reducción de pretratamiento, y la consolidación de un bioprocesamiento). Además, uno de los medios más eficaces para optimizar la bioconversión es el desarrollo de consorcios de enzimas para disminuir las grandes cantidades comerciales actualmente utilizadas. Es de destacar que la importancia de los hongos en el ciclo del carbono y la biotecnología como vehículo de sobreexpresión de enzimas de interés industrial ha promovido el interés en la comprensión de la producción de las enzimas extracelulares ligninocelulosicas [5].

JUSTIFICACIÓN

El agave es una planta xerófila utilizada para la elaboración de bebidas alcohólicas no convencionales como el pulque o el mezcal. Para producir 1 L de mezcal, se requieren 15 kg de *Agave salmiana*, generándose como productos de desecho 6 kg de bagazo [6]. Adicional a esto, se considera que el material de desecho que se deja en el campo durante la cosecha de la piña o cabeza de maguey, es de aproximadamente 10.5 kg por planta, y está compuesto principalmente por pencas, rizoma y espinas laterales [7].

El uso de los recursos naturales debe hacerse dentro de un apego a la persistencia del recurso y la minimización de impactos al medio, buscando garantizar la conservación del capital natural. El caso del uso del maguey verde (*Agave salmiana*), a pesar de tener un largo historial de al menos 300 años, tiene aún problemas que es necesario estudiar como el que los residuos no tienen completamente algún tratamiento después de la extracción de pulque, así que pudiera ser usado como sustrato de hongos filamentosos y la producción de enzimas.

El siguiente estudio propuso la degradación del residuo de *Agave Salmiana* como sustrato utilizando un hongo para la producción de enzimas ligninocelulosicas. Se analizó las condiciones del residuo de *Agave Salmiana* para uso como sustrato de la cepa M4 y la producción enzimas celulasas, xilanasas, lacasas, evaluando la cinética de producción. El presente trabajo, se realizó en el laboratorio de microbiología y fermentaciones del Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

HIPÓTESIS

El residuo de *Agave Salmiana* bajo condiciones de fermentación sólida, inducirá la producción de enzimas degradadoras de pared vegetal por un hongo filamentoso.

OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Estudiar el proceso de fermentación en estado sólido de residuos de *Agave Salmiana* para la producción de enzimas de interés industrial a partir de un hongo filamentoso.

5.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar físico-químicamente los residuos de agave *Salmiana* como soporte-sustrato
 - Realizar análisis de las propiedades físicas (pH, Índice de absorción de agua, Punto crítico de humedad, actividad de agua) y químicas (azúcares totales, azúcares reductores)
2. Verificar las condiciones de producción de enzimas ligninocelulosicas por fermentación en medio sólido utilizando el agave *Salmiana* como soporte-sustrato
 - Evaluar cinéticamente la producción de enzimas ligninocelulosicas, (celulasa, xilanasa y lacasa) y la degradación de sustrato.

ANTECEDENTES

6.1 Desechos agroindustriales y caracterización físico-química.

Los desechos agroindustriales poseen poca biodegradabilidad debido a su alto contenido de materiales lignocelulósicos (celulosa, hemicelulosa y lignina). Pero bajo las condiciones adecuadas pueden ser un excelente soporte y/o sustrato para la fermentación en estado sólido.

La paja y la cascarilla de arroz son los agro-residuos más abundantes en el mundo. En efecto, poseen la mayor relación producto (arroz blanco) versus residuos (paja y cascarilla): por cada kilo de producto se produce un kilo de residuos. Algunos usos posibles para los residuos incluyen la administración a animales como forraje y la producción de energía térmica; sin embargo, en general se los elimina incendiándolos in situ, una práctica claramente poco amigable con el medio ambiente [8]. El cultivo de sólo algunos hongos ha sido reportado en materiales lignocelulóticos como es el caso de *Volvariella volvacea* sin embargo, para el cultivo de otras especies de importancia económica no existe información disponible sobre su utilización como sustrato, como es el caso de *Agave Salmiana*.

6.2 Estructura de la biomasa lignocelulosica

La biomasa lignocelulosica es un material heterogéneo que se encuentra en pared secundaria de las células vegetales. Sus componentes principales son los carbohidratos celulosa y hemicelulosa, y la lignina que se encuentra en diferentes proporciones según el tipo de material que se trate (Figura 0). Una distribución media de estos componentes sería; 40-80%, hemicelulosa 10-40% y lignina 5-25% [9]. Otros componentes minoritarios de la biomasa son los extractivos, las proteínas y las cenizas [10].

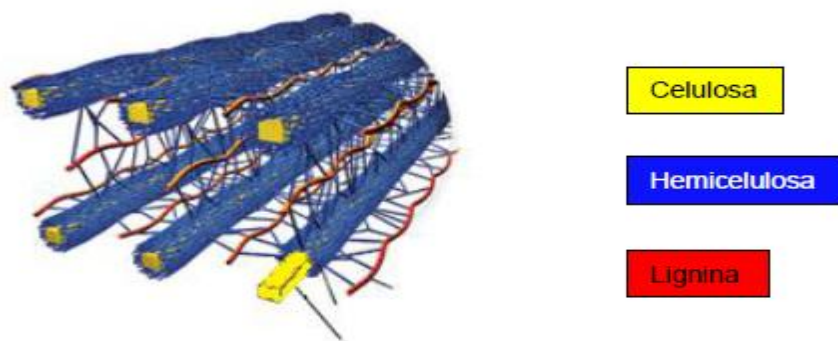


Figura 0.- Esquema de la estructura de la lignocelulosa

6.2.1 Celulosa

La celulosa es un polisacárido compuesto por moléculas de D-glucopiranosas unidas mediante enlaces $\beta(1-4)$ -glucosídicos. Su unidad de repetición es la celobiosa, un dímero de glucosa. Al sistetizarse las cadenas de glucosa, queda un extremo reductor capaz de abrirse y reaccionar, y un extremo no reductor. Las cadenas se unen entre sí lateralmente a través de enlaces de hidrógeno entre grupos hidroxilo de moléculas adyacentes, dando lugar a microfibrillas que se empaquetan en regiones cristalinas y amorfas. El grado de polimerización de la celulosa es alto; en las plantas se encuentran entre 7000 y 15000 unidades de glucosa, dependiendo de si se trata de la pared primaria o secundaria.

6.2.2 Hemicelulosa

Las hemicelulosas son heteropolisacáridos de estructura amorfa y cadenas más cortas y ramificadas que la celulosa (tienen un grado de polimerización entre 80 y 200), constituidos por diferentes unidades de monosacáridos (pentosas y hexosas) y ácidos urónicos unidos mediante enlaces glucosídicos. Además, las ramificaciones se encuentran habitualmente acetiladas o metiladas. Las hemicelulosas se pueden extraer fácilmente de la matriz lignocelulósica mediante procesos hidrotérmicos y/o con soluciones ácidas y alcalinas, y encontrarse así en forma soluble en la fase líquida tras el pretratamiento. Sus características estructurales permiten aportar flexibilidad a la matriz lignocelulósica.

6.2.3 Lignina

La lignina es un polímero complejo formado por una secuencia de unidades que no siguen una secuencia repetitiva, y cuya estructura y composición varían según su origen [11].

De un modo genérico se puede definir la lignina como un polímero fenólico heterogéneo unido covalentemente a los xilanos de la pared celular secundaria de las células vegetales, lo cual confiere un mayor empaquetamiento y rigidez a la estructura de la biomasa lignocelulósica. Está compuesta por tres unidades fenilpropanóicas (monolignoles): alcohol *p*-cumarílico, alcohol coniferílico y alcohol sinapílico. Estos alcoholes son los precursores de las unidades *p*-hidroxifenilo, guayacilo y siringilo, que se unen entre sí mediante enlaces éter o carbono-carbono. El grado de entrecruzamiento que puede alcanzar la lignina está relacionado con el grado de sustitución de los grupos alcohólicos. Éste determina la rigidez de la estructura y, por lo tanto, la facilidad o dificultad con la que la biomasa puede ser transformada bioquímicamente [12].

6.3 Fermentación en estado sólido (FES)

La fermentación en estado sólido simula mejor las condiciones ambientales y nutricionales que los hongos pueden tener en un terreno donde se depositen los desechos agroindustriales. Por lo general, la fermentación se realiza utilizando como soporte los residuos agrícolas, y se les agrega una solución de sales u otros compuestos como sustratos. De modo que los nutrientes están disueltos en la solución acuosa absorbida sobre el soporte sólido.

En el proceso de cultivo sólido, las diferentes variables del proceso, como temperatura, pH, humedad, actividad de agua, naturaleza, disponibilidad y concentración del sustrato, aireación, tamaño de partícula, tiempo de incubación, entre otros, etc. [13] pueden ser optimizados con apoyo de métodos estadísticos a fin de identificar los factores críticos y sus interacciones sobre la variable de interés. La temperatura y el pH son dos parámetros ambientales que afectan en gran medida los procesos de fermentación y/o la síntesis enzimática [14].

6.4 Etapas de la FES

De acuerdo con la [15], el proceso de FES se puede definir como un sistema de cuatro fases.

- La continua es aire u otra mezcla de gases que generalmente fluye a través del soporte sólido.
- El del soporte insoluble cual está compuesto por un soporte insoluble en agua que contiene una solución acuosa de nutrientes.
- La solución está fuertemente absorbida dentro de la matriz del soporte insoluble.
- Los microorganismos que crecen dentro del soporte, en su superficie y/o en espacio libre en las partículas, el nivel más bajo es aproximadamente de 12%, debido a que debajo de este nivel toda actividad biológica cesa. El límite superior está en función de la absorción de agua y por lo tanto, del contenido de humedad, que varía dependiendo de la naturaleza del sustrato.

