

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**  
**DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL**  
**DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

---

---



TESIS

**Evaluación de hongos filamentosos para la producción de enzimas  
celulolíticas**

Por:

Leidi Gabriela Cruz Vargas

Presentada como requisito parcial para poder obtener el título de:

**INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Diciembre 2019

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL  
DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

**Evaluación de hongos filamentosos para la producción de enzimas  
celulolíticas**

Por:

Leidi Gabriela Cruz Vargas

Presentada como requisito parcial para poder obtener el título de:

**INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

Aprobada por el comité de asesorías



---

Dr. Mario Alberto Cruz  
Asesor principal



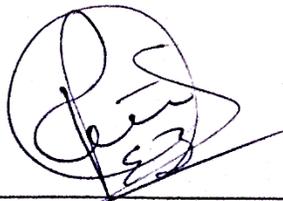
---

Dra. María Elena Castelo Mejía  
Coasesor



---

Dra. Sonia Noemí Ramírez Barrón  
Coasesor



---

Dra. Ruth Elizabeth Belmares Cerda  
Asesor externo

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Diciembre 2019

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL  
DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Evaluación de hongos filamentosos para la producción de enzimas  
celulolíticas

Por:

Leidi Gabriela Cruz Vargas

Presentada como requisito parcial para poder obtener el título de:

**INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

Aprobada por el comité evaluador

Dr. Mario Alberto Cruz  
Presidente

Dra. María Elena Castelo Mejía  
Vocal

Dra. Sonia Noemí Ramírez Barrón  
Vocal

Dra. Ruth Elizabeth Belmares Cerda  
Vocal

Dr. José Huéñez Alanís  
Coordinador de la División de Ciencia Animal



Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Diciembre 2019

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a Dios por acompañarme en el transcurso de mi vida, brindándome paciencia y sabiduría para culminar con éxito mis metas propuestas.

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, mi Alma Mater, por abrirme sus puertas y permitirme ser parte de ella, por formarme como profesionista.

A mis padres por ser los principales promotores de mis sueños, gracias por confiar y creer en mí y nunca soltar mi mano a lo largo de este camino.

Agradezco a mis asesores por la confianza brindada para realizar este proyecto de investigación, por el conocimiento, sus consejos, enseñanzas y apoyo.

Agradezco a los todos docentes que con su sabiduría, conocimiento y apoyo, motivaron a desarrollarme como persona y profesional.

A mis compañeros de generación por la retroalimentación del conocimiento y por los buenos y malos momentos que pasamos juntos.

## **DEDICATORIA**

A mis padres y mis hermanos por ser mi pilar fundamental y haberme apoyado incondicionalmente, por motivarme todos los días a perseguir mis sueños, pese a las adversidades que se presentaron siempre estuvieron ahí para mí.

A mis amigas Consuelo, Alva, Liz, Guadalupe, Mayte y Mónica por estar siempre ahí para mí no solo en los momentos de alegría y diversión sino también por extender su mano en los momentos difíciles.

A mi mejor amiga Ana que siempre estuvo a mi lado, apoyándome, motivándome, por acompañarme en las decisiones buenas, malas y peores y siempre ayudándome a ser una mejor persona de amor y luz.

A mi novio Arturo por ser parte de los cimientos de mi desarrollo, que con su amor y respaldo me acompañó en este camino compartiendo sueños y alegrías.

A todas las personas que forman parte y son especiales en mi vida.

# ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS .....	IV
DEDICATORIA.....	V
ÍNDICE GENERAL.....	VI
1. RESUMEN.....	X
2. ABSTRACT .....	XI
3. INTRODUCCIÓN .....	12
4. OBJETIVOS .....	14
4.1 OBJETIVO GENERAL .....	14
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	14
5. JUSTIFICACIÓN.....	15
6. ANTECEDENTES.....	16
6.1 CELULASA .....	17
6.1.1 TIPOS DE CELULASAS.....	17
6.1.2 MECANISMO DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA.....	17
6.1.3 MICRORGANISMOS PRODUCTORES DE CELULASA.....	19
6.1.4 APLICACIONES INDUSTRIALES DE LA CELULASA .....	19
6.2 AMILASA .....	22
6.2.1 CLASIFICACIÓN .....	23
6.2.1.1 A-AMILASA .....	23
6.2.1.2 $\beta$ - AMILASAS .....	24
6.2.2 HIDRÓLISIS DE LA AMILASA.....	25
6.3 XILANASA .....	25
6.3.1 CLASIFICACIÓN DE LAS XILANASAS.....	26
6.3.2 FUNCIÓN DE LA XILANASA.....	27
6.3.3 USO INDUSTRIAL DE LAS XILANASAS .....	29
6.4 HONGOS.....	30
6.4.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES.....	31
6.4.2 ESTRUCTURA CELULAR.....	32
6.4.3 CULTIVOS Y CARACTERÍSTICAS DE SU CRECIMIENTO.....	33

6.4.4	<b>FORMAS DE REPRODUCCIÓN</b>	33
6.4.5	<b>HONGOS FILAMENTOSOS</b>	34
6.4.5.1	<b>MORFOLOGÍA</b>	35
6.5	<b>ENZIMAS</b>	36
6.5.1	<b>CLASIFICACIÓN DE LAS ENZIMAS</b>	37
6.5.2	<b>ENZIMAS INDUSTRIALES</b>	39
6.5.3	<b>CONCENTRACIÓN DE LA ENZIMA Y EL SUSTRATO</b>	40
6.5.4	<b>TEMPERATURA</b>	41
6.5.5	<b>EFFECTO DEL PH</b>	42
6.6	<b>FERMENTACIÓN</b>	42
6.6.1	<b>FERMENTACIÓN SUMERGIDA</b>	43
7.	<b>METODOLOGÍA</b>	44
7.1	<b>REACTIVACIÓN DE HONGOS</b>	44
7.1.1	<b>CULTIVO DE CEPAS</b>	44
7.1.2	<b>CRECIMIENTO DE HONGOS</b>	44
7.1.3	<b>IDENTIFICACIÓN MACRO Y MICROSCÓPICA</b>	44
7.1.4	<b>TINCIÓN CON LACTOFENOL (AZUL DE ALGODÓN)</b>	44
7.1.5	<b>PRESERVACIÓN DEL MICRORGANISMO EN GLICEROL-LECHE DESCREMADA</b>	45
7.2	<b>EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD CELULÍTICA</b>	45
7.2.1	<b>ACTIVIDAD CELULÍTICA A 48 Y 96 HORAS</b>	45
7.2.2	<b>BUFFER</b>	46
7.2.3	<b>DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA</b>	46
7.2.4	<b>ENSAYOS DE ENZIMAS</b>	46
7.2.4.1	<b>ACTIVIDAD ENZIMÁTICA LA DE AMILASA</b>	46
7.2.4.2	<b>ACTIVIDAD ENZIMÁTICA LA DE CELULASA</b>	46
7.2.4.3	<b>ACTIVIDAD ENZIMÁTICA LA DE CELULASA</b>	47
7.3	<b>CULTIVO DE CEPA SELECCIONADA</b>	47
7.3.2	<b>FERMENTACIÓN EN MEDIO LÍQUIDO</b>	48
7.3.3	<b>DETERMINACIÓN DE BIOMASA</b>	48
7.3.4	<b>DETERMINACIÓN DE SUSTRATO</b>	49
7.3.5	<b>DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS Y ENSAYO ENZIMÁTICO</b>	49
8.	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	49
8.1	<b>REACTIVACIÓN DE HONGOS E IDENTIFICACIÓN MACRO Y MICROSCÓPICA</b>	49
8.2	<b>ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LAS NUEVE CEPAS</b>	52

8.2.1 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA AMILASA.....	52
8.2.3 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA CELULOLÍTICA.....	53
8.2.4 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA XILANASA.....	54
8.2.5 ANÁLISIS DE CONTENIDO PROTEICO.....	55
8.3 SELECCIÓN DEL HONGO PARA EVALUACIÓN DE CINÉTICA DE PRODUCCIÓN.....	56
8.3.1 ACTIVIDAD CELULÍTICA DEL HONGO SELECCIONADO.....	56
8.3.2.1 EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA AMILASA.....	56
8.3.2.2 EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA CELULASA.....	58
8.3.2.3 EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA XILANASA.....	59
8.3.2.4 EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD PROTEICA.....	61
8.3.2.5 ANÁLISIS DE PRODUCCIÓN DE BIOMASA.....	62
9. CONCLUSIONES.....	64
10. BIBLIOGRAFÍA.....	65

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. ESTRUCTURA DE CELULOSA.....	16
FIGURA 2. HIDRÓLISIS DE LA FIBRA CELULOLÍTICA .....	18
FIGURA 3. HIDRÓLISIS DEL ALMIDÓN CON LA AMILASA.....	25
FIGURA 4. ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL FAMILIAS 10 Y 11 GLICOSIL HIDROLASAS.....	26
FIGURA 5. ENZIMAS QUE DEGRADAN EL XILANO.....	27
FIGURA 6. MECANISMO DE ACCIÓN XILANASA.....	28
FIGURA 7. ESTRUCTURA CELULAR DE LOS HONGOS.....	33
FIGURA 8. MORFOLOGÍA DE HONGOS FILAMENTOSOS.....	35
FIGURA 9. REACCIÓN CATALIZADORA.....	37
FIGURA 10. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DEL SUSTRATO SOBRE EL ÍNDICE DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	41
FIGURA 11. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE ENZIMAS EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	41
FIGURA 12. PH ÓPTIMO EN EL CUAL LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA ES MÁXIMA.....	42
FIGURA 13. COMPARACIÓN ENTRE IDENTIFICACIÓN MACROSCÓPICA Y MICROSCÓPICA. A) CEPA H1, B) CEPA MZ, C) CEPA H4, D) CEPA C+.....	50
FIGURA 14. COMPARACIÓN ENTRE IDENTIFICACIÓN MACROSCÓPICA Y MICROSCÓPICA. A) CEPA CH, B) CEPA C3, C) CEPA H8.....	51
FIGURA 15. COMPARACIÓN ENTRE IDENTIFICACIÓN MACROSCÓPICA Y MICROSCÓPICA. A) CEPA H6, B) CEPA H9.....	52
FIGURA 16. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA AMILASA.....	53
FIGURA 17. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA CELULASA.....	54
FIGURA 18. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA XILANASA.....	55
FIGURA 19. CONTENIDO PROTEICO.....	56
FIGURA 20. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA AMILASA A CONCENTRACIONES 1%, 1.5% Y 2% DE CMC.....	58
FIGURA 21. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA CELULASA A CONCENTRACIONES 1%, 1.5% Y 2% DE CMC.....	59
FIGURA 22. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA XILANASA A CONCENTRACIONES 1%, 1.5% Y 2% DE CMC.....	61
FIGURA 23. EVALUACIÓN DE PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS A CONCENTRACIONES 1%, 1.5% Y 2% DE CMC.....	62
FIGURA 24. PRODUCCIÓN DE BIOMASA.....	63

## ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 1.- DIVERSOS PRODUCTOS SINTETIZADOS POR ORGANISMOS FÚNGICOS Y SUS APLICACIONES.....	30
CUADRO 2. TRATAMIENTOS.....	48

## 1. RESUMEN

La celulosa es la fuente de carbono renovable más abundante de la Tierra. Sin embargo, la estructura de este polímero constituye una barrera física y química para acceder al carbono, lo que ha limitado el aprovechamiento del mismo. El interés en la celulosa se deriva de su uso en las diferentes industrias como la textil, alimentarias, vinícola, cervecera, de detergente, entre otras. En la naturaleza, un pequeño porcentaje de microorganismos pueden degradarla a través de la expresión de celulasas. Dentro de estos microorganismos, uno de los grupos más activos y eficientes son los hongos filamentosos. Los hongos filamentosos son responsables de la mayor celulosis en la naturaleza, por la eficiencia y diversidad de sus sistemas celulolíticos, y sus ventajas adaptativas. Esta investigación evaluó la cinética de producción de tres enzimas: amilasa, celulasa, xilanasas en 9 cepas diferentes de hongos filamentosos por cuatro días y en base a la recopilación de datos se eligió el hongo con mayor producción de enzimas celulolíticas ya que esta es la de interés para este estudio y se realizó una valoración de su actividad enzimática con tres concentraciones de sustrato al 1%, 1.5% y 2% de carboximetilcelulosa (CMC) por 5 días tomando muestras cada 24 horas. La mayor producción de enzimas de celulosa se presentó con el tratamiento al 2% con 617 U/L a las 96 horas de tratamiento.

**Palabras clave:** hongos, amilasa, xilansa, celulasa, fermentación

## 2. ABSTRACT

Cellulose is the most abundant renewable carbon source on Earth. However, the structure of this polymer constitutes a physical and chemical barrier to access carbon, which has limited its use. The interest in cellulose is derived from its use in different industries such as textiles, food, wine, beer, detergent, among others. In nature, a small percentage of microorganisms can degrade it through the expression of cellulases. Within these microorganisms, one of the most active and efficient groups are filamentous fungi. Filamentous fungi are responsible for the greatest cellulolysis in nature, for the efficiency and diversity of their cellulolytic systems, and their adaptive advantages. This research evaluated the production kinetics of three enzymes: amylase, cellulase, xylanase in 9 different strains of fungal filaments for four days and based on data collection, the fungus with the highest production of cellulolytic enzymes was chosen since this is that of interest for this study and an evaluation of its enzymatic activity was performed with three substrate concentrations at 1%, 1.5% and 2% carboxymethylcellulose (CMC) for 5 days taking samples every 24 hours. The highest production of cellulose enzymes was presented with the 2% treatment with 617 U / L at 96 hours of treatment.

**Keywords:** mushrooms, cellulase, amylases, xylanases, fermentation

### 3. INTRODUCCIÓN

La producción de enzimas microbianas se ha convertido en uno de los productos biotecnológicos que han ido tomando importancia en las industrias cerveceras, vinícolas, textiles por mencionar algunas, debido a las ventajas técnicas y económicas ya que se pueden llegar a producir a grandes escalas con rendimientos considerables, catalizan numerosas reacciones y existe una disponibilidad ininterrumpida de las mismas.

La celulosa es una de los recursos renovables que se encuentran en mayor abundancia en la Tierra y una fuente de carbono. Su interés ha ido incrementando al pasar de los años, los grandes avances en la biotecnología industrial ha dado paso a la producción de las celulosas a partir de la fermentación en estado líquido o sólido siendo este más común, ya que esta técnica de producción brinda mayores ventajas en comparación con las tecnologías más simples y como mayor eficiencia y menores costos, además, de se tiene un mayor control en aspectos como temperatura, agitación, pH y se puede medir directamente la producción de biomasa.

En la industria alimentaria no se han desaprovechado los múltiples beneficios que la celulosa puede proporcionar como lo es: la filtración de mostos, extracción de aceites comestibles entre otras aplicaciones.

De manera natural la descomposición de la celulosa es llevada a cabo por protozoarios, bacterias y hongos. Los microorganismos que son mayormente utilizados son los hongos filamentosos que se caracterizan por la formación de hifas que les permiten ser más eficientes y competitivos en la secreción de enzimas celulíticas, además que tienen una tolerancia a la baja actividad acuosa y una resistencia a las altas presiones osmóticas. Los hongos colonizan rápidamente el sustrato y producen diferentes complejos enzimáticos, entre ellos el de la celulosa que forma parte fundamental en la degradación de la celulosa.

El objetivo de esta investigación fue analizar la cinética de producción de diferentes enzimas en diversos hongos con el fin de determinar en qué hongo hay una mayor

producción de celulasa, elegir la más significativa para evaluar su producción y determinar la fase de mayor crecimiento y rendimiento para su extracción y purificación.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo general**

Evaluar la producción de enzimática de 9 hongos filamentosos pertenecientes a la colección DCTA-UAAAN mediante fermentación líquida determinando actividad enzimática amilasa, celulasa y xilanasas.

### **4.2 Objetivos específicos**

- Activar las 9 cepas de hongos que conforman la colección de la DCTA-UAAAN.
- Evaluar la producción de las enzimas amilasa, celulasa y xilanasas de los hongos a las 48 y 96 horas de tratamiento.
- Seleccionar el hongo con mayor producción celulolítica.
- Valorar cinéticamente la producción de enzimas celulolíticas por el hongo seleccionado.

## 5. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad hay un interés general por el desarrollo de nuevas tecnologías o alternativas que nos ayuden a mejorar la eficiencia en los procesos de producción a niveles industriales, desde la industria farmacéutica hasta la industria alimentaria.

La utilización de microorganismos es una de las nuevas alternativas que está utilizando la biotecnología y otras ramas relacionadas con ella. Uno de los atractivos es que algunos de los microorganismos, en específico los hongos son distinguidos por su capacidad de realizar reacciones químicas de manera rápida. Los hongos filamentosos juegan un rol muy importante en la degradación de los sustratos celulósicos y producción de enzimas celulíticas que participan en procesos industriales muy importantes.

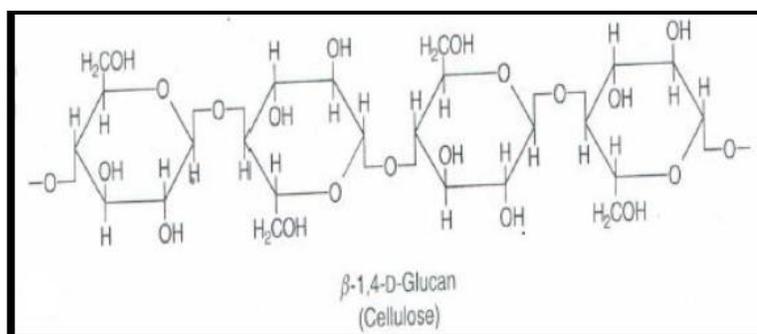
Con esta investigación lo que se pretende es medir la cinética de producción de la celulasa en diferentes hongos filamentosos para determinar que hongo es el que tiene una mayor producción y así evaluar de manera más extensa a este microorganismo estableciendo los puntos de mayor producción, las condiciones adecuadas para su desarrollo, con el propósito de hacer más eficaz su producción a niveles industriales y así disminuir los costos y tiempos invertidos en procesos como fermentaciones de vinos, extracción de aceites entre otros procesos.

## 6. ANTECEDENTES

A lo largo de la historia se han venido empleando las enzimas para usos industriales, una de las enzimas comúnmente utilizadas es la celulasa obtenida mediante fermentación con diferentes microorganismos, los cuales han sido estudiados en varios sustratos por ejemplo papel periódico reciclado o bagazo de caña de azúcar. La optimización de la producción de enzimas a partir de microorganismos depende de una serie de factores interrelacionados, lo que significa que una enzima solo puede sintetizarse durante parte de su ciclo de crecimiento [24].

El principal componente estructural de los vegetales es la celulosa, la cual funciona en la mayoría de la materia prima vegetal como un secuestrador o barrera estructural que limita la liberación de componentes de sabor de interés para la industria alimentaria [21].

La celulosa es un polisacárido formado por unidades de anhidro glucosa, las cuales se mantienen unidas mediante enlaces  $\beta$ -1,4 glicosídicos. Pero además, la configuración  $\beta$  le permite a la celulosa formar cadenas largas y lineales, las cuales no se presentan aisladas sino unidas entre sí mediante puentes de hidrógeno intramoleculares formando una estructura supramolecular cristalina y organizada, resistente a la hidrólisis [13]. En la figura 1 podemos apreciar la estructura de la celulosa.



**Figura 1. Estructura de celulosa**

La extracción de compuestos de interés, es la aplicación de enzimas celulasas o preparados con actividad enzimática múltiple (celulasa, hemicelulasa y pectinasa) debido a su efecto sinérgico, por el potencial que tienen sobre la hidrólisis de los componentes estructurales de la pared celular de los vegetales [15].

La descomposición de la celulosa se da naturalmente por microorganismos como: protozoarios, bacterias y hongos. Los hongos tienen la facilidad de colonizar rápidamente el sustrato produciendo diferentes complejos enzimáticos, entre ellos el complejo enzimático celulasa, que intervienen en la descomposición de la celulosa, constituido principalmente por tres tipos de enzima; endoglucanasas, exoglucanasas y betaglucosidasas; estas actúan sinérgicamente en la degradación de la celulosa liberando moléculas de glucosa [21].

## 6.1 Celulasa

Las celulasas es el nombre genérico que recibe el complejo enzimático celulolítico que, como su nombre lo indica, es capaz de hidrolizar la celulosa, homopolímero compuesto por unidades de glucosa unidas mediante un enlace glicosídico  $\beta$ -1,4. Las celulasas se diferencian de otras glicosil-hidrolasas por su habilidad de hidrolizar el enlace glicosídico  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) [10].

### 6.1.1 Tipos de celulasas

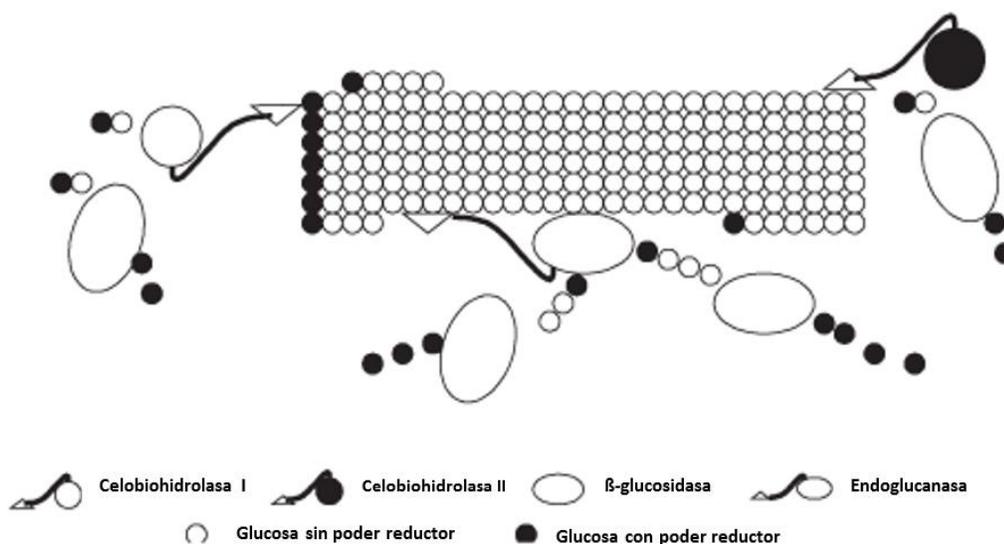
La acción enzimática para llevar a cabo la hidrólisis de la celulosa implica la operación secuencial y la acción sinérgica de un grupo de celulasas, que presentan diferentes sitios de enlace, debido a la naturaleza compleja de la molécula de celulosa. El sistema de celulasa típico incluye tres tipos de enzimas: la endo- $\beta$ -1,4-glucanasa (Cx) (1,4- $\beta$ -D-glucan glucanohidrolasa E.C.3.2.1.4), la exo- $\beta$ -1,4-glucanasa (C1) (1,4- $\beta$ -Dglucan celobiohidrolasa E.C.3.2.1.91) y la  $\beta$ -1,4-glucosidasa (celobiasa) (Cb) ( $\beta$ -D-glucósido glucohidrolasa E.C.3.2.1.21) [21].