6.5 Factores que influyen en la FES

Es evidente que el crecimiento del hongo y su morfología, así como la producción de enzimas, varía de acuerdo a las condiciones del cultivo, tales como medio de fermentación, actividad de agua (A_w), temperatura, pH, oxígeno, tamaño y porosidad de la partícula y sustrato entre otras.

6.5.1 Humedad y Actividad de agua (A_w)

El agua es esencial para el metabolito fúngico debido a que cuando empieza a ser insuficiente y no permite una buena difusión del soluto y el gas, en el metabolito celular la difusión es lenta. Además, la cantidad de agua intracelular y extracelular en condiciones limitantes no permite que mantenga la funcionalidad de algunas enzimas. Por otro lado, al estar presente en cantidades limitantes, la transferencia de agua puede influir en una desnaturalización de la estructura mecánica de la

membrana plasmática y por tanto todas las propiedades de permeabilidad y transporte a través de la membrana y la célula se ven afectadas [16].

6.5.2 Transferencia de calor y temperatura

La temperatura es una variable importante en el sistema FES por la dificultad en la remoción de calor metabólico. Usualmente existe un periodo inicial de crecimiento microbiano en donde la temperatura es óptima, la densidad celular baja y por lo tanto el calor metabólico es bajo. Sin embargo, cuando la concentración de biomasa se incrementa, la velocidad de crecimiento se eleva y por lo tanto la producción de calor en el sistema de FES, la temperatura aumenta. Un enfriamiento pobre en las diversas regiones del sistema también incrementa la temperatura, provocando una disminución en el crecimiento, probablemente debido a los efectos negativos de la alta temperatura [17].

6.5.3 Tamaño y porosidad de partícula

El tamaño y forma de la partícula son extremadamente importantes, ya que afectan el área de superficie para un volumen determinado de las partículas esto se debe que los espacios interarticulares dependen del tamaño y forma. El tamaño de la partícula afecta la accesibilidad del sustrato, así que, un tamaño de partícula óptimo representa frecuentemente una buena asociación entre la accesibilidad de nutrientes y la disponibilidad de oxígeno. Las partículas pequeñas o las partículas con una superficie plana y larga, tienden a empaquetarse estrechamente, haciendo difícil la aeración del sustrato. La caracterización exacta de una partícula puede ser difícil especialmente si tiene forma irregular.

6.5.4 pH

Cada microorganismo posee un rango de pH para su crecimiento y actividad con un valor óptimo para hongos filamentosos dentro del rango 3.8 a 6.0 [18]. Controlar el pH para hongos en la FES es prácticamente imposible, debido a la

heterogeneidad del sistema y una falta de equipo adecuado para determinar el pH en materiales sólidos. Para solucionar este problema se puede hacer una formulación del sustrato en la que se considere la capacidad amortiguadora de los compuestos empleados [19].

6.6 Microorganismos responsables de la degradación de materia vegetal

Los hongos son reconocidos como agentes de descomposición de la materia orgánica en general y de la celulosa en particular, para lo cual producen una gran variedad de enzimas hidrolíticas esenciales para soportar su crecimiento, ya sea como saprofitos o como patógenos [20]. La actividad celulolítica está ampliamente distribuida en el reino Fungi; se ha reportado en hongos anaerobios de los géneros *Neocallimastix*, *Piromyces*, *Caecomyces*, *Orpinomyces* y *Anaeromyces*, y en hongos aerobios de los géneros *Bulgaria*, *Chaetomium*, *Helotium*, *Neurospora*, *Coriolus*, *Phanerochaete*, *Pleurotus*, *Trametes*, *Poria*, *Schizophyllum*, *Serpula*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Myrothecium*, *Paecilomyces*, *Penicillium* y *Trichoderma* [21]. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que los hongos pertenecientes al *Phylum Ascomycota* dominan, tanto en abundancia como en actividad, la comunidad microbiana responsable de la descomposición de residuos celulósicos [22].

La conversión de la biomasa celulósica en azúcares fermentables a través de la hidrólisis enzimática, ha sido un campo de investigación y desarrollo muy amplio.

6.7 Mohos empleados en FES

Existe un gran número de microorganismos que tienen la capacidad de crecer en sustratos sólidos, esto se debe a su capacitación de adhesión, así como su habilidad para crecer en rangos relativamente amplios de A_w y penetración del sustrato encontrando aplicación en la FES. Los hongos filamentosos son el grupo más importante de microorganismos usados en procesos de FES debido a su tolerancia relativamente alta a las A_w bajas, su alto potencial de excretar enzimas

hidrolíticas y su morfología. El modo básico de crecimiento en los hongos filamentosos es una combinación de una extensión apical de hifa punteada más la de generación de nuevas hifas a través del micelio [19]. El hongo filamentosos puede colonizar la superficie del sólido rápidamente para utilización eficiente del sustrato, ya que tiene la capacidad de degradar macromoléculas de sustrato especialmente carbohidratos.

La degradación de la celulosa se lleva a cabo por un grupo hidrolítico de enzimas. Las endo-glucanasas hidrolizan los enlaces (1/4) β -glucosídicos aleatoriamente en la cadena de celulosa. Las cadenas más cortas producidas sirven como sustratos para celobiohidrolasas que hidrolizan la unión (1/4) β -glucosídicos en los extremos no reductores de las cadenas de celulosa y la eliminación de unidades de celobiosa. β -glucosidasas son responsables para la liberación de moléculas de β -D-glucosa formar residuos reductores β -D-glucosilo [23]. El componente de hemicelulosa en algún tipo de planta es la pared celular rica en glucuronoxilano [24]. Endo-1,4- β -xilanasas hidrolizan los enlaces (1/4) β -D-xylosidico en las cadenas de xilanos, mientras que las 1,4 β -xilidasas eliminan los residuos de D-xilosa a partir de los extremos no reductores de oligosacáridos generados [25].

6.8 Enzimas

El sistema de FES es usado comúnmente para la producción de enzimas, ya que se ha vuelto muy importante en la actividad industrial. Las enzimas vuelven los procesos eficientes y menos costosos ya que tienen un alto grado de especificidad y adaptabilidad, aunado a las suaves condiciones de trabajo. Además, puede lograrse más material procesado con el mismo equipo y menos consumo de energía. Las ventajas de utilizar enzimas en la industria nos ofrecen la posibilidad de sustitución de ingredientes y coadyuvantes en procesos, ahorro con procesos más eficientes obteniendo menos subproductos indeseables y mayor capacidad de planta con un incremento de rendimiento de producto; mejora en las propiedades deseables obteniendo un producto único.

6.8.1 Importancia de las enzimas

Las enzimas son proteínas especializadas capaces de acelerar la velocidad de una reacción química, promoviendo así la transformación de diferentes moléculas en productos específicos. La alta especificidad con la que se llevan a cabo dichas transformaciones, el volumen reducido de desechos que generan dichos procesos y las condiciones poco agresivas en las que se operan, han permitido que estos biocatalizadores se posicionen como elementos preponderantes en diversos sectores industriales. En efecto, se considera que en aquellos sectores industriales en donde está involucrada al menos una reacción química, existe la posibilidad de integrar una enzima al proceso de transformación.

En la actualidad, el uso de enzimas a escala industrial es una realidad, y considerando la velocidad del avance científico y tecnológico en el área de la biotecnología, es de esperarse que el número de procesos biocatalíticos se incremente de manera acelerada en las próximas décadas. [26]

La degradación de los componentes de las paredes vegetales es un proceso complejo que involucra la acción sinérgica de un gran número de enzimas extracelulares. En los hongos filamentosos, estas proteínas son indispensables para la obtención de energía y nutrientes por estos microorganismos. Muchas de estas enzimas han recibido una atención especial debido a su uso potencial en diferentes procesos industriales. A continuación, se presenta información relativa a las principales enzimas ligninocelulosicas producidas por hongos.

6.8.2 Enzimas responsables de la degradación del material vegetal

6.8.2.1 Celulasas

La hidrólisis completa de la celulosa nativa requiere la acción conjunta de múltiples enzimas con distintas especificidades de sustrato. Las tres enzimas más importantes son: endocelulasas, exo-Celulasas y β -Glucosidasas. En el caso de hongos, éstos producen los tres tipos de enzimas [27].

6.8.2.2 Las endoglucanasas (EG)

Son las celulasas más ampliamente encontradas, hidrolizan la celulosa amorfa (celulosa pre tratada con ácido fosfórico concentrado) o derivados solubles tales como la carboximetilcelulosa (CMC) [28]. Las endocelulasas también reciben el nombre de endo- β 1,4-glucanasas, 1,4 β -D glucan 4-glucanohidrolasas y CM-celulasas. Actúan de forma no progresiva, rompiendo aleatoriamente los enlaces β (1-4) dentro de la cadena dando lugar a cadenas de glucosa más cortas y disminuyendo rápidamente el grado de polimerización. Se inhiben fuertemente por la presencia de celobiosa [29]. Las EG también juegan un papel importante en el incremento de rendimiento de jugo de frutas, filtración de cerveza, extracciones con aceite, en la mejora de la calidad nutricional de productos de panadería y alimento para ganado [30].