### 6.1.2 Mecanismo de hidrólisis enzimática

El mecanismo propuesto en la literatura para la degradación de la celulosa puede resumirse en tres etapas: Primero la endo  $\beta$ -1,4-glucanasa actúa al azar sobre los enlaces  $\beta$ -1,4 glicosídicos internos presentes entre las unidades de glucosa que forman la molécula de la celulosa, y convierte las cadenas largas a oligosacáridos, los cuales mantienen la configuración  $\beta$  de su estructura. La acción de esta enzima es sobre las regiones amorfas de la molécula de celulosa o sobre la superficie de las microfibrillas, y tiene como resultado la disminución de la longitud de la cadena de celulosa y la creación de nuevos extremos reactivos que sirven de sustrato para

la posterior acción de C1. En la segunda etapa actúa la exo  $\beta$ -1,4- glucanasa, la cual es una enzima que corta la cadena 1,4  $\beta$ -D-glucano a partir del extremo no reductor de la molécula de celulosa y de las celodextrinas, lo que provoca la remoción de unidades de celobiosa o glucosa. Ambas enzimas endoglucanasa y exoglucanasa son inhibidas por uno de los productos de la hidrólisis enzimática, la celobiosa, lo que disminuye la eficiencia de la hidrólisis. Una vez degradada las zonas amorfas de la celulosa, tiene lugar la tercera etapa de la hidrólisis, en donde la región cristalina comienza a ser hidrolizada, como resultado de la acción sinérgica de la endoglucanasa y la exoglucanasa. Finalmente, una etapa que limita la degradación de la celulosa es la hidrólisis de la celobiosa a glucosa mediante la acción de la  $\beta$ -1,4- glucosidasa Cb, porque las glucanastas son inhibidas por la celobiosa [21]. En la figura 2 se ilustra el proceso de hidrólisis de las fibras celulíticas.

**Figura 2. Hidrólisis de la fibra celulítica**



Cuando actúan juntas, las enzimas del complejo celulolítico tienen un mejor rendimiento que la suma de los rendimientos individuales, es decir, cuando actúan aisladas unas de otras. Tal efecto se conoce como sinergia. Se conocen al menos tres formas de sinergia entre celulasas:

- Sinergia EnG-ExG: la endoglucanasa, que actúa en las regiones amorfas de la fibra, proporciona terminales reductores y no reductores para celobiohidrolasas.
- Sinergia ExG-ExG: las celohidrolasas actúan simultáneamente en la hidrólisis de los terminales reductores y no reductores liberados por la acción de la endoglucanasa.
- Sinergias ExG-BG y EnG-BG: como sus productos de hidrólisis, la celobiohidrolasa y la endoglucanasa liberan celobiosa y oligosacáridos, respectivamente, que son sustratos para la  $\beta$ -glucosidasa [16].

### 6.1.3 Microorganismos productores de celulasa

Las enzimas celulasas son producidas por una gran variedad de microorganismos, ya sean:

- Bacterias aeróbicas: *Cellulomonas sp.*, *Cellvibrio sp.*, *Microbispora bispora* y *Thermomonospora sp.*
- Bacterias anaeróbicas: *Acetivibrio cellulolyticus*, *Bacteroides succinogenes*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* y *Clostridium thermocellum*.
- Hongos aeróbicos: *Trichoderma viride*, *Trichoderma reesei*, *Penicillium pinophilum*, *Sporotrichum pulverulentum*, *Fusarium solani*, *Talaromyces emersonii* y *Trichoderma koningii*.
- Hongos aeróbicos termofílicos: *Sporotrichum thermophile*, *Thermoascus aurantiacus* y *Humicola insolens*.
- Hongos anaeróbicos mesofílicos: *Neocallimastix frontalis*, *Piromonas communis*, *Sphaeromonas communis*.

Sin embargo, sólo algunos de ellos son capaces de liberarlas al medio extracelular [9].

### 6.1.4 Aplicaciones industriales de la celulasa

La biotecnología de las celulasas empezó al principio de los años 80, primero en la alimentación animal seguida por aplicaciones en la industria de alimentos.

Posteriormente esta enzima empezó a usarse en las industrias de lavandería, textil y de la pulpa y papel. En las últimas dos décadas su uso se ha incrementado en forma considerable y actualmente, junto con la xilanasa, representan cerca del 20% del mercado mundial de las enzimas.

En la industria del papel, que alcanza ventas de millones de dólares en Estados Unidos y Europa, las celulasas y hemicelulasas usadas en etapas de pretratamiento permiten una mejor deslignificación y ahorro en reactivos químicos en la etapa posterior de blanqueamiento. Las celulasas también mejoran la remoción de tintas de papeles de diario viejos, dando mejores resultados que cuando se utilizan químicos.

Por otro lado, la industria del textil se ha convertido en los últimos 14 años en una de las principales áreas para las aplicaciones industriales de enzimas. Las celulasas, del tipo endoglucanasas, representan el mayor grupo de enzimas en esta industria, considerando el hecho que cerca del 70 % de las fibras procesadas por esta industria son de celulosa. Las aplicaciones más relevantes en esta área son: destinción de prendas para dar apariencia de gastado, tratamiento de las telas para eliminar imperfecciones de las fibras, preparación de la tela previa a tinciones o impresiones para obtener mayor afinidad con los pigmentos y desfibrilación realizada antes y después del teñido. El uso de aditivos en los detergentes representa la mayor aplicación en la industria de las enzimas. Contrariamente a las otras enzimas utilizadas en detergentes, la endoglucanasa no degrada manchas, sino que es activa en las fibras de celulosa de la ropa, alcanzando uno o más de los siguientes efectos: remoción de manchas de suciedad atrapada en las fibrillas de celulosa; suavidad permanente de la ropa; mejoramiento del color por la remoción de las pelusas formadas por la fibrilación; desfibrilación con efecto antidepositante en la suciedad. Adicionalmente se le suma la cualidad de no dañar el algodón u otros materiales de celulosa de la ropa, manteniendo sin cambios la resistencia a la tensión de la tela.

Dentro de la industria alimentaria, las celulasas se usan para favorecer la extracción y filtración de jugos de frutas o verduras, filtración de mostos, extracción de aceites

comestibles, etc. Por ejemplo, en la extracción de jugo de naranja y zanahoria, los preparados enzimáticos tienen un enorme potencial de aplicación, por un lado se incrementa el porcentaje de extracción de los jugos; y por otro lado, el jugo presenta un mejor sabor. La maceración enzimática es una etapa importante previa, en cualquier proceso industrial en donde se utiliza el tratamiento térmico, por dos razones: primero, para evitar o disminuir la pérdida de los componentes nutricionales presentes en el tejido vegetal y segundo, para evitar el deterioro de las propiedades sensoriales del producto como son la textura y el sabor. Mediante la degradación enzimática de los polisacáridos presentes en el coco es posible liberar la leche de coco extra, que se encuentra retenida en el residuo del fruto extraído; de la misma manera es posible realizar una extracción del almidón a partir del residuo de desecho de sago del aceite de palta, soya, semillas de ajonjolí, de cacahuate, girasol, oliva, y salvado de arroz.

En la industria de la cerveza y el vino las celulasas tienen diversas y atractivas aplicaciones, una de ellas es en el proceso de producción de la cerveza, en donde las celulasas del tipo endoglucanasa son utilizadas para la hidrólisis del enlace 1,4- $\beta$ -glucosídicos de las semillas de cebada, lo que reduce la viscosidad y libera azúcares reducidos durante la primera fermentación. Con esto se obtiene un aumento de eficiencia en dicha etapa, y en la etapa de filtración, y un mejoramiento en la calidad de la cerveza. En la industria del vino, celulasas del tipo  $\beta$ -glucosidasa son utilizadas para el mejoramiento del aroma del vino. Así mismo el uso de endoglucanasas es conocido para el mejoramiento en las eficiencias de las etapas de maceración, clarificación y filtración, así como también para la obtención de un vino de mejor calidad y estabilidad.

La extracción de colorantes es otra aplicación atribuida a algunos preparados enzimáticos, específicamente la producción de xantófilas extraídas de los pétalos de caléndula. La celulasa puede ser beneficiosa para la comida, las alergias ambientales, el abandono de drogas, la eliminación de células, la limpieza del colon y los síndromes de dolor, Cándida (infecciones por la 8 levadura), gases, hinchazón,

las alergias agudas a la comida, el dolor de la cara o parálisis y ayuda a remediar los problemas de la digestión como mala absorción.

La producción de etanol proveniente de biomasa lignocelulósica, y por ende, mediante el uso de celulasas, emerge como una de las más importantes tecnologías para la producción sostenida de combustibles renovables utilizados en el transporte. El etanol posee más alto índice de octanaje que la gasolina y produce menos emisiones, por lo tanto, ha sido reconocido como un sustituto y/o aditivo para la gasolina. Debido a estas ventajas aparentes, y también por ser una alternativa renovable para las gasolinas existentes usadas en transportes, existe hoy un interés en aumentar la comercialización de tecnologías para la producción de etanol a partir de biomasa de bajo costo. La mayor parte del etanol producido en el mundo es usualmente originario del almidón o de la sacarosa (melaza o jugo de caña), pero la tecnología para la producción de etanol proveniente de plantas no comestibles, está siendo desarrollada rápidamente para una producción a gran escala, que será una realidad en los años venideros. La producción de etanol proveniente de biomasa lignocelulósica, involucra los diversos pasos de pre-tratamiento, hidrólisis, (sacarificación) y la recuperación del etanol. La hidrólisis de la biomasa, es esencial para la generación de azúcares fermentables que son luego convertidos en etanol, mediante la acción microbiana. La hidrólisis ácida o hidrólisis enzimática son, principalmente, empleadas para la hidrólisis de biomasa con diferentes eficiencias dependiendo de las condiciones del tratamiento, tipo de biomasa y propiedades del agente hidrolítico. La primera es una tecnología madura pero con las desventajas de generar desechos ácidos peligrosos y las dificultades técnicas de recuperar el azúcar desde el ácido. El método enzimático, por su parte, es más eficiente y ocurre bajo condiciones ambientales sin generar ningún desecho tóxico, además de tener mucho más potencial para ser mejorado en costo y eficiencia [9].

## 6.2 Amilasa

Las amilasas son enzimas que catalizan al azar la hidrólisis de enlaces glicosídicos  $\alpha$ -1,4 de polisacáridos como el almidón y el glicógeno, para producir maltosa, oligosacáridos de diferentes tamaños y cadenas más o menos ramificadas llamadas

dextrinas límite. Son de gran importancia en la industria alimenticia, textil, papelera y farmacológica, y aunque las fuentes productoras de  $\alpha$ -amilasas incluyen plantas, animales y microorganismos, son las enzimas microbianas las que encuentran mayor demanda en aplicaciones industriales. Tradicionalmente la producción de  $\alpha$ -amilasas se ha llevado a cabo mediante procesos de fermentación líquida sumergida (FLS) debido al mayor control de factores ambientales como temperatura y pH <sup>[11]</sup>.

## 6.2.1 Clasificación

### 6.2.1.1 $\alpha$ -amilasa

Esta enzima tiene un peso molecular de 50,000 Daltons, es estable a pH de 5.5-8.0 con un actividad óptima de 5.9. Las  $\alpha$ -amilasas son enzimas dependientes de calcio, aunque el catión no esté integrado en el centro activo de la enzima, se encuentra fuertemente unido a la enzima y sólo pueden ser removidos a pH bajos por el uso de agentes quelantes. La completa remoción del calcio conlleva a una pérdida total de actividad. La importancia radica en que mantiene la molécula de la enzima en la configuración óptima para generar una máxima actividad y estabilidad. A menudo se nombra la  $\alpha$  amilasa como enzima licuante, debido a su rápida acción para disminuir la viscosidad de las soluciones de almidón.

Las principales aplicaciones de las enzimas extracelulares que degradan el almidón consisten en la conversión del almidón de jarabes que contienen glucosa, maltosa y oligosacáridos, en la producción de azúcares fermentables en cervecería y obtención de bebidas alcohólicas y en la modificación de la harina de panadería. Entre las enzimas comercialmente utilizadas se destacan las alfa amilasas de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Aspergillus oryzae*. Entre los microorganismos que producen  $\alpha$  amilasa, se encuentran tanto bacterias como hongos tales como *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *B. amyloliquefaciens*, *Pseudomonas*, *Proteus* y *Serratia*; algunos géneros de hongos como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cephalosporium*, y *Mucor*.

Se han obtenido enzimas termoestables a partir de *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis*, permitiendo llevar a cabo la sacarificación a altas temperaturas acelerando el proceso y minimizando la contaminación microbiana [12].

#### **6.2.1.2 $\beta$ -amilasas**

La  $\beta$ -amilasa ó 1,4 glucan-maltohidrolasas es una exoenzima que ataca los enlaces  $\alpha$  1,4 glucosídicos en la parte externa de la cadena de almidón, la  $\beta$  amilasa separa unidad de maltosa a partir de las extremos no reductores de esta hidrólisis alterna de enlaces glucosídicos. Las  $\beta$  amilasas atacan la amilasa solo desde un extremo a la vez, y, a causa de ellos, son muchos menos efectivas que las  $\alpha$  amilasas.

Debido a que está enzima esta imposibilitada para hidrolizar los puntos ramificados  $\alpha$ -1,6 en la molécula de almidón, los productos finales de la acción sobre el sustrato son maltosas y dextrinas, formándose pocas cantidades de maltotriosa y glucosa.

Las  $\beta$ -amilasas contiene un grupo sulfidrilo esencial para la actividad enzimática, que se lleva a cabo de forma óptima en un rango de pH entre 4y 5. La actividad de la enzima se analiza mediante métodos colorimétricos que miden la cantidad de azúcares reductores, liberados a partir del almidón. Estas enzimas están presentes en gran número de bacterias Gram positivas formadoras de esporas.

Algunos microorganismo productores son: *Bacillus polymyxa*, *B. cereus*, *Streptomyces* sp. y *Rhizopus japonicus*. Aunque el rendimiento en las cepas silvestres es generalmente bajo, se han descubierto mutantes que producen 200 veces más enzimas que la cepa silvestre [12].

### 6.2.2 Hidrólisis de la amilasa

Las amilasas, enzimas glucolíticas, hidrolizan los enlaces éter (glucosídicos) de las cadenas de los polisacáridos de las sustancias amiláceas, degradándolas a oligosacáridos, disacáridos y monosacáridos, que son más solubles en medios acuosos figura 3. De esta manera conseguiremos eliminar el almidón de forma más sencilla [2].

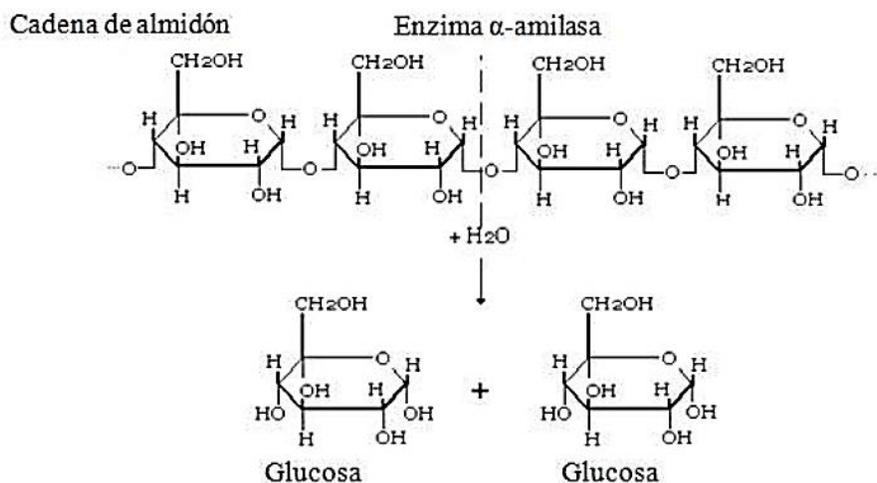


Figura 3. Hidrólisis del almidón con la amilasa

Al igual que las proteasas, las amilasas pueden hidrolizar las uniones glucosídicas internas de los polisacáridos (endo-amilasas) y las que se encuentran en las extremidades de las cadenas (exo-amilasas). Siendo las terminales más fáciles de degradar para las amilasas que las interiores. También, se encuentran unas enzimas muy específicas llamadas glucoamilasas. Estas proteínas pueden degradar las uniones glucosídicas de las cadenas lineares que poseen uniones 1,4 glucosídicas y las uniones de las ramificaciones laterales con uniones 1,6 glucosídica [2].

### 6.3 Xilanasa

Las xilanasas son un grupo de enzimas extracelulares que actúan sinérgicamente, producidas por diversos microorganismos como bacterias (saprofitas y fitopatógenas), micorrizas, levaduras, hongos, actinomicetos, además en protozoa, insectos, crustáceos, caracoles y algunas semillas de plantas durante la fase de germinación en suelo [7].

### 6.3.1 Clasificación de las xilanasas

Las xilanasas son generalmente clasificadas en las familias 10 y 11 de las glicosil hidrolasas y tienen una relación inversa entre su punto isoeléctrico (pI) y peso molecular.

De esta forma, en base al peso molecular y punto isoeléctrico, las xilanasas se dividen en dos grupos:

- Un primer grupo de bajo peso molecular (menor a 30 kDa) y pI alcalino.
- Un segundo grupo de mayor peso molecular (más de 30 kDa) y pI ácido.

Sin embargo, se han estudiado xilanasas con características intermedias que no se clasifican en ninguno de los dos grupos [18].

En la figura 4 se muestra la estructura tridimensional de las xilanasas pertenecientes a las principales clasificaciones de éstas: las de las familias 10 y 11 de las glicosil hidrolasas.

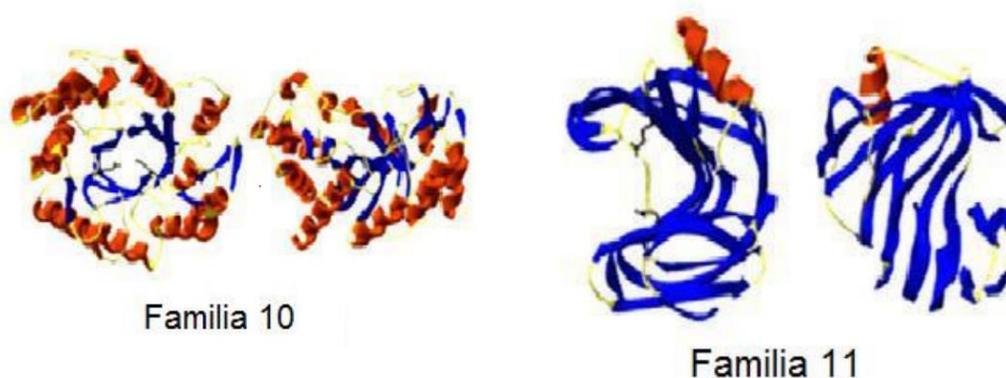
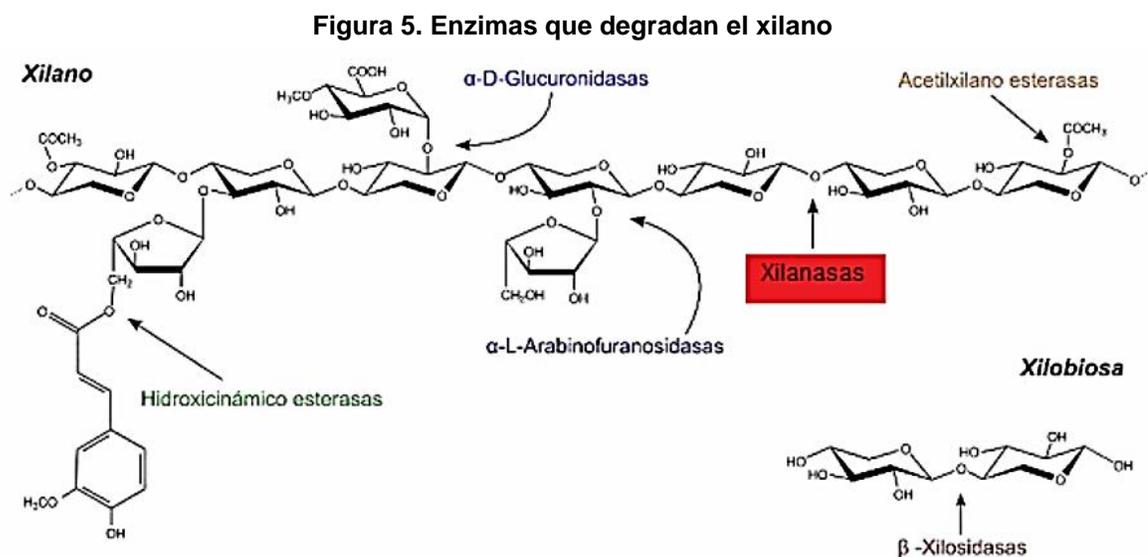


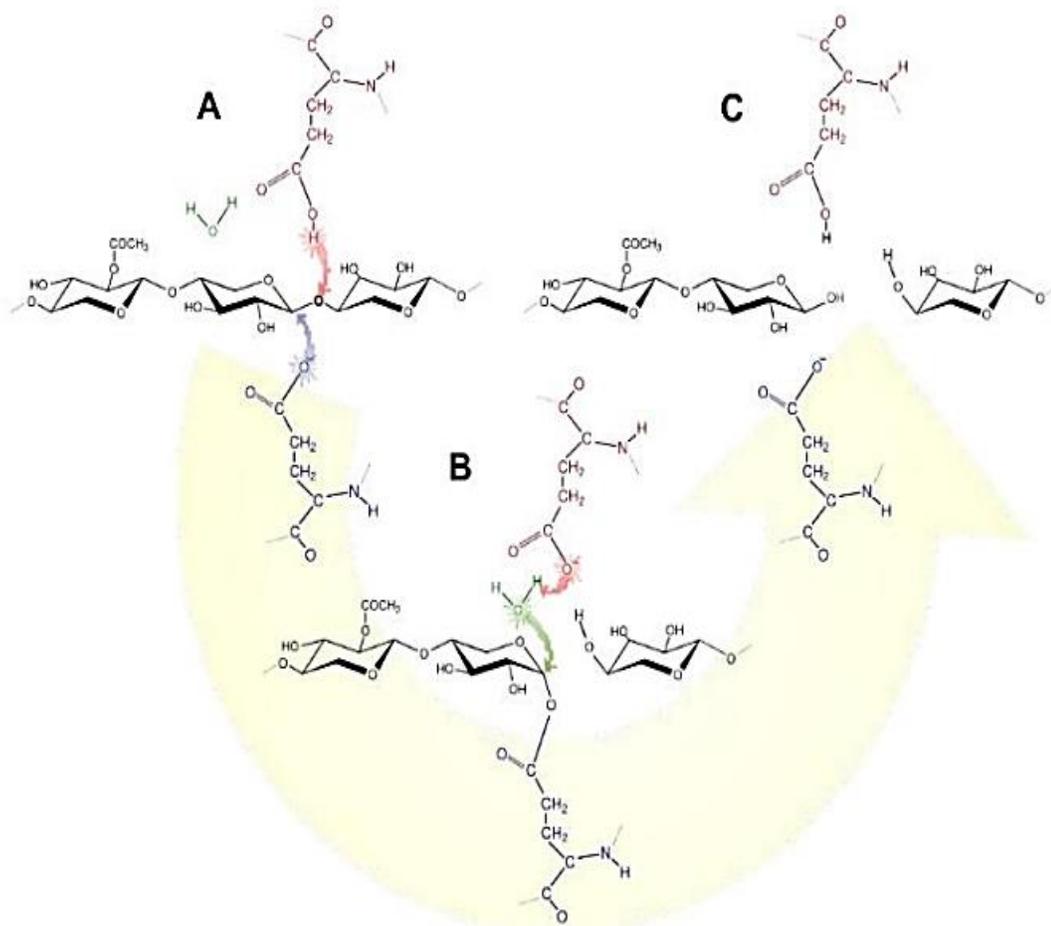
Figura 4. Estructura tridimensional familias 10 y 11 glicosil hidrolasas

### 6.3.2 Función de la xilanasa

Las endoxilanasas o xilanasas (endo- $\beta$ -1,4-xilanasas) son las enzimas que actúan sobre la cadena principal del xilano hidrolizando los enlaces internos  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) entre moléculas de xilosa, dando lugar a una mezcla de xilooligosacáridos de diferentes tamaños. También pueden hidrolizar xilooligómeros, siendo más efectiva cuando es mayor el grado de polimerización de éstos. Sin embargo, no hidrolizan xilobiosa, lo que permite distinguirlas claramente de las  $\beta$ -xilosidasas.