6.8.2.3 Las exoglucanasas (EXG)

Son componentes cruciales de la degradación de celulosa cristalina. Estas enzimas son inactivas en CMC, pero hidrolizan los enlaces β (1-4) de la cadena de celulosa a partir de los extremos liberando celobiosa o glucosa, produciendo una disminución gradual en el grado de polimerización [30]. La acción de estas enzimas en celulosa cristalina es significativamente amplificada (sinergismo) por la presencia de endoglucanasas. Las EXG son también conocidas como exocelulasas, 1,4- β -glucanasas, celobiohidrolasas y exocelobiohidrolasas. La actividad EXG no es fácilmente cuantificada, pero su presencia en una mezcla de enzimas celulolíticas es a menudo correlacionada con el poder de sacarificación de celulosa más o menos cristalina como el avicel (actividad de avicelasa) o de papel filtro (actividad con papel filtro) [29].

6.8.2.4 Las β -Glucosidasas (BG)

Son consideradas elementos que componen los sistemas celulolíticos, hidrolizan la celobiosa a glucosa y los oligosacáridos (celodextrinas), liberados por la acción de las EXG y los hidrolizan a D-glucosa [16]. Estas enzimas son detectadas empleando como sustrato al p-nitrofenol-glucósido y esta actividad es denominada aril- β -Glucosidasa. Las β -Glucosidasas son poco específicas y algunas pueden ser activas contra varios β -glucósidos [31].

En general, las celulasas son proteínas bimodulares con un dominio grande catalítico y uno pequeño de unión al sustrato ligado por una secuencia proteica altamente glicosilada rica en prolina y serina.

6.8.3 Sinergismo entre enzimas celuloticas

Entre estas tres actividades enzimáticas existen diferentes sinergias [32], como la sinergia exo-endo, que consiste en que la despolimerización causada por la acción primera de las endoglucanasas genera nuevos extremos sobre los que pueden actuar a continuación las exoglucanasas. O la sinergia exo-exo, por la que la acción combinada de las CBH-I y CBH-II desprenden capas de celulosa, creando nuevos puntos de unión para las enzimas. Una sinergia muy importante es la que se establece entre las CBHs y la BG; la actividad de las celobiohidrolasas es inhibida por la propia celobiosa que producen, por lo que el papel de la β -glucosidasa en la preparación enzimática es muy relevante, al reducir el nivel de celobiosa en el medio [33]. Además, existen sinergias con la adición de hemicelulasas y β -xilosidasas.

6.8.3.1 Xilanasas

La hemicelulosa se encuentra asociada a la celulosa y lignina y llega a representar hasta el 35% del peso seco de las plantas superiores. La diversidad de azúcares en las hemicelulosas depende de la planta de procedencia. Por lo regular, las hemicelulosas se clasifican de acuerdo al azúcar residual principal en el esqueleto del polímero. El xilano es la hemicelulosa más abundante, está presente en los cereales y maderas blandas y duras [34].

No obstante, su complejidad, la degradación enzimática del xilano está bien descrita y su biodegradación es efectuada por un conjunto complejo de enzimas llamadas genéricamente xilanasas, las cuales son producidas por hongos y bacterias.

Por otro lado, junto con otras enzimas hemicelulasas, las xilanasas permiten la obtención de oligosacáridos de xilano provenientes de desechos agrícolas (sacarificación de biomasa lignocelulósica) para su uso como aditivos alimenticios y edulcorantes. Además, empleadas junto con celulasas, son útiles para la modificación de masas en panadería y para el mejoramiento de las dietas de aves y rumiantes, puesto que la hidrólisis enzimática de los arabinoxilanos (en forrajes y cereales) aumenta la digestibilidad de las materias primas de la dieta [35].

Los hongos filamentosos son productores interesantes de estas enzimas desde un punto de vista industrial, debido al hecho de que pueden excretar xilanasas al medio. A escala industrial, las xilanasas se producen por el hongo *Aspergillus* y *Trichoderma spp.*, por FES [36].

6.8.3.2 Lacasa

La enzima lacasa tiene actividad de fenol oxidasa en presencia de cobre, que oxida anillos fenólicos de la molécula de lignina. El uso que mayor interés tiene en la actualidad es de biorremediador ya que permite la remoción de contaminantes o

sustancias indeseables en aguas y suelos. Las lacasas son glicoproteínas con peso molecular descrito en diferentes organismos, estas enzimas catalizan la oxidación de un amplio espectro de compuestos fenólicos y aminas aromáticas utilizando el oxígeno como aceptor de electrones reduciéndolo a agua. Las lacasas son ampliamente distribuidas en plantas, bacterias, hongos e insectos elevados.

MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Obtención de microorganismo

La propagación del microorganismo para la fermentación se obtuvo a partir de un vial con la cepa M4, sembrado en medio sólido Agar Papa Dextrosa (BD Bioxon) incubado a 35- 40 °C durante 4 días para su efectivo crecimiento. Las esporas se extrajeron con una solución estéril de Tween 80 (Sigma) al 0.1% v/v y se cuantificaron en cámara de Neubauer (Bright-Line-Hausser) y un microscopio (Wesco). De los 25 cuadros de la cámara se tomaron 18 los de la línea superior e inferior y en diagonal uniendo ambas líneas formando una “Z” contando las esporas presentes en estos; posteriormente se obtuvo el valor promedio para cada cuadro. El número de esporas por ml se calculó usando la ecuación (0)

$$\frac{\text{Conidias}}{\text{ml}} = \text{Promedio} * 25,000 * \text{factor de dilucion} * 200 \quad (0)$$

Se preservó el microorganismo en glicerol-leche descremada para su almacenaje en congelación. Esto evita su daño posible por la cristalización del agua protegiendo a las células sin alterar su estructura.

7.2 Preparación del sustrato

La obtención de residuo de *Agave salmiana* fue obtenido de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Se tomó una penca saludable al azar, la cual fue troceada en partículas no mayores a 0.1 mm * 0.1 mm de longitud.

Los trozos de *Agave Salmiana* fueron secados en una estufa (Riosa E-71) a 60°C por 3 días para su peso constante. El residuo se esterilizó a 121°C durante 20 min para ser usado posteriormente en la fermentación.

7.3 Índice de absorción de agua

Este índice fue determinado a partir de la diferencia en peso (Anderson y col. 1976) donde se sometió 1.25 g de residuo y 15 ml de H₂O destilada en un tubo cónico de 50 mL. Se agitó en vórtex (Benchmark) por 3 min y se centrifugo (Centrifugant CRM Globe) 10 min a 3000 rpm. Se decantó el sobrenadante y el gel acumulado fue el reportado como g gel/g soporte seco.

7.4 Actividad de agua (Aw)

La actividad de agua se determinó en el equipo Aqualab, donde se introdujo 3 g de soporte tratado anteriormente y secado en estufa se adiciono con sales de medio Czapek-dox en una celdilla. La lectura tomada fue la primera que el equipo reporto.

7.5 Punto crítico de humedad

El punto crítico de humedad fue estimado a partir del uso de una termo balanza (Precisa). En la cual se colocó 1 g de residuo de *Agave Salmiana* saturado de humedad a una temperatura de 120 °C por 1 h, monitoreado cada 5 minutos el peso hasta situarse constante [37].

7.6 Evaluación del potencial de uso de soporte para fermentación solida

Teniendo el sustrato y el microorganismo se procedió a la fermentación en sólido para evaluar la velocidad de crecimiento en cajas Petri [38]. Se realizaron dos pruebas; la primera donde se colocó 1 ml de glucosa al 1% y 6 ml del soporte humedecido (70%) con el medio mínimo Czapek-Dox (g/L): NaNO₃ (7.63); KH₂PO₄ (3.04); MgSO₄ (1.52); KCl (1.52), empleando 5 g de soporte (residuo de

Agave Salmiana) como fuente de carbono. Inoculando en el centro de las cajas con esporas del microorganismo ($1 \cdot 10^7$ por g de soporte). La segunda prueba se omitió el uso de glucosa con el fin de calcular alguna diferencia en la velocidad de crecimiento. Las pruebas fueron incubadas (Tecno) a 32°C y evaluadas durante 6 días equivalentes a 168 h.

7.7 Extracto enzimático

Se basa en la extracción de proteínas empleando un surfactante en este caso tween-80 (sigma) 0.1% v/v para aumentar su permeabilidad de la [39] facilitando la extracción de varias moléculas a través de la membrana celular mientras el solvente iónico (NaCl) 0.9 % p/v es usado para la liberación de la enzima unida a la superficie miceliar. Se mezcló el fermentado sólido con 40 ml de la solución agitando a 133 rpm en shaker por 5 min. Posteriormente fue filtrado a través de gasa. El filtrado se centrifugó (Centrifugent CRM Globe) durante 10 min a 4500 rpm y se extrajo el sobrenadante en tubos cónicos de 50 ml para congelar a -20°C en congelador (White-westinghouse) hasta analizar.

7.8 Determinación de pH

La determinación de pH en la muestra fresca y en cada uno de los extractos enzimáticos se midió con un potenciómetro digital con electrodo en contacto (Hanna inst) previamente calibrado con disoluciones tampón pH 4,0 y 7,0 Introduciendo el electrodo hasta cubrir en el extracto enzimático. Se tomó como lectura la menos variable.

7.9 Contenido de azúcares totales

Debido a que los carbohidratos son particularmente sensibles a ácidos fuertes y altas temperaturas en esta técnica se sometieron para ser expuestos aplicando a la muestra fresca, seca y cada uno de los extractos enzimáticos por triplicado. El tratamiento para el residuo de *Agave Salmiana* por ser muestra en fresco y seco se trabajó en relación 1:4 (licuados y filtrados) extrayendo 1 ml de muestra a utilizar.