Entre los microorganismos xilanolíticos (que degradan xilano), se encuentra una gran multiplicidad de xilanasas que difieren en su especificidad con respecto al xilano. Esto se debe a la gran complejidad del xilano y la necesidad de degradar las distintas zonas de éste. Debido a que el xilano es un polímero de elevado grado de polimerización, este no puede ser transportado al interior del microorganismo para ser degradado, por lo que las xilanasas deben ser secretadas al medio extracelular. Sin embargo, se han descrito xilanasas de algunos microorganismos que se localizan en el espacio periplasmático. Como se mencionó anteriormente, las xilanasas pueden ser clasificadas en su gran mayoría en las familias 10 y 11 de las glicosil hidrolasas, por lo que su mecanismo catabólico corresponde al de estas enzimas. Así, el mecanismo utilizado para la hidrólisis del sustrato corresponde a un doble desplazamiento con retención anomérica ( $\beta \rightarrow \beta$ ) como se muestra en la figura 5.



**Figura 6. Mecanismo de acción xilanasa**

En la hidrólisis del enlace glucosídico por este mecanismo intervienen 2 residuos glutamato conservados del centro activo de la xilanasa, actuando uno de ellos como catalizador ácido/base y el otro como residuo nucleofílico. Una vez el esqueleto de xilosas ha sido posicionado correctamente entre los dos ácidos glutámicos catalíticos, el que actúa como catalizador ácido/base realiza un ataque ácido sobre el enlace glucosídico, protonando el oxígeno de dicho enlace, mientras el otro glutamato realiza un ataque nucleofílico sobre el carbono anomérico del enlace (Figura 6. A). De este primer paso se libera uno de los productos de reacción y se forma un intermediario  $\alpha$ -glicosilo-enzima. Luego, el glutamato ácido/base actúa como base y capta un protón de una molécula de agua, lo que permite que ésta ataque el enlace entre el glutamato nucleófilo y el carbono anomérico (Figura 6. B), produciendo su hidrólisis, dando como resultado un producto cuyo carbono

anomérico vuelve a la misma configuración que en el sustrato ( $\beta \rightarrow \beta$ ), liberándose la enzima de su unión al sustrato para poder iniciar un nuevo proceso de catálisis (Figura 6.C). Las xilanasas que se clasifican en la familia 10 de las glicosil hidrolasas son enzimas multidominio, cuyo dominio catalítico es de 250 a 450 aminoácidos con un plegamiento tipo barril, mientras que las de la familia 11 poseen un único dominio catalítico de 180 a 200 aminoácidos que se pliegan en una conformación de lámina  $\beta$  curvada sobre sí misma <sup>[18]</sup>.

### 6.3.3 Uso industrial de las xilanasas

Las xilanasas representan una larga proporción de las enzimas hidrolíticas comerciales y se obtienen de fuentes bacterianas y fúngicas; las enzimas de los géneros *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Bacillus* y *Thermomonospora* se usan ampliamente así como las de *P. chrysosporium*, *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Schizophyllum* y *Penicillium* de origen fúngico, que también han sido estudiados por su producción de hemicelulasas.

En la actualidad, la aplicación de las enzimas xilanolíticas es creciente y de importancia en la industria papelera para tratar sus residuos y el preblanqueado de la pulpa Kraft, ya que se necesitan menos pasos de blanqueado y disminuye el gasto de reactivos químicos; otras aplicaciones incluyen<sup>[7]</sup>:

- Uso como aditivo en alimento de aves para mejorar la ganancia de peso y mejorar la eficiencia de conversión, porque se mejora la digestibilidad.
- Uso en combinación con amilasas para mejorar el volumen específico en panadería.
- Extracción de almidón, café y aceites vegetales.
- Tratamiento de aguas de desecho.
- Mejoramiento de propiedades nutricionales de ensilados y granos.
- Obtención de proteínas celulares, combustibles y sustancias químicas.
- Aplicación en sistemas donde no se requieren enzimas celulolíticas como en el procesamiento de fibras como linaza y cáñamo.
- Obtención de xilitol y etanol a partir de biomasa lignocelulósica para usarlo como combustibles.

- Clarificación de mostos y jugos de fruta junto con celulasas y pectinasas.

## 6.4 Hongos

En el pasado los hongos fueron considerados parte del reino vegetal, posteriormente, fueron clasificados en un quinto Reino que se conocía como Hongos o Fungi. Hoy en día los organismos estudiados por los micólogos se ubican en tres reinos Hongos o Fungi, Chromista o Straminilla y Protoza.) [6].

Los organismos que pertenecen al linaje de los hongos incluyen setas, royas, trufas, mohos y levaduras, así como otros organismos menos conocidos. Se han descrito alrededor de 100.000 especies de hongos, pero se estima que puede existir un número total de 1,5 millones de especies [19].

En el cuadro 1 se describen algunos microorganismos y su uso en la industria.

Cuadro 1.- Diversos productos sintetizados por organismos fúngicos y sus aplicaciones.

Microorganismo	Producto	Utilidad
<i>Aspergillus niger</i>	Ácido cítrico	Productos alimenticios y medicinales.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Etanol Biomasa Ergosterol	Cervecería, carburante, vinos, suplemento alimenticio.
<i>Rhizopus oryzae</i>	Ácido láctico	Alimentos y productos farmacéuticos.
<i>Rhizopus arrhizus</i> <i>Rhizopus nigricans</i>	11- $\gamma$ -hidroxiprogesterona	Intermediario para 17-hidroxicorticoesterona.
<i>Penicillium chrysogenum</i> <i>Penicillium notatum</i>	Penicilinas	Industria farmacéutica.
<i>Chepalosporium acremonium</i>	Cefalosporina C	
<i>Apergillus sp.</i>	Celulasas, glucoamilasas, pectinasas, lactasas, lipasas, proteasas, diastasas.	Industria farmacéutica y de alimentos Ayudantes digestivos (hidrólisis de lípidos, proteínas y almidón)
<i>Mucor sp.</i>	Renina	Industria de alimentos
<i>Ashbya gossypii</i>	Riboflavina	Industria de alimentos y farmacéutica

<b><i>Claviceps purpurea</i></b>	Alcaloides del ergot	Inducción de contracciones de parto, tratamiento de migraña.
<b><i>Trichoderma polysporum</i></b>	Ciclosporina	Inmunosupresor, prevención de rechazo de órganos trasplantados.
<b><i>Fusarium moniliforme</i></b>	Giberelinas	Hormona de crecimiento de plantas.
<b><i>Fusarium graminearum</i></b>	Zerearalenona	Promotor del crecimiento en ganado.
<b><i>Candida utilis</i></b>	Biomasa Proteína y aminoácidos	Mejoramiento del alimento forrajero.

#### 6.4.1 Características generales

Poseen una membrana nuclear y otros organelos rodeados de membrana así como las demás características que definen a los eucariontes. Dentro del núcleo se encuentran uno o dos núcleos pequeños y varios cromosomas.

Necesitan carbohidratos complejos como fuente de energía ya que no tiene la capacidad de realizar fotosíntesis ni de fijar carbono, por lo tanto son heterótrofos, quimiorganotrofos ya que necesitan de compuestos orgánicos preformados como fuente de energía. La mayoría de los hongos toman sus nutrientes por absorción obteniéndolos como resultado de la degradación de compuestos complejos por las exoenzimas que liberan al medio; realizando una digestión extracelular de estos, lo que les permite utilizar un gran número de sustratos como nutrientes y de fuentes de energía. Debido a esa característica los hongos intervienen de forma activa en los ciclos del carbono y nitrógeno y, por ende, en el reciclaje de nutrientes.

La mayoría son aerobios estrictos porque necesitan para su crecimiento del oxígeno libre como aceptor de electrones. Sin embargo, algunos pueden ser anaerobios facultativos, es decir que pueden utilizar otras moléculas como aceptores de electrones. Adicionalmente, se conoce que un grupo de hongos que vive en el rumen de los herbívoros no posee mitocondria sino hidrogenosomas y son aerobios estrictos.

Son organismos no móviles, pues no poseen flagelos que les permitan el movimiento a excepción de las zoosporas y los planogametos de los hongos acuáticos.

La fase somática o vegetativa (talo) pueden ser unicelular como las levaduras y algunos Chytridiomycota y Oomycota; filamentosa como los mohos cuya fase somática está constituida por las filamentos tubulares denominados hifas y acuyo conjunto se les conoce como micelio; y plasmodial característica de los mohos mucilaginosos *smile molds*, que es una masa de protoplasma multinucleada y móvil, rodeada por una membrana. Algunos tienen la capacidad de ser dimórficos, es decir durante su ciclo de vida presentan dos fenotipos; unicelular (levadura) y filamentoso (micelial). Este es en caso de algunos hongos patógenos humanos.

La pared de estos organismos está constituida principalmente por polisacáridos, proteínas y lípidos. El tipo de polisacárido es característico de cada grupo taxonómico, aunque el principal polisacárido característico es la quitina, variando de su concentración en los diferentes grupos. Otros compuestos como el quitosán son característicos de los Mucorales y las levaduras relacionadas con Ascomycota, los mananos. En el caso de los Oomycota, estos poseen en su pared celulosa y un aminoácido característico, hidroxiprolina [6].

#### **6.4.2 Estructura celular**

Las células fúngicas eucariotas, poseen el núcleo y las estructuras propias de estas células, como son el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi, las mitocondrias y citosqueleto, así como las ribosomas, en un citoplasma limitado por una membrana celular, que posee esteroides, recubierta por una pared rígida características.

La pared celular de los hongos está formada por capas o estratos, constituidos por diversos polímeros polisacáridos fibrilares, como la quitina, la celulosa y por estructuras amorfas como otros glucanos y mananos. La pared de los hongos también contiene proteínas, asociadas a los polisacáridos y lípidos [1].

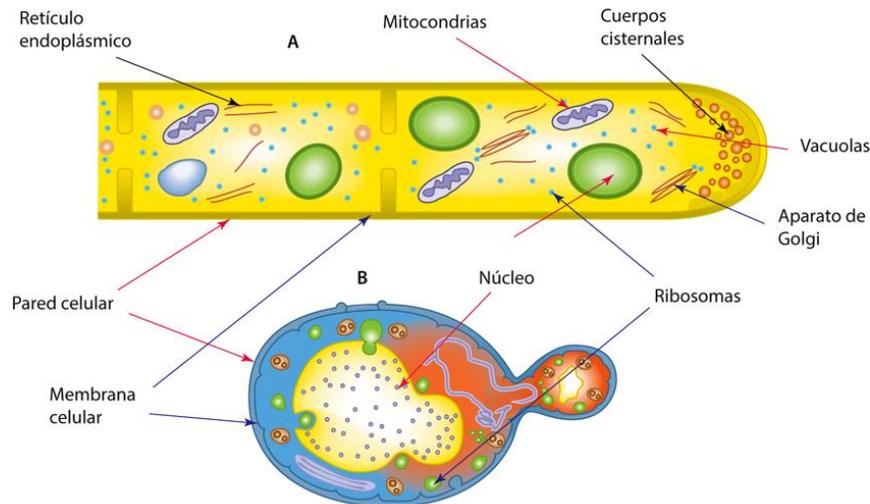


Figura 7. Estructura celular de los hongos.

#### 6.4.3 Cultivos y características de su crecimiento

Los hongos de importancia médica se desarrollan en condiciones aeróbicas, a temperaturas entre 22 y 37 °C, en medios de cultivos ricos en compuestos nitrogenados y carbohidratos y a un pH entre 6.0 y 6.5

Algunas especies patógenas requieren vitaminas, aminoácidos, microelementos y minerales como factores de crecimiento. En medios de cultivos líquidos crecen formando sedimentos algodonosos, mientras que en medios sólidos forman colonias redondeadas adoptando aspectos polvurulentos, granular, cremoso o algodonoso [5].

#### 6.4.4 Formas de reproducción

Su reproducción es de forma tanto sexual y como asexual, aunque la mayoría de los hongos patógenos para el hombre tienen reproducción asexual. Denominándose a las esporas asexuadas, conidias [5].

### 6.4.5 Hongos filamentosos

Los hongos filamentosos son un grupo diverso que usualmente se conoce con el nombre de “mohos”, Es común observarlos en alimentos en descomposición y sobre detritus. Su estructura está descrita como un agregado de hilos ramificados (hifas) las cuales se organizan para dar soporte a los procesos de producción y diseminación de esporas. Las hifas aéreas se extienden sobre el sustrato formando una red denominada micelio, el cual crece para encontrar nutrientes disponibles para procesos metabólicos y fisiológicos del moho. La mayoría de las especies de hongos prosperan en condiciones cálidas con valores cercanos a los 25 °C, ambientes dulces con presencia de azúcares en el medio, condiciones ácidas prefiriendo valores entre 4 y 6 y atmósferas aeróbicas. Estos organismos son utilizados en una gran cantidad de procesos industriales, como producción de enzimas, vitaminas, polisacáridos, pigmentos, lípidos, entre otros. Algunos de estos productos ya se producen de manera comercial y otros son promisorios para la producción biotecnológica. Muchos de estos hongos son capaces de degradar material lignocelulósico y secretar enzimas y otros metabolitos de interés, lo cual los coloca como microorganismos útiles para los procesos biotecnológicos en términos de recuperación de sustancias, que por lo tanto inciden directamente en los costos de purificación. Por otra parte, los metabolitos secundarios también son muy importantes para la salud y nutrición humana y tienen además un gran impacto económico; por lo tanto estos organismos son considerados muy exitosos para procesos fermentativos y principalmente son capaces de llevar a cabo procesos importantes mediante tecnologías de biotransformación

Distintos tipos de hongos mesófilos o termófilos, pueden producir enzimas celulasas para la hidrólisis de material lignocelulósico. Dentro de los diferentes géneros y especies de hongos productores de celulasas se encuentran *Trichoderma*, *Phanerochaeta*, *Sporotrix*, *Alternaria*, *Geotrichum*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *eurospora crassa*, incluyendo además algunos hongos comestibles como: *Lentinula edodes*, *Volvariella volvacea*, *Pleurotus sp.* Estos organismos están ampliamente distribuidos y crecen de manera típica sobre o dentro de materiales sólidos como plantas, granos y animales. Son eficientes en la

producción de enzimas que utilizan para la degradación de los sustratos que les sirven como medio de soporte y fuente de alimento para la sobrevivencia [14].

#### 6.4.5.1 Morfología

Los hongos forman un grupo de organismos heterogéneos en el ámbito morfológico. Unos de son unicelulares y están constituidos por células aisladas, ovales, denominada levaduras. Otros son pluricelulares y están constituidos por células alargadas, cilíndricas, de 3 a 12  $\mu\text{m}$  de diámetro, dispuestas linealmente formando unas estructuras filamentosas denominadas hifas, que pueden alcanzar varios centímetros de longitud.

En algunos hongos filamentosos las hifas se entrecruzan desordenadamente formando matas con aspecto algodonoso de diversos colores que pueden verse enmoheciendo alimentos, pares húmedas y otros lugares en la naturaleza en cuanto alcanzan su tamaño macroscópico.

Los hongos filamentosos se dividen en inferiores o superiores, por las características de las hifas anchas o finas respectivamente.

El micelio se divide en dos partes, la que penetra en los sustratos nutritivos, denominada micelio vegetativo, y la que se dispone en la superficie y contiene las estructuras reproductoras, que constituye el micelio aéreo o reproductor [1].

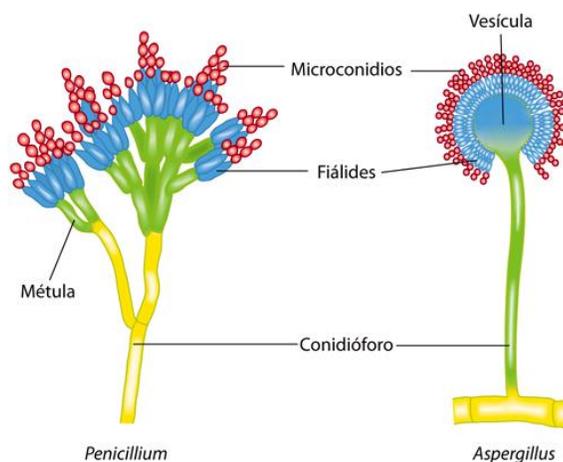


Figura 8. Morfología de hongos filamentosos

## 6.5 Enzimas

Las enzimas son de excepcional importancia para el funcionamiento de los sistemas vivos. Una definición clásica es la siguiente: Una enzima es un catalizador biológico, de naturaleza proteica y extraordinariamente específico. Aunque esta definición ya no es del todo cierta (se ha descubierto ARN con función catalítica), es bastante práctica y muy útil para iniciarse en esta gran área de la Bioquímica. Hay que recordar que un catalizador es un compuesto que acelera una reacción, quedando al final de la misma, sin haber sufrido cambios.

Casi todas las reacciones químicas, que ocurren en un ser vivo, son catalizadas por una enzima diferente; en una sola célula hay cientos de reacciones y por lo tanto hay, para cada una de ellas, una enzima distinta. Sin las enzimas, los procesos que se requieren para la vida no ocurrirían a la velocidad adecuada.

De acuerdo a la definición, las enzimas son proteínas y por lo tanto poseen todas las características de éstas: están formadas por una secuencia de aminoácidos específica y determinada por el código genético, tienen un peso molecular elevado, y requieren tener su conformación nativa para ser funcionales, además de todas las propiedades <sup>[17]</sup>.

Las enzimas son proteínas, polímeros formados por aminoácidos covalentemente unidos entre sí, que catalizan en los organismos una gran variedad de reacciones químicas. La actividad catalítica de las enzimas depende de que mantengan su plegamiento, es decir, su estructura tridimensional. En esta estructura tridimensional se forman cavidades, llamadas “sitio activo”, las cuales muestran afinidad por las moléculas específicas (sustratos) que se convertirán en productos. La combinación de grupos funcionales químicos presentes en estas cavidades genera un conjunto de interacciones covalentes y no covalentes entre la proteína y el sustrato, que hacen que la conversión de éste en un producto se vea favorecida. Como cualquier catalizador, al finalizar la transformación del sustrato y liberarse el producto del sitio activo, la enzima regresa a su estado original y puede involucrarse en un nuevo ciclo de catálisis. Las enzimas pueden utilizarse también fuera de las células: desde

hace milenios el ser humano las ha aprovechado. Sus aplicaciones más antiguas tienen que ver con la alimentación, por ejemplo, la producción de pan y queso [16].

En la figura 9 muestran la forma característica de representar una reacción catalizada por una enzima, se puede apreciar que la ecuación consta en realidad de dos reacciones, en el extremo izquierdo se observa que la enzima (E) reacciona con algún compuesto al cual se le llama **sustrato** (S), la enzima y el sustrato forman el complejo **enzima-sustrato producto**, el cual puede seguir dos caminos: regenerar E y S, o bien romperse en la enzima libre y el (P).



**Figura 9. Reacción catalizadora.**

También hay que recalcar que, al final, la enzima no ha sufrido ninguna modificación química (es un catalizador), por lo que queda habilitada para iniciar un ciclo nuevo: reaccionar con otra molécula de S y convertirla en P y así sucesivamente. Una sola molécula de enzima puede transformar un número muy alto de moléculas de sustrato [17].

### **6.5.1 Clasificación de las enzimas**

Las enzimas se clasifican en seis grupos diferentes, dependiendo del tipo de reacción que pueden catalizar:

- EC 1. Oxidorreductasas: catalizan reacciones de oxidorreducción. Precisan la colaboración de las coenzimas de oxidorreducción (NAD<sup>+</sup>, NADP<sup>+</sup>, FAD) que aceptan o ceden electrones correspondientes.
- EC 2. Transferasas: promueven transferencias de distintos grupos químicos. Suelen actuar en procesos de interconversión de monosacáridos, aminoácidos, etc.
- EC 3. Hidrolasas: llevan a cabo la ruptura de enlaces químicos con la introducción de una molécula de agua.

- EC 4. Liasas: catalizan eliminaciones de un grupo o adiciones de un grupo a un doble enlace, u otras rupturas que implican un reordenamiento electrónico.
- EC 5. Isomerasas: catalizan las isomerizaciones de distintos compuestos. Suelen actuar en procesos de interconversión.
- EC 6. Ligasas: promueven la unión de dos moléculas por mediación de ATP o de un compuesto similar.

De estas enzimas, las hidrolasas son de las de mayor aplicación en la industria, pues en la actualidad, representan casi el 80% de las ventas generadas en el mercado mundial de enzimas, las cuales son empleadas principalmente como enzimas de grado técnico, o como enzimas para alimentos. El grupo de las hidrolasas está constituido por una amplia gama de enzimas, algunas de ellas, son capaces de romper los enlaces principales que constituyen a los residuos agroindustriales. La producción de enzimas ha tenido mucho auge en las últimas décadas.

Se ha estudiado la producción de diversas enzimas de interés biotecnológico haciendo uso de residuos agroindustriales tales como:

- Proteasas, utilizando salvado de arroz y de trigo, cascarilla de arroz, de frijol y de lentejas, pasta de coco y de ajonjolí, etc.
- Lipasas, utilizando pasta de ajonjolí y de oliva, harina de almendra, de mostaza y de coco, cascarilla de arroz, bagazo de caña, salvado de trigo y de arroz, etc.
- Fitasas, utilizando residuos de canola, pasta de coco, de ajonjolí, de maní y de oliva, torta de algodón, de palma y de mostaza, salvado de trigo, harina de frijol negro, etc.
- Amilasas, utilizando salvado de trigo, de maíz y de arroz, cascarilla de frijol, harina de cebada, etc.
- Celulasas, utilizando residuos de plátano, paja de arroz y de trigo, residuos de maíz, cascarilla de arroz, etc.

- Xilanasas, utilizando paja y salvado de diferentes cereales, bagazo de caña y de yuca, residuos del procesamiento de diversas frutas, etc.
- Pectinasas, utilizando salvado de trigo, de soja, pulpa de manzana y de remolacha, orujo de oliva y de fresa, pulpa de café, cascarilla de cacao, cáscara de limón y naranja, etc.
- Feruloil esterasas, utilizando salvado de trigo y de maíz, pulpa de remolacha azucarera, paja de trigo, bagazo de caña, mazorcas de maíz, etc. [15].

### 6.5.2 Enzimas industriales

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.

No obstante que las enzimas se han utilizado desde hace varios siglos en industrias como la cervecera, láctea, de panificación o peletera, es hasta finales del siglo XIX y principios del XX que se establece su naturaleza o mecanismo de acción. De hecho, aun cuando la compañía Röhm (Alemania) utilizó por primera vez en 1914 la enzima tripsina en la industria de detergentes, la naturaleza proteica de las enzimas fue probada hasta 1926 por Sumner. Más aún, se considera que su producción por fermentación a gran escala la inició formalmente la compañía Novo Industri (actualmente Novozymes) en la primera parte de los años sesenta, al producir una glucoamilasa útil en la transformación de almidón en glucosa.