Se tomó una muestra de 1 mililitro en un tubo de ensaye añadiéndole 2 mililitros de fenol-sulfúrico por las paredes del tubo en baño de hielo para evitar quemar las muestras. Se sometieron en baño de ebullición por 5 minutos y posteriormente se atempero cada muestra durante 10 minutos. La absorbancia se leyó en un espectrofotómetro (Uv/VIS Velab modelo VE 5600 UV) a 480 nm. El resultado fue reportado como mg/ml realizando una curva de calibración en base a glucosa al 1% p/v.

7.10 Contenido de azúcares reductores

Los azúcares reductores contenidos en los extractos determinados por el método colorimétrico de DNS [40], se basa en la reducción del ácido 3,5-dinitrosalicílico de color amarillo por la glucosa u otro azúcar reductor, al ácido 3-amino-5-nitrosalicílico de rojo ladrillo [41] cuya presencia puede detectarse por lectura de la absorbancia en la zona de 540-570 nm.

Esto se llevó a cabo colocando en tubos de ensaye 1 ml de extracto, 0.250 ml de solución Buffer acetatos 0.1 M (pH 5.5) y 1.250 ml de DNS. Los tubos se sometieron a baño maría a ebullición por 5 min deteniendo la reacción mediante baño de hielo por 5 min. Se atemperaron las muestras de 5-10 min y se leyó la absorbancia en espectrofotómetro (Uv/VIS Velab modelo VE 5600 UV)) a 540 nm. El resultado fue reportado como mg/ml utilizando una curva patrón a base de fructosa.

La técnica se aplicó para la determinación de la actividad de las enzimas Xilanasa y Celulasa (endo-glucanasa, exo-glucanasa y β -glucosidasa).

7.11 Determinación de actividad Xilanasa en extracto enzimático

La actividad xilanasa es la responsable de la degradación de los xilanos contenidos en la molécula de hemicelulosa [42].

A los extractos por triplicado se les colocó en tubos de ensaye con 700 μ L de Xilano de abedul al 1% como sustrato y 300 μ L de extracto enzimático, teniéndolos como referencia para la mezcla reacción (MR). Para el blanco de enzima (BE) se sustituyó el sustrato por una solución de buffer de acetatos 0.05 M a pH 5.6 y usando como blanco de sustrato (BS) 700 μ L de Xilano de abedul al 1% con 300 μ L de solución buffer. Cada tubo se colocó en baño maría a 50°C durante 5 minutos deteniendo la reacción mediante baño de hielo por 5 minutos. A cada tubo se le midieron azúcares reductores y se leyó la absorbancia en espectrofotómetro (Uv/VIS Velab modelo VE 5600 UV) a 540 nm usando como referencia una curva de calibración de xilosa al 0.1% p/v. Una unidad de actividad xilanasa se define como la cantidad de enzima que libera un μ mol de xilosa a partir del sustrato *Agave Salmiana* por min a 50 °C.

Los resultados fueron calculados y reportados a partir de la fórmula (1)

$$U/ml = \left(\frac{mg}{ml}\right) * \left(\frac{1mol}{PM}\right) * \left(\frac{1000000 \mu mol}{1 mol}\right) * \left(\frac{1ml}{ml EE}\right) * \left(\frac{1}{min R}\right) \quad (1)$$

Dónde:

mg/ml= obtenida sustituyendo en la fórmula de la curva patrón la pendiente la variable x por la absorbancia total

PM= peso molecular de la xilosa en mg/mol

MI EE= mililitro de extracto enzimático utilizados en la reacción

Min R= minutos en los que ocurrió la reacción

El resultado obtenido en U/ml se multiplica por los ml de extracto totales por caja de cultivo y se reporta como Unidades por gramo de soporte seco utilizado (U/gss)

7.12 Determinación de actividad Celulasa en extracto enzimático

Para realizar la detección de la acción responsable de la de-polimerización de la celulosa es necesario determinar tres actividades enzimáticas las cuales son: actividad endo-glucanasa, exo-glucanasa y β -glucosidasa.

Una unidad de actividad endo-celulasa se define como la cantidad de enzima que libera un μ mol de glucosa a partir del sustrato carboximetilcelulosa, por min a 50°C.

7.12.1 Determinación de la actividad endo-glucanasa

La detección de esta actividad es la responsable de la hidrólisis de los enlaces β -1,4 localizados en las regiones internas de la molécula de celulosa, contribuyendo a la disminución del grado de polimerización.

La actividad se determinó colocando en tubos de ensaye 200 μ L de carboximetilcelulosa a 1000 ppm como sustrato, más 50 μ L de extracto enzimático teniéndolos como referencia para la mezcla reacción (MR). Para el blanco de enzima (BE) se sustituyó el sustrato por una solución de buffer de citratos 0.05 M a pH 4.8. Usando como blanco de sustrato (BS) 200 μ L de carboximetil celulosa a 1000 ppm y 50 μ L de solución buffer. Los tubos fueron colocados a baño maría a 50°C durante 10 minutos deteniendo la reacción por ebullición en baño María por 5 min. A cada tubo se le midieron azucares reductores usando como curva de calibración dextrosa al 1% p/v.

Los cálculos fueron realizados y reportados mediante la fórmula (1) expuesta anteriormente.

7.12.2 Determinación de la actividad Exo-glucanasa.

Es la actividad de las enzimas responsables de la hidrólisis de los enlaces β -1,4 localizados en las regiones externas de la molécula de celulosa, contribuyendo a la disminución del grado de polimerización.

A cada uno de los extractos por triplicado se les determino colocando en tubos de ensaye 1000 μ L de buffer de Citratos 0.1 M a pH 4.8 y una tira de papel filtro Whatman #1 de 1x6 cm (0.18016 g) como sustrato. A los tubos se les adicionó 50 μ L de extracto enzimático usados como mezcla de reacción (MR). Para el blanco de enzima (BE) se omitió el uso de papel filtro y para el blanco de sustrato (BS) solo fue necesario 1000 μ L de buffer de Citratos 0.1 M a pH 4.8 y una tira de papel filtro Whatman #1 de 1x6 cm. Cada tubo se colocó en baño maría a 50°C por 1 hora y se detuvo la reacción mediante ebullición en baño maría durante 5 minutos. A cada tubo se le midió azúcares reductores. Usando como referencia dextrosa (1%) para la curva patrón.

Los resultados fueron calculados y reportados mediante la fórmula (2)

$$FPU = (abs\ total) * ((3.016 / (MI\ EE * PF * \min\ R)))$$

Dónde:

FPU las unidades de papel filtro

Abs= obtenidas sustituyendo en la fórmula de la curva patrón la pendiente la variable x por la absorbancia total

3.016= constante

MI EE= mililitro de extracto enzimático utilizados en la reacción

PF= peso en g de la tira de papel filtro

Min R= minutos en los que ocurrió la reacción

El resultado obtenido en FPU se multiplica por los ml de extracto totales por caja de cultivo y se reporta como Unidades por gramo de soporte seco utilizado (U/gss)

7.12.3 Determinación de la actividad β -glucosidasa.

En este caso se detecta la actividad de las enzimas responsables de la hidrólisis de los enlaces β -1,4 localizados en la celobiosa liberada por efecto de la acción de la exoglucanasa. La hidrólisis de la celobiosa libera glucosa como producto para finalizar la hidrólisis de la celulosa.

En tubos de ensaye se colocó los extractos por triplicado 800 μ L de buffer de acetatos 0.2 M a pH 4.6 y se agregó 100 μ L de p-NPG (4-nitrofenil- β -D-ácido glucurónico) 9.0 mM como sustrato. A la mezcla se adicionan 100 μ L de extracto enzimático teniendo con eso referencia de la Mezcla Reacción (MR). Para el blanco enzima (BE) se agregó 900 μ L de buffer de acetatos 0.2 M a pH 4.6, completando con 100 μ L de extracto enzimático. El blanco de sustrato (BS) fue preparado con 800 μ L de solución buffer acetatos y 200 μ L de p-NPG como fuente de sustrato.

Cada tubo se colocó a baño maría a 50°C durante 10 minutos deteniendo la reacción agregando a cada tubo 100 μ L Na_2CO_3 0.1 M. Se les midió azúcares reductores a las muestras usando dextrosa 1% p/v para la curva de calibración. El reporte de los resultados se calculó mediante la fórmula (1).

7.13 Determinación de actividad Lacasa

Esta actividad es la responsable de oxidar los compuestos fenólicos y los relacionados con la lignina [43].

Como control de reacción se prepararon las siguientes soluciones con los extractos enzimáticos obtenidos a diferentes tiempos: Mezcla de reacción (MR) 900 μ L de Guaiacol (10 mM) v/v este en buffer fosfato-citrato 100 mM a pH 5 [43] como fuente de sustrato y 100 μ L del extracto enzimático. Blanco de enzima (BE) se substituyó el sustrato por una solución de buffer fosfato-citrato 0.1 M a pH 5. Para el blanco de sustrato (BS) se emplearon 900 μ L de sustrato más 100 μ L de

solución buffer. Cada tubo se colocó en baño maría a 30°C durante la reacción. A cada tubo se le midió la absorbancia al inicio y 4 min después de la reacción se leyó en espectrofotómetro (Uv/VIS Velab modelo VE 5600 UV) a 470 nm. Una unidad de enzima se define como 1 μmol de tetraguaiacol formado por minuto (U = μmol/min), bajo las condiciones del ensayo. Las unidades enzimáticas (U/L) de lacasa se calculan utilizando la formula (3).

$$ALac \left(\frac{\mu mol}{min * L} \right) = \frac{\Delta ABS * mol * cm * Vr}{\epsilon * Vm * 1} \quad (3)$$

Dónde:

ΔABS = lectura de la absorbancia final – inicial

Vr = volumen total de la reacción en ml

ϵ = Coeficiente de extinción que tiene un valor de 26600 mol⁻¹ cm⁻¹

Vm = volumen de la muestra en ml

1= minutos de reacción de la muestra

RESULTADOS

8.1 Características físico químicas

El resultado de las pruebas físico-químicas se plasma en la Tabla 1. Donde se trabajó con la muestra de *Agave Salmiana* en seco y en húmedo para las pruebas aplicadas. Se obtuvieron valores en seco de pH entre 5.4 ácido, los azúcares totales con 30.31 mg/ml y azúcares reductores en un contenido de 28.769 mg/ml. Para las muestras en húmedo, el valor de pH fue de 5.26 ácido, los azúcares totales de 183.54 mg/mL y los azúcares reductores de 1.776 mg/mL.