Es indiscutible el interés que ha despertado durante las últimas décadas el uso de estos exquisitos catalizadores en diferentes procesos industriales. En gran medida, gracias a los grandes avances que ha tenido la biotecnología en áreas como la microbiología industrial, la biología molecular, la ingeniería de proteínas y la

ingeniería enzimática. Estas técnicas han centrado su atención en la producción eficiente de biocatalizadores que al mismo tiempo que conserven su alta quimio-, regio- y estereoselectividad, mejoren su estabilidad, puedan ser reutilizadas y sean compatibles con tecnologías sustentables y procesos ambientalmente más limpios [5].

Los procesos industriales que involucran la transformación de sustratos mediante el tratamiento químico han migrado durante las últimas décadas hacia el uso de biocatalizadores que generen mayor velocidad de proceso con menor impacto negativo en el ambiente. En la actualidad las enzimas o biocatalizadores pueden ser clasificados en dos grandes categorías según su actividad y los volúmenes de producción. En la primera se ubican aquellas que tienen gran actividad biológica y por lo tanto sus volúmenes de producción son pequeños, como por ejemplo se pueden mencionar las enzimas utilizadas en la industria farmacéutica y de análisis clínico. En el segundo se encuentran las enzimas que cuentan con menor actividad biológica y sus volúmenes de producción y aplicación mayores que las anteriores, aunque la tendencia resultante de los procesos de investigación y desarrollo en este campo se dirige hacia la reducción de sus volúmenes aumentando su actividad por técnicas como la ingeniería genética y enzimática. Es precisamente en este segundo grupo donde se encuentran las enzimas con mayor aplicación en diferentes procesos industriales, como la obtención de tratamiento de alimentos, bebidas, textiles, curtiembres, desechos biodegradables, remediación ambiental, etc. [4].

### **6.5.3 Concentración de la enzima y el sustrato**

Algunas enzimas permanecen libres en condiciones bajas de sustrato y no se alcanza la máxima velocidad. Cuando el sustrato se encuentra en exceso, toda la enzima se transforma en enzima sustrato (ES) y la reacción se realiza a su máxima velocidad. Finalmente la reacción entra en equilibrio cuando no ocurren más cambios. Sin embargo si el producto (P) se quita después de que se produjo, impedirá el establecimiento del equilibrio; por lo tanto el sustrato (S) se seguirá convirtiendo en producto (P).

En la figura 10 se observa el efecto de la concentración del sustrato sobre el índice de la actividad enzimática. El índice aumenta rápidamente con incremento inicial en el sustrato; incrementos posteriores en las concentraciones del sustrato no tienen efecto sobre el índice; ya que este se vuelve independiente de la concentración del sustrato, el mismo efecto ocurre con un incremento de la concentración de la enzima, como se aprecia en la figura 11.

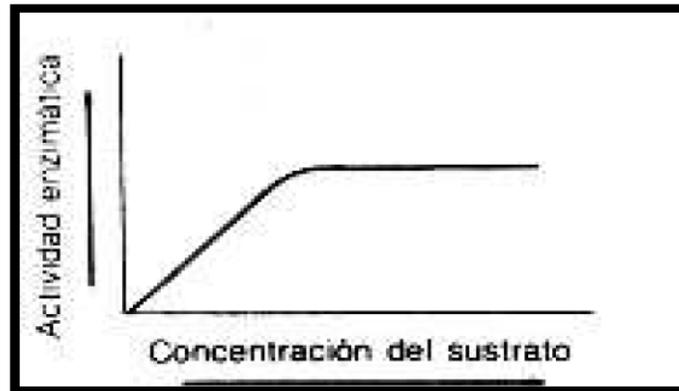


Figura 10. Efecto de la concentración del sustrato sobre el índice de la actividad enzimática.

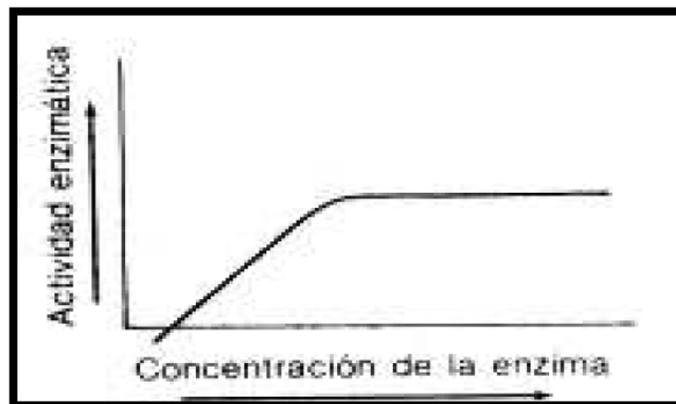


Figura 11. Efecto de la concentración de enzimas en la actividad enzimática.

#### 6.5.4 Temperatura

Cada enzima tiene una temperatura óptima a la que actúa con su máxima eficacia. Debido a que las enzimas son proteínas, los valores de temperatura óptima dependen del pH y la fuerza iónica. Si la temperatura se incrementa más allá de la temperatura óptima, la actividad enzimática desciende bruscamente. La

temperatura óptima de una enzima es normalmente cerca de la temperatura normal del organismo del que procede [1].

### 6.5.5 Efecto del pH.

La mayoría de las enzimas presenta un pH óptimo para el cual su actividad es máxima, por encima o por debajo de ese pH la actividad disminuye bruscamente como podemos observar en el figura 12. Este efecto se debe a que, al ser las enzimas de naturaleza proteica, al igual que otras proteínas, se desnaturalizan y pierden su actividad si el pH varía más allá de unos límites estrechos.

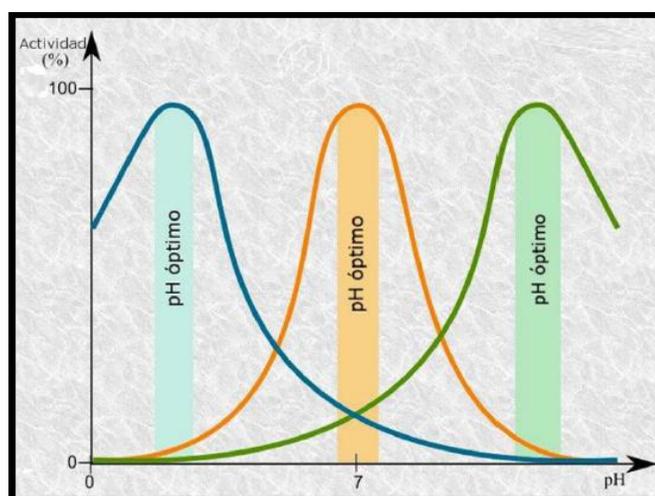


Figura 12. pH óptimo en el cual la actividad enzimática es máxima.

En la mayoría de los casos el pH óptimo está próximo a la neutralidad, en consonancia con el pH intracelular, pero existen enzimas con pH óptimo muy diverso según sea el pH del medio en el que habitualmente actúan (las enzimas proteolíticas del jugo gástrico tienen pHs óptimos próximos a 2 ya que este es el pH de dicho jugo [24]).

## 6.6 Fermentación

Desde el punto de vista biotecnológico, la fermentación se entiende como el proceso en que los microorganismos producen biomasa y metabolitos a partir de la utilización de sustancias orgánicas, en ausencia o presencia de oxígeno. La descomposición de los sustratos es llevada a cabo por enzimas producidas para tal fin por los microorganismos. Desde el enfoque bioquímico, la fermentación es

definida como un conjunto de reacciones catabólicas que producen adenosín trifosfato (ATP), en las cuales los compuestos orgánicos sirven tanto de donadores primarios como de aceptores finales de electrones; produciendo el ATP por fosforilación a nivel sustrato. En palabras comunes, es un proceso intracelular, catabólico de oxidación incompleta, siendo el producto final un compuesto orgánico. Las fermentaciones pueden clasificarse como naturales o artificiales, cuando hay o no la intervención del hombre en ellas. Así mismo, según el tipo de producto que se desea obtener, según la presencia o ausencia de oxígeno, o según el estado del sustrato. Es este último aspecto el que permite clasificarlas en fermentaciones en estado líquido y fermentaciones en estado sólido [26].

### **6.6.1 Fermentación sumergida**

La fermentación en estado líquido o fermentación sumergida (FEL) es aquella en la cual hay por lo menos la misma concentración de agua y de sustrato sólido (nutrientes) en el proceso, es decir que hay una solución de los nutrientes. Es el tipo de fermentación más utilizado en la industria debido a que es sencillo, pueden controlarse muchas más variables que en la fermentación en estado sólido (FES) y el producto final es mucho más fácil de recuperar. En ella los microorganismos se desarrollan flotando en el medio de cultivo y en el caso de los hongos miceliales, éstos pueden formar pequeñas esferas de micelio denominadas “pellets” cuando hay agitación, de otra forma, crecen en la superficie. En la FEL el desarrollo del microorganismo se presenta de una forma típica, dando origen a una fase de latencia, una de crecimiento (fase logarítmica), una fase estacionaria y la última, la fase de muerte. La FEL a su vez puede dividirse en continua, por lote y alimentada, según la entrada y salida tanto del sustrato como del producto, respectivamente [26].

## **7. METODOLOGÍA**

### **7.1 Reactivación de hongos.**

#### **7.1.1 Cultivo de cepas.**

Se aislaron 9 cepas diferentes hongos filamentosos de muestras de lesiones de plantas y muestras de suelo de la zona semiárida de Coahuila. Estas cepas fueron purificadas y conservadas para la colección de hongos del Departamento de Ciencia y Tecnología de alimentos de la UAAAN.

Posteriormente las cepas fueron reactivadas utilizando como medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA). El procedimiento de reactivación fue llevado a cabo de la siguiente manera: primeramente, se esterilizó en la autoclave el agar PDA por 15 min a 121°C. Posteriormente, en las cajas Petri estériles se vaciaron 20 mL de (PDA) y 100 µL de cada microorganismo utilizando una campana de aire estéril (Scorpion Scientific campana de flujo laminar). Finalmente se dejaron solidificar las cajas y se incubaron (incubadora RIOSSA modelo E-71) a 30°C por 5 días. Esta actividad se realizó por triplicado por cada cepa.

#### **7.1.2 Crecimiento de hongos**

Posteriormente al crecimiento y desarrollo del hongo en la caja Petri, se tomó una fracción pequeña de agar con muestra utilizando un sacabocados previamente esterilizado y se sembró en una nueva caja Petri con PDA; se colocó una fracción en la parte central de la caja y otras tres formando un triángulo en otra caja Petri, esto se realizó por triplicado con la finalidad de observar el desarrollo del hongo.

#### **7.1.3 Identificación macro y microscópica**

Los hongos se identificaron de primera manera macroscópica en base a su morfología, textura y velocidad de crecimiento en las cajas Petri.

Se observaron los micelios y esporas mediante la técnica de azul de algodón.

#### **7.1.4 Tinción con lactofenol (azul de algodón)**

Primeramente se colocó una gota de azul de algodón en un portaobjeto y se tomó una muestra del hongo con la ayuda de un asa previamente esterilizada, quemando

el asa para evitar una contaminación del cultivo, y luego se colocó sobre la gota de lactofenol seguido del cubreobjetos.

Posteriormente se procedió a observar en el microscopio (LABOMET CxL) en el objetivo 100x y la imagen del hongo fue capturada mediante una fotografía.