Tabla 1. Características físico-químicas de muestra de *Agave Salmiana*

VARIABLE	VALOR* seco	VALOR * Húmedo	UNIDADES
pH	5.4 (0.081)	5.26 (0.58)	H ⁺
IAA	6.25 (0.20)	—	g gel / g ss
PCH	—	7.4 (4.5094)	Kg H ₂ O/kg ss
Aw	—	0.650 (0.338) a 29.1°C	p/p ₀
Azúcares totales	30.31 (3.1780)	183.543 (20.716)	mg/ml total
Azúcares reductores	1.776 (0.48)	28.769 (0.532)	mg/ml total

*Los valores entre paréntesis corresponden a la desviación estándar.

Los hongos filamentosos indican un rango de pH 3.8 a 6.0 [18], una humedad del 60-70%, para su óptimo crecimiento las pruebas entran dentro de la escala.

La cantidad de azúcares disponibles en el sustrato puede servir como fuente de carbono inicial para el crecimiento de la cepa M4.

Crecimiento de la cepa M4 en el soporte como sustrato *Agave Salmiana*

La observación del crecimiento de la cepa M4 en el sustrato no fue cuantificable pero se notó un desarrollo en incremento en cuanto pasaban los días de evaluación comenzando con un brote minúsculo de filamentos de coloración

oscuro grisácea en el centro de la caja originalmente donde fue inoculado el soporte, para el día 3 ya se había invadido el 20% del contenido se determinó en general que el crecimiento invasivo del hongo fue respecto a los puntos cardinales notándose el incremento al pasar el tiempo evaluado llegando a cubrir por completo el soporte a las 120 h, el tiempo 96 h fue de menor producción de la cepa.

8.3 Cinética de fermentación sobre residuo de *Agave Salmiana*

8.3.1 Azúcares totales

Los resultados para esta prueba fueron determinados a partir de la absorbancia (abs) de la muestra calculada en mg/ml mencionado con anterioridad. En los extractos se presentaron valores entre 30.31 y 52.58 mg/ml comportándose con una tendencia poco variable.

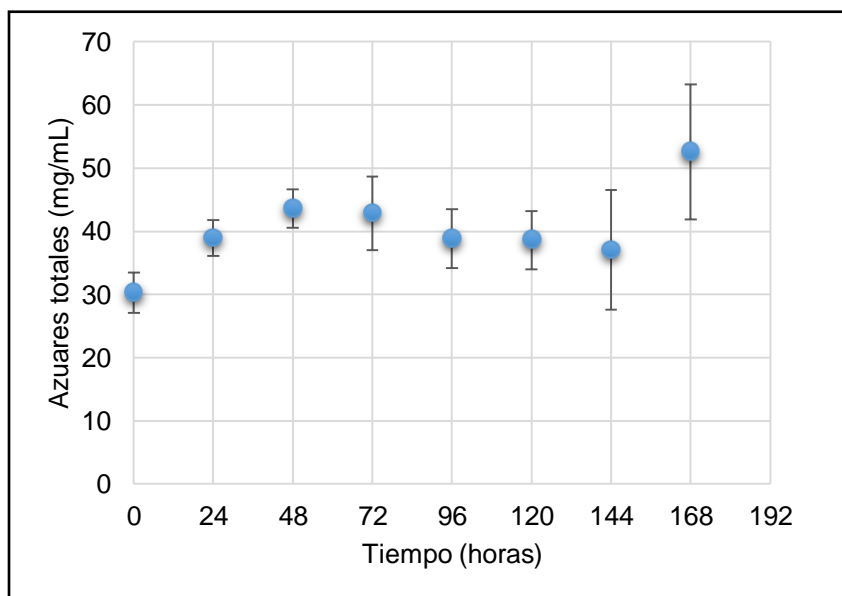


Figura 1.- Azúcares totales liberados en (mg/ml) en extractos enzimáticos durante el periodo evaluado. Las barras muestran la desviación estándar del promedio de tres replicas.

8.3.2 Azúcares reductores

En esta determinación se obtuvieron los resultados en mg/ml de los extractos enzimáticos obtenidos. El incremento no fue continuo, mostrando un punto máximo de 15.65 mg/ml a las 72 h, para posteriormente tener una disminución hasta casi alcanzar los valores iniciales.

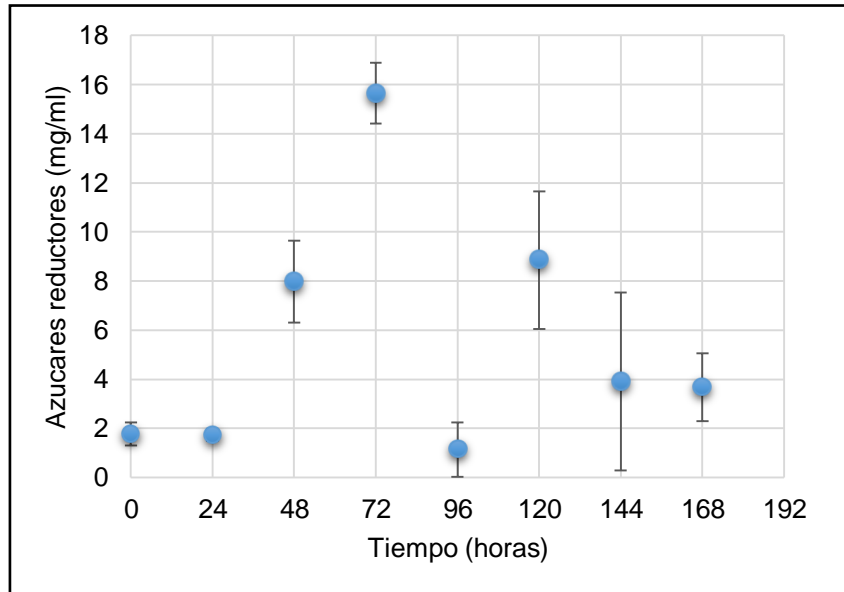


Figura 2.- Azúcares reductores liberados en (mg/ml) por los extractos enzimáticos durante el periodo evaluado. Las barras muestran la desviación estándar de las tres replicas.

8.3.3 Actividad Xilanasa

Con la determinación en mg/ml de xilanasa calculados con la pendiente de la curva patrón de xilosa se obtuvo el contenido en mg/ml, el resultado fue reportado en Unidades por gramo de soporte seco (U/gss) obtenidos de cada extracto por tiempos y se expresan en a figura 3. La actividad xilanasa presenta aumento desde las 48 h hasta las 120 h 1230.41 U/gss siendo este su valor máximo de actividad para posteriormente ir en descenso hasta el término de la fermentación.,

presentando un drástico descenso a las 96 h, posiblemente el valor obtenido a las 96 h se debe a las características de humedad presentes en el medio, ya que disminuyó considerablemente la humedad en el birreactor.

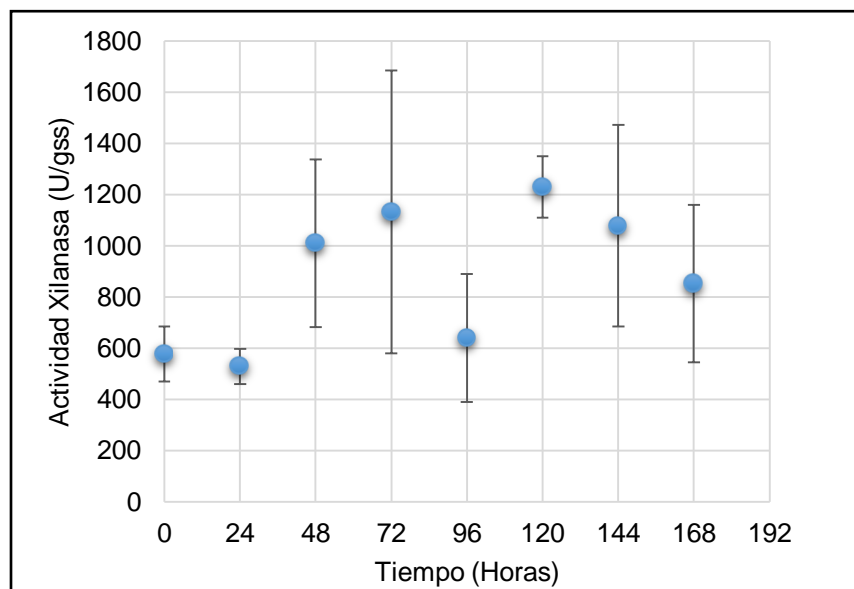


Figura 3.- Actividad Xilanasica de Cepa M4 en sustrato *Agave Salmiana*, en degradación de xilanos contenidos en molécula de hemicelulosa liberados en (U/gss) durante el periodo evaluado. Las barras muestran la desviación estándar del promedio de tres replicas.

8.3.4 Actividad Celulasa exo, endo y beta glucosidasa

Reportando la actividad celulasa endo, exo y beta glucosidasa (Figuras 4, 5 y 6, respectivamente) que fue determinada apartir de la obtencion de mg/ml calculados por la abs en la pendiente se muestra en las graficas como U/gss con respecto al periodo evaluado correspondiente a cada extracto. En las actividades el comportamiento fue completamente diferente tratadose por su puesto de diferntes actividades por lo que mas adelante se trato de explicar cada actividad con sus vaiables.

La actividad endo-glucanasa presenta un comportamiento diverso con un aumento hasta las 48 h con 8.37 U/gss y decendiendo gradualmente para las 96 h la actividad ya era menos que la inicial pero logro un aumento significativo para las 120 h 12.67 U/gss siendo el mas elevado, siguiendo un decremento hasta la ultima lectura.

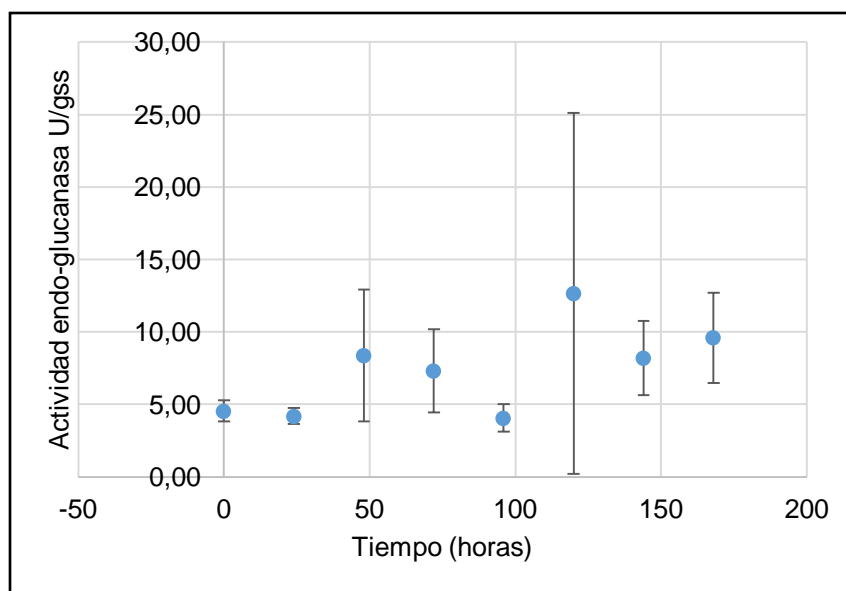


Figura 4.- Actividad Endo-glucanasa de cepa M4 en sustrato *Agave Salmiana*, hidrolizando los enlaces β -1,4 en las regiones internas de la molécula celulosa expresados en (U/gss) durante el periodo de evaluación. Las barras muestran la desviación estándar del promedio de tres replicas.

La actividad **exo-glucanasa** actúa de manera decreciente por debajo incluso de la lectura inicial 22.26 U/gss aunque en el tiempo 96 se tiene un máximo de 29.11 U/gss siendo esta una lectura poco confiable por la falla en cuanto a escape de humedad en trabajo de laboratorio y reflejada en otras actividades como una desviación.

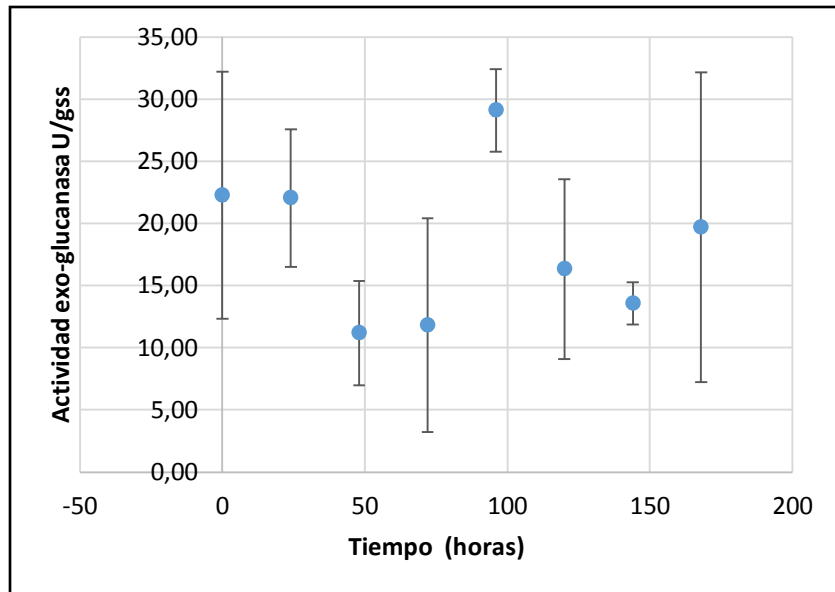


Figura 5.- Actividad Exo-glucanasa de cepa M4 en sustrato *Agave Salmiana*, hidrolizando los enlaces β -1,4 de las regiones externas de la molécula celulosa expresados en (U/gss) durante el periodo de evaluación. Las barras muestran la desviación estándar del promedio de tres replicas.

Actividad beta-glucosidasa la gráfica muestra una elevación en las primeras 24 h con 1.82 U/gss una degradación gradual hasta las 120 h un ligero aumento para terminar aminorada mente.

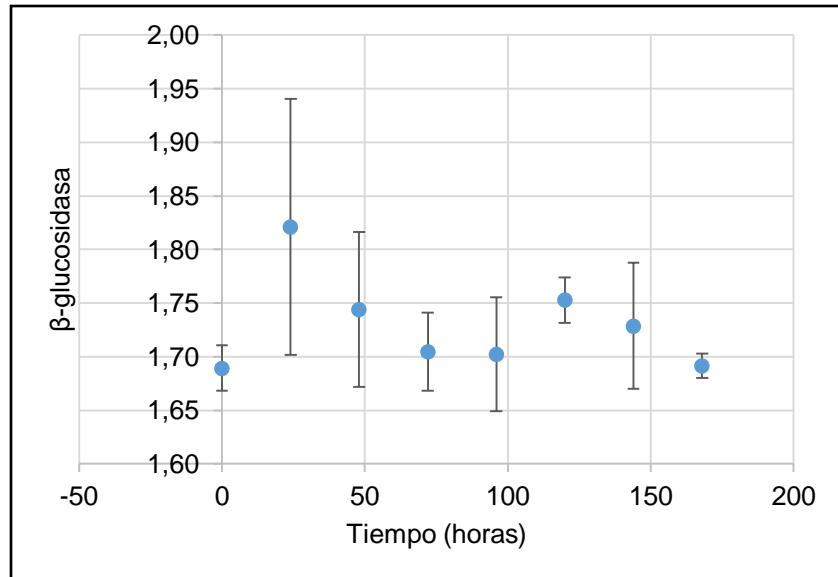


Figura 6.- Actividad β -glucosidasa de cepa M4 en sustrato *Agave Salmiana*, liberación de glucosa expresados en (U/gss) para finalizar hidrólisis de celulosa durante el periodo de evaluación. Las barras muestran la desviación estándar del promedio de tres replicas.

8.3.5 Actividad Lacasa

La determinación de la actividad lacasa, estas enzimas catalizadoras de la oxidación espectro de compuestos fenólicos y aminas aromáticas son determinadas mediante una oxidación para lo cual se tuvo una abs inicial y una final para ser expresada como ($U=\mu\text{mol}/\text{Hr}$) figura 3. La actividad lacasa presenta aumento gradual desde las 48 h hasta las 120 h 1.22 U/L teniéndolo como su valor máximo de actividad oxidativa para posteriormente ir en descenso hasta el término de la fermentación.

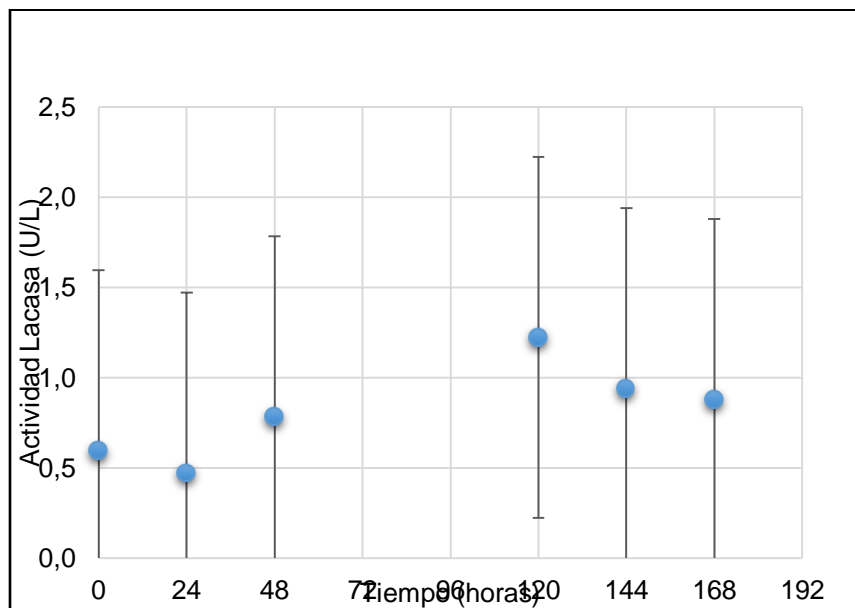


Figura 7.- Actividad Lacasa de cepa M4 en sustrato *Agave Salmiana*. Expresada como oxidación de compuestos fenólicos ($U=\mu\text{mol}/\text{Hr}$) durante el periodo de evaluación. Las barras muestran la desviación estándar del promedio de tres replicas.