### **7.1.5 Preservación del microorganismo en glicerol-leche descremada.**

Se llevó a cabo la conservación de las cepas mediante el siguiente procedimiento. Primeramente se preparó una solución con glicerol (10%) y leche descremada (Svelty), y se homogenizó en 100 mL de agua destilada, se esterilizó a 121 °C (15 psi) durante 15 min. Se dejó enfriar y se tomó 10 mL de la mezcla preparada y se agregó a las cajas Petri que contenían los microorganismos y con ayuda de una varilla de vidrio en forma de L se realizó la técnica de barrido para el desprendimiento de las colonias, se tomaron 2000 µL de la caja Petri y se colocaron en tubos Eppendorf previamente esterilizados (121 °C durante 15 min) y se almacenaron a temperatura de congelación (-20) para conservación.

## **7.2 Evaluación de actividad celulítica**

### **7.2.1 Actividad celulítica a 48 y 96 horas.**

Para medir la actividad celulítica de las cepas se dispusieron 150 ml de medio de cultivo: 0.25 g de carboximetilcelulosa (CMC), 0.3825 g de Nitrato de Sodio ( $\text{NaNO}_3$ ), 0.076 g de Sulfato de Magnesio ( $\text{MgSO}_4$ ), 0.152 g de fosfato monopotásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) y 0.076 g de cloruro de potasio (KCl).

Se homogenizó y esterilizó la solución a 121°C (15 psi) por 15 minutos, se enfrió y se vaciaron en tres recipientes de vidrio 50 mL en cada uno y se tomó una porción de los hongos sembrados previamente en las cajas Petri y se inocularon en los recipientes correspondientes. Posteriormente fueron incubados en un agitador incubador apilable con refrigeración (NNVA 44 incubator shaker series) a una velocidad de agitación de 200 rpm con monitoreo continuo de crecimiento de los hongos cada 48 horas y tomando muestras por triplicado del extracto enzimático.

### **7.2.2 Buffer**

Se prepararon 800 ml de agua destilada, se añadieron 24.087 g de citrato de sodio dihidrato a la solución, 3.471 g de ácido cítrico se ajustó a un pH de 4.5 utilizando HCl aforando con agua destilada hasta un volumen de 1 L.

### **7.2.3 Determinación de proteína.**

La concentración de proteína se determinó utilizando el método de Bradford con estándar de albúmina; 100 µL de extracto enzimático más 100 µL de colorante diluido 1:10 en un placa y le leyó a 546 nm en un espectrofotómetro. Todos los ensayos se realizaron por triplicado para cada extracto enzimático.

### **7.2.4 Ensayos de enzimas.**

Las actividades enzimáticas se representan como sustrato U / L. La concentración de proteína se determinó utilizando. Todos los ensayos se realizaron por triplicado para cada medio de extracción.

#### **7.2.4.1 Actividad enzimática la de amilasa**

La actividad de la enzima amilasa se midió utilizando el método del reactivo ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) descrito por Miller. Se agregaron 10 µL del extracto enzimático crudo a 90 µL de almidón al 10% en agua destilada y se incubaron a 50°C durante 60 min, posteriormente se adicionaron 100 µL de DNS para detener la reacción. La solución se hirvió durante 10 min y luego se colocó en hielo durante 5 min. La cantidad de azúcar reductor se determinó utilizando el método DNS con maltosa como estándar, midiendo la absorbancia a 546 nm en un espectrofotómetro (BIOBASE EL-10A); 1 U de amilasa se definió como la cantidad de enzima requerida para la liberación de 1 µmol de azúcar reductor en equivalentes de maltosa por minuto.

#### **7.2.4.2 Actividad enzimática la de celulasa**

La celulasa se midió utilizando (CMC) como sustrato. Se agregaron 10 µL de solución del extracto del extracto enzimático crudo en 90 µL de solución de CMC al 1% y se hicieron reaccionar a 50°C durante 60 min, y luego se midieron usando el ensayo de DNS a 546 nm con glucosa como estándar; 1U de CMCasa se definió

como la cantidad de enzima requerida para la liberación de 1  $\mu\text{mol}$  de azúcar reductor en equivalentes de glucosa por minuto en las condiciones de ensayo descritas anteriormente.

#### **7.2.4.3 Actividad enzimática la de celulasa**

La actividad de la xilanasas se estimó utilizando una suspensión del 1% (p / v) de Xilano de madera de haya como sustrato. Una mezcla compuesta de 90  $\mu\text{l}$  de xilano al 3%. Y 10  $\mu\text{l}$  de extracto enzimático crudo se hizo reaccionar a 40°C durante 30 min y la cantidad de azúcar reductor se determinó utilizando el método DNS a 546 nm con D-xilosa como estándar. Las actividades enzimáticas se expresan en unidades, donde 1 U se define como la cantidad de enzima requerida para la producción de 1  $\mu\text{mol}$  de producto / min, y la productividad se presenta como U / L del extracto enzimático crudo.

### **7.3 Cultivo de cepa seleccionada.**

Posterior a los datos arrojados por el experimento descrito anteriormente en base a los datos obtenidos se seleccionó la cepa con mayor producción celulítica. Se cultivó en cajas Petri, se preparó el medio con agar papa dextrosa (PDA), se esterilizó en autoclave por 15 min a 121°C, en las cajas se mezclaron 20 mL de (PDA) y 100  $\mu\text{L}$  de cada microorganismo, se solidificó y se incubó a 30°C por 5 días. Este proceso se hizo por triplicado.

#### **7.3.1 Conteo de esporas.**

Pasados los 5 días y el microorganismo ya esporulado se agregaron 10 mL de tween 80 a la caja Petri, se tomaron 2 mL y se hizo una dilución 2:400, se tomaron 20  $\mu\text{L}$  y se llenó la cámara de Neubauer y se cubrió con un cubreobjetos para el conteo. Se observó en un microscopio con el objetivo 40x, las esporas presentes se contaron en cuadros formando una "Z", contando un total de 13 cuadros, cinco arriba y cinco abajo y tres de la diagonal que cruza el centro uniendo las líneas paralelas.

Se determinó el número de esporas por ml utilizando la fórmula a continuación:

$$\frac{\text{celulas}}{\text{mL}} = \text{promedio} * \text{dilucion} * 25 * 10^4$$

El resultado obtenido de la fórmula es lo que se inoculara en cada frasco para su fermentación.

### 7.3.2 Fermentación en medio líquido.

Para la fermentación se prepararon 900 mL de cultivo para 18 recipientes de vidrio donde se llevaría a cabo la fermentación por 5 días, manejando 3 diferentes concentraciones de sustrato de CMC al 1%, 1.5% y 2% , tomando muestras a las 0, 24, 48, 72, 96, 120 horas; incubando en agitador a 200 rpm.

Las concentraciones y cantidades utilizadas son descritas en el cuadro 2:

**Cuadro 2. Tratamientos**

Aunado a eso se agregó agua destilada para preparar el medio de cultivo además de 300 µL del cultivo, que fue el resultado de la fórmula antes descrita; se prepararon 50 mL de este medio para cada frasco de vidrios y fueron puestos a fermentación en un agitador incubador.

### 7.3.3 Determinación de biomasa

	CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO		
	1%	1.5%	2%
CMC	0.5 g	0.75 g	1 g
Nitrato de Sodio (NaNO <sub>3</sub> )	0.765 g	1.1475 g	1.53 g
Sulfato de Magnesio (MgSO <sub>4</sub> )	0.152 g	0.228 g	0.304 g
Fosfato monopotásico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0.304 g	0.456 g	0.608 g
Cloruro de potasio (KCl)	0.152 g	0.228 g	0.304 g

Para la determinación de biomasa de los hongos en fermentación líquida se realizó por diferencia de peso de la muestra fresca y la muestra seca.

Se tomaron muestras cada 24 horas y fueron colocadas en papel filtro previamente secadas a 50 °C por 24 horas. Las muestras fueron secadas en una estufa por 24 horas a 50 °C y pesadas, después del tiempo mencionado, en una balanza analítica.

### **7.3.4 Determinación de sustrato**

Para esta parte del experimento se midieron los azúcares totales presentes en los extractos enzimáticos.

Primeramente se hizo una solución madre, se diluyó 50 µL de extracto enzimático tomado de los frascos por cada concentración, en 450 µL de agua destilada; posterior a eso, en tubos Eppendorf esterilizados se vertieron 250 µL de la dilución, 250 µL de fenol al 5% y un ml de ácido sulfúrico, todo esto en un baño de hielo; esto fue realizado por triplicado por cada extracto enzimático de cada una de las tres concentraciones de sustrato. Después es llevado a ebullición por 10 minutos y después se dejó enfriar para medir a 480 nm en un espectrofotómetro (BIOBASE-EL10A Elisa Reader).

### **7.3.5 Determinación de proteínas y ensayo enzimático**

Para la determinación de las pruebas de proteínas y la evaluación de la actividad enzimática de la amilasa, celulasa y xilanasas se realizó por la misma metodología anteriormente descrita.

## **8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **8.1 Reactivación de hongos e identificación macro y microscópica**

Al inicio del experimento se asilaron 9 cepas de diferentes hongos que forman parte de la colección de cepas, para identificar cuáles eran las que aún tenían una vida de uso, mostraron un crecimiento y fueron identificados como H1, H4, H6, H8, H9, MZ, CH, C3, C+.

Posterior a su desarrollo fueron observados en el microscopio con objetivo de 100x.

Estas cepas presentaron características macroscópicas muy similares, aunque en la observación macroscópica la forma en la que se presentó el crecimiento fue muy diferente desde el punto de vista de colores ya que como se puede observar en la figura 13 en el inciso A) las esporas se tiene un color café claro y que al realizar la observación al microscopio se identifican esporas muy pequeñas que hacen este efecto.

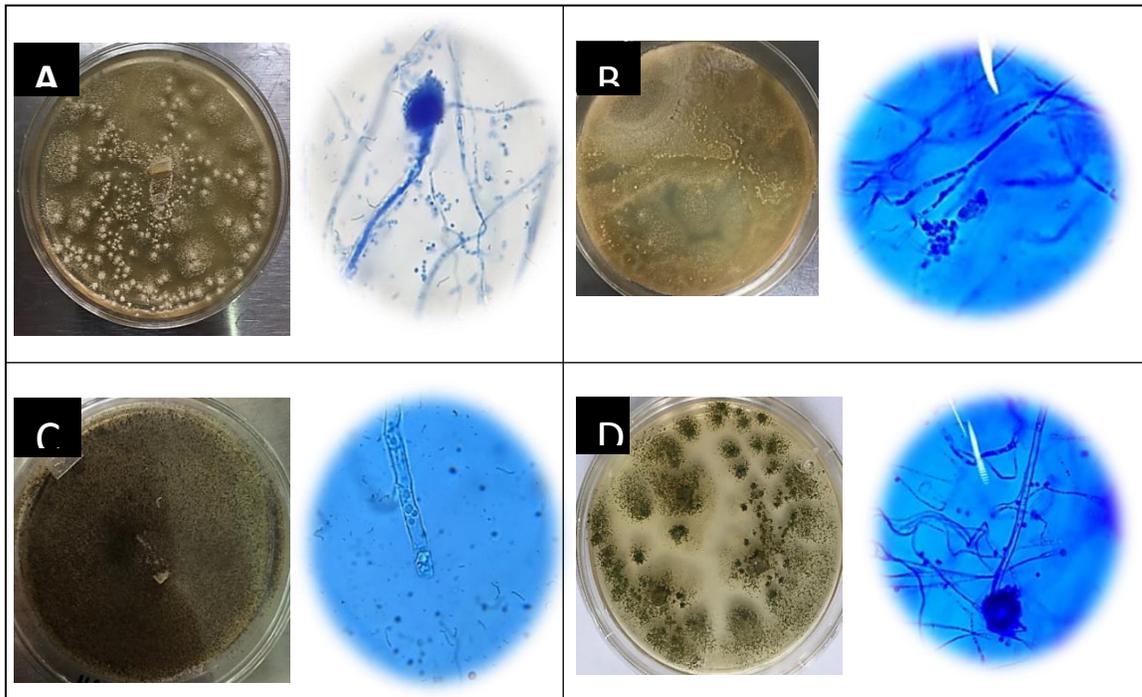