DISCUCIONES

9.1 Pruebas físico-Químicas

En la tabla 1 se describen los resultados obtenidos de las pruebas físico-químicas del sustrato-soporte *Agave Salmiana* haciendo su comparación en estado seco y húmedo (estado natural).

Los resultados obtenidos de pH no fueron significativamente variables entre una prueba y otra, encontrándose en una escala de 5.26-5.4 por esto tratándose de una muestra semi acida donde los valores entran como óptimos para el crecimiento de hongos filamentosos ya que el rango es de 3.8 a 6.0 [18]. El pH con el que se cuenta en seco es adecuado para su uso como sustrato-soporte de la cepa M4 para la obtención de enzimas ligninocelulosicas.

La prueba de índice de absorción de agua IAA reportada como 6.25 g gel/ g soporte seco solo pudo ser medible en la muestra seca se cree tener una alta formación de gel esta es indicador de absorción de agua en el sustrato vinculada a la humedad para el desarrollo de la Cepa M4, si ocurriera una deficiencia de IAA para el sustrato en el metabolito celular la difusión se vuelve lenta.

La actividad de agua hace referencia a la cantidad de agua intracelular y extracelular, cuando hay condiciones limitantes no permite que se mantenga la funcionalidad de algunas enzimas este caso indica que al estar presente en cantidades limitantes la transferencia de agua puede influir en una desnaturalización de la estructura mecánica de la membrana plasmática y por tanto todas las propiedades de permeabilidad y transporte a través de la membrana y la célula se ven afectadas [19], el resultado obtenido fue .650 P/P0 una temperatura de 29.1°C

El punto crítico de humedad únicamente se puede medir en la muestra en su estado húmedo ya que es el agua natural en su forma ligada y disponible en el

sustrato sin ser tratado teniendo un resultado de 7.4 kg H₂O/kg ss este reporte refleja que el 70% es agua disponible para el microorganismo recomendable para un óptimo crecimiento.

9.2 Azúcares totales en extractos enzimáticos y soporte húmedo y seco

En la figura 1. Azúcares totales en extracto enzimático de Cepa m4 en sustrato *Agave Salamina* se observa una pendiente pronunciada entre los puntos 0 y 48h con 43.64 mg/ml indicando que la tasa de conversión de azúcares es muy rápida en esos puntos manteniéndose constante hasta las 72h, sin embargo, los azúcares continúan presentes hasta las 168 h. La caída del punto más bajo a las 96 h en producción de azúcares totales posiblemente se debe a que este tratamiento en específico hubo un escape de humedad e oxígeno en su experimentación no logrando las condiciones óptimas para la producción de azúcares deseados. Se analizó un ANOVA de prueba de medias siendo la variable de respuesta los mg/ml de azúcares totales y la variable independiente el tiempo, manteniéndose la concentración de azúcares constante. Se encontró que el mejor tiempo de generación de azúcares totales o disponibles fue a las 42, 72 y 168 hrs de ser expuestos. Los azúcares totales reportados en la prueba química en forma natural húmeda y con pretratamiento en seco arrojaron resultados desiguales puesto que húmedo en su forma natural el valor es superior hasta 6 veces más que en seco teniendo en cuenta que el residuo no puede ser usado así por el riesgo a carga microbiana disponible por ello es sometido a esterilización y un pretratamiento a seco para mejorar su empleo como soporte-sustrato.

9.3 Azúcares reductores en extractos enzimáticos

Como se observa en la figura 2 los puntos de la gráfica tienen un comportamiento desordenado del tiempo 0 h a 24 h no existe alguna producción de azúcares

pareciera hay una mínima disminución no destacable pero de las 24h a 72h la pendiente es pronunciada con un valor muy significativo, a las 96h el descenso en la producción de azúcares reductores es notablemente menor que el tiempo 0 la situación de malas prácticas de laboratorio mencionadas llevan consigo la pérdida en producción enzimática de interés, este momento es crítico por que el microorganismo dependiente del azúcar puede perder resistencia. La recuperación en producción de azúcares se pudiera deber al estrés al que está sometido el microorganismo pues en el punto respectivo a las 120 h se eleva, pero recibe nuevamente una disminución. Se analizó un ANOVA de prueba de medias siendo la variable de respuesta los mg/ml de azúcares reductores y la variable independiente el tiempo, manteniéndose la concentración de azúcares inestable. Se encontró que el mejor tiempo de generación de azúcares reductores fue a las 72 hrs de ser expuestos esto quiere decir que es el tiempo deseable para que se realice la donación de electrones por parte del agente reductor a otra molécula.

9.4 Actividad enzimática xilanasa

En la fig. 3 se grafica la curva de la actividad enzimática expresada en U/gss de xilanasa para una corrida de 7 tiempos a 24 horas de diferencia. Se puede notar una ligera disminución para las primeras 24h muy poco significativa ya que para el tiempo 72h es notable el aumento aun tomando el punto 96h con el problema que se ha tenido con anterioridad en los otros metabolitos mencionados. Se analizó un ANOVA de prueba de medias siendo la variable de respuesta las U/gss de xilanasa y la variable independiente el tiempo, manteniéndose la producción de manera creciente logrado que los tiempos 48, 72 y 120 h sean los destacados ya que hay una excelente biodegradación de hemicelulosa y permite la obtención de oligosacáridos de Xilano.

9.5 Actividad enzimática Celulasa endo, exo y beta glucosidasa.

Las figuras 4, 5 y 6 corresponden a la producción de enzimas Celulasas exo, endo y β glucosidasas respectivamente, que detectan la actividad responsable de la hidrólisis de los enlaces β -1,4 localizados en las regiones internas de la molécula de celulosa, contribuyendo a la disminución del grado de polimerización. La curva correspondiente a la actividad endo-glucanasa notablemente muestra desorden en los puntos de producción en su máximo y mínimo, nuevamente se debe tomar en cuenta la ligera baja en las 24h y el gran problema de escape de humedad que hubo en el tiempo 96h destacables en cada actividad por esto la baja actividad endo-glucanasa en el punto inicial pero para las 120h la recuperación es de mejora con la mayor actividad 12.67 U/g ss significando la mejor parte en donde actúa rompiendo los enlaces dentro de la cadena dando lugar a cadenas de glucosa más cortas y disminuyendo rápidamente el grado de polimerización [29]. En la actividad exo-glucanasa son enzimas cruciales de la degradación de celulosa cristalina. Estas enzimas son inactivas en CMC, pero hidrolizan los enlaces β (1-4) de la cadena de celulosa a partir de los extremos liberando glucosa (glucanohidrolasas) o celobiosa (celobiohidrolasas), produciendo una disminución gradual en el grado de polimerización [30], es representada por la gráfica 5 en U/g ss aquí aparentemente los resultados son negativos aunque no es así pero en cada uno de los tiempos se tiene una cantidad menos que la obtenida inicialmente solo a las 96h se continua con el problema ya mencionado en las otras etapas con la cantidad máxima pero poco confiable.

Para la actividad β –glucosidasa las 24h es muy pronunciada la pendiente con su valor máximo 1.82 U/g ss descendiendo de manera gradual hasta las 96h y un ligero aumento a las 120h y continuamente descendiendo para concluir con las 168h significando hay actividad responsable de hidrolizar la celobiosa a glucosa dando lugar a los mono y disacáridos indispensables para la alimentación del microorganismo.

9.6 Actividad lacasa

La figura 7 es el gráfico de la actividad enzimática lacasa de las 6 corridas en tiempos de 24h de diferencia siendo el primer tiempo 24h nuevamente por debajo de la primera lectura con una diferencia mínima este punto inicial debiera estar siempre debajo por un comienzo en la adaptabilidad de la cepa M4 en el sustrato. Se analizó un ANOVA de prueba de medias siendo la variable de respuesta las U/L de lacasa y la variable independiente el tiempo, manteniéndose la producción de manera creciente logrado que los tiempos 120 y 144 h sean los destacados ya que hay actuación de la enzima responsable de oxidar los compuestos fenólicos y los relacionados con la lignina [43]. Significando que hay degradación de material ligninocelulósico disminuyendo la dificultad de la hidrólisis enzimática de celulosa alterando su estructura cristalina y hemiselulosa teniendo como consecuencia la fermentación de azúcares.

CONCLUSION

La Actividad de enzimas responsables de la degradación ligninocelulosica fue analizada y verificada mediante la producción de corridas enzimáticas celulasa, lacasa y xilanasas, se concluye que la producción enzimática está influenciada por el tratamiento sufrido del inóculo, el residuo de *Agave salmiana* y las condiciones físico-químicas a las que fue sometido, humedad, temperatura, actividad de agua, pH, tamaño de partícula entre otros menos destacables, el tratamiento que más influenciado estuvo en producción baja ha sido a las 24h posiblemente por ser el primero está reflejada la adaptabilidad y 96h se notó claramente el escape de humedad por el perímetro de las cajas por un mal sellado. Destacando buenos alcances para los tiempos de 48, 72, 120 h en donde la cepa M4 se encuentra en un estado estacionario. Por lo tanto el residuo de *Agave Salmiana* bajo condiciones de fermentación sólida, y las condiciones trabajadas en el experimento inducen a la producción de enzimas degradadoras de pared vegetal por la cepa M4.

Es conveniente tener presente que antes de realizar cualquier aplicación industrial usando enzimas de tipo lignocelulósico debe tenerse en cuenta su funcionamiento bioquímico porque serán piezas claves y determinantes en todo el proceso que se desee ejecutar. Lo anterior con el propósito de tener un conocimiento más amplio de la interacción bioquímica del sustrato con la enzima, con un resultado final dirigido hacia la obtención de mayor productividad en el proceso industrial.

Las publicaciones actualmente disponibles en línea que hacen referencia al tema bioquímico de enzimas ligninocelulósicas en realidad son muy pocas, la información respecto al tema bioquímico es limitada y desconocida, algunos autores han hecho acercamientos al posible funcionamiento de estas enzimas pero no son reportes con suficiente información gráfica o esquemática que permita hacer un acercamiento más detallado de las reacciones químicas que allí ocurren; la información que se encuentra es bastante teórica, además, otras investigaciones aún están en desarrollo por lo tanto la información disponible es limitada y de difícil acceso.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Sánchez, C. (2009). Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology advances*, 27(2), 185-194.
- [2] Gavrilescu, M., & Chisti, Y. (2005). Biotechnology—a sustainable alternative for chemical industry. *Biotechnology advances*, 23(7), 471-499.
- [3] Xu, F. (2005). Applications of oxidoreductases: recent progress. *Industrial Biotechnology*, 1(1), 38-50.
- [4] Kuhad, R.C., Singh, A. (2007). Lignocellulose Biotechnology Future Prospects. I.K International, New Delhi, India.
- [5] Ortiz, M. L. (2009). Aproximaciones a la comprensión de la degradación de la lignina. *Orinoquia*, 13(2), 137-144.
- [6] López-Alvarez, A., Díaz-Pérez, A. L., Sosa-Aguirre, C., Macías-Rodríguez, L., & Campos-García, J. (2012). Ethanol yield and volatile compound content in fermentation of agave must by *Kluyveromyces marxianus* UMPE-1 comparing with *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeast used in tequila production. *Journal of bioscience and bioengineering*, 113(5), 614-618.
- [7] Guerrero, L. C. (2010). Uso de bagazo de la industria mezcalera como materia prima para generar energía. *Ingenierías*, 13(47), 8-16.
- [8] Lin, R., Cheng, J., Song, W., Ding, L., Xie, B., Zhou, J., & Cen, K. (2015). Characterisation of water hyacinth with microwave-heated alkali pretreatment for enhanced enzymatic digestibility and hydrogen/methane fermentation. *Bioresource technology*, 182, 1-7.
- [9] Bidlack, J. (1992, February). Molecular structure and component integration of secondary cell walls in plants. In *Proceedings of the Oklahoma Academy of Science* (Vol. 72, pp. 51-56).
- [10] Wyman, C. (1996). *Handbook on bioethanol: production and utilization*. CRC press.
- [11] Grabber, J. H., Schatz, P. F., Kim, H., Lu, F., & Ralph, J. (2010). Identifying new lignin bioengineering targets: 1. Monolignol-substitute impacts on lignin formation and cell wall fermentability. *BMC Plant Biology*, 10(1), 1.
- [12] Doherty, W. O., Mousavioun, P., & Fellows, C. M. (2011). Value-adding to cellulosic ethanol: Lignin polymers. *Industrial crops and products*, 33(2), 259-276.

- [13] Tomas-Pejo., Negro, M.J., 2011. Pretreatment technologies for lignocellulose to bioethanol conversion, in: Pandey, A., Larroche, Academic Press, Burlington, 149-176.
- [14] Bhunia, S. K., Saha, A., Maity, A. R., Ray, S. C., & Jana, N. R. (2013). Carbon nanoparticle-based fluorescent bioimaging probes. *Scientific reports*, 3.
- [15] D'auria, F., & Galassi, G. M. (1998). Code validation and uncertainties in system thermalhydraulics. *Progress in Nuclear Energy*, 33(1), 175-216.
- [16] Gervais, P., & Molin, P. (2003). The role of water in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2), 85-101.
- [17] Pandey, A. (2001). *Solid-state fermentation in biotechnology: fundamentals and applications*. Asiatech Publishers.
- [18] Krishna, S. H., Reddy, T. J., & Chowdary, G. V. (2001). Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic wastes to ethanol using a thermotolerant yeast. *Bioresource technology*, 77(2), 193-196.
- [19] GONZÁLEZ, E. Á., TOSTADO, E. C., BERNABE, I. L., González, C. R., & ALMENDAREZ, B. E. G. Producción de enzimas hemicelulolíticas por fermentación sólida y su aplicación en alimento balanceado para pollo de engorda. *Veterinaria México OA*, 37(001).
- [20] Gutiérrez-Rojas, I., Moreno-Sarmiento, N., & Montoya, D. (2015). Revista Iberoamericana de Micología. *Rev Iberoam Micol*, 32(1).
- [21] Lynd, L. R., Weimer, P. J., Van Zyl, W. H., & Pretorius, I. S. (2002). Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and molecular biology reviews*, 66(3), 506-577.
- [22] Wilson DB. Microbial diversity of cellulose hydrolysis (2011). *Curr Opin Microbiol.*(14), 259–63.
- [23] Baldrian, P., & Valášková, V. (2008). Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. *FEMS microbiology reviews*, 32(3), 501-521.
- [24] Faik, A. (2010). Xylan biosynthesis: news from the grass. *Plant physiology*, 153(2), 396-402.
- [25] Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., de la Rubia, T. D. L. R., & Martínez, J. (2002). Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Microbiology*, 5(2), 53-63.
- [26] Carrillo, F., Lis, M. J., Colom, X., López-Mesas, M., & Valldeperas, J. (2005). Effect of alkali pretreatment on cellulase hydrolysis of wheat straw: Kinetic study. *Process biochemistry*, 40(10), 3360-3364.

- [27] Carrillo, L. (2003). Actividad microbiana. Microbiología Agrícola. Capítulo 3.
- [28] Ljungdahl, L. G. (2008). The Cellulase/Hemicellulase System of the Anaerobic Fungus *Orpinomyces* PC-2 and Aspects of Its Applied Use. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1125(1), 308-321.
- [29] Massadeh, M. I., Yusoff, W. M. W., Omar, O., & Kader, J. (2001). Synergism of cellulase enzymes in mixed culture solid substrate fermentation. *Biotechnology Letters*, 23(21), 1771-1774.
- [30] Singh, J., Kaur, L., & McCarthy, O. J. (2007). Factors influencing the physico-chemical, morphological, thermal and rheological properties of some chemically modified starches for food applications—A review. *Food hydrocolloids*, 21(1), 1-22.
- [31] Woodward, J., & Wiseman, A. (1982). Fungal and other β -d-glucosidases—their properties and applications. *Enzyme and Microbial Technology*, 4(2), 73-79.
- [32] Duque García, A. (2015). Pretratamiento de extrusión reactiva para la producción de bioetanol a partir de paja de cebada.
- [33] Bezerra, R. M., & Dias, A. A. (2005). Enzymatic kinetic of cellulose hydrolysis. *Applied biochemistry and biotechnology*, 126(1), 49-59.
- [34] Aro, N., Saloheimo, A., Ilmén, M., & Penttilä, M. (2001). ACEII, a novel transcriptional activator involved in regulation of cellulase and xylanase genes of *Trichoderma reesei*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(26), 24309-24314.
- [35] Topakas, E., Stamatis, H., Biely, P., & Christakopoulos, P. (2004). Purification and characterization of a type B feruloyl esterase (StFAE-A) from the thermophilic fungus *Sporotrichum thermophile*. *Applied microbiology and biotechnology*, 63(6), 686-690.
- [36] Lemos, J. L. S., & Pereira Junior, N. (2002). Influence of some sugars on xylanase production by *Aspergillus awamori* in solid state fermentation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 45(4), 431-437.
- [37] Oriol, E., Raimbault, M., Roussos, S., & Viniegra-Gonzales, G. (1988). Water and water activity in the solid state fermentation of cassava starch by *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 27(5-6), 498-503.
- [38] Trujillo Trujillo, H. E. R. N. A. N., Robledo Olivo, A. D. A., Martínez Vázquez, D. G. D., Cruz Hernandez, M. A. D., & Ruiz Leza, H. A. D. (2016). Producción de xilanasa a partir de la cepa Rh. pusillus en fermentación en medio sólido aplicando un diseño experimental Taguchi L9.
- [39] Guerrero Mata, A. L. E. J. A. N. D. R. O., & Cruz Hernandez, M. A. Comparación cinética de la producción de xilanasa por *Rhizomucor pusillus* SOC-4A empleando biorreactores de placa y de columna.

[40] Park, C. S., & Miller, C. (1992). Interaction of charybdotoxin with permeant ions inside the pore of a K⁺ channel. *Neuron*, 9(2), 307-313.

[41] Chaplin, D. D., Galbraith, L. J., Seidman, J. G., White, P. C., & Parker, K. L. (1986). Nucleotide sequence analysis of murine 21-hydroxylase genes: mutations affecting gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(24), 9601-9605.

[42] Ghose, T. K., & Bisaria, V. S. (1987). Measurement of hemicellulase activities: part I Xylanases. *Pure and Applied Chemistry*, 59(12), 1739-1751.

[43] Álvarez-Gutiérrez, P. E., Corzo-González, Z., Yañez-Ocampo, G., & del Carmen Pérez-Luna, Y. Actividades Enzimáticas de Hongos para el Pre-tratamiento de Residuos Lignocelulósicos.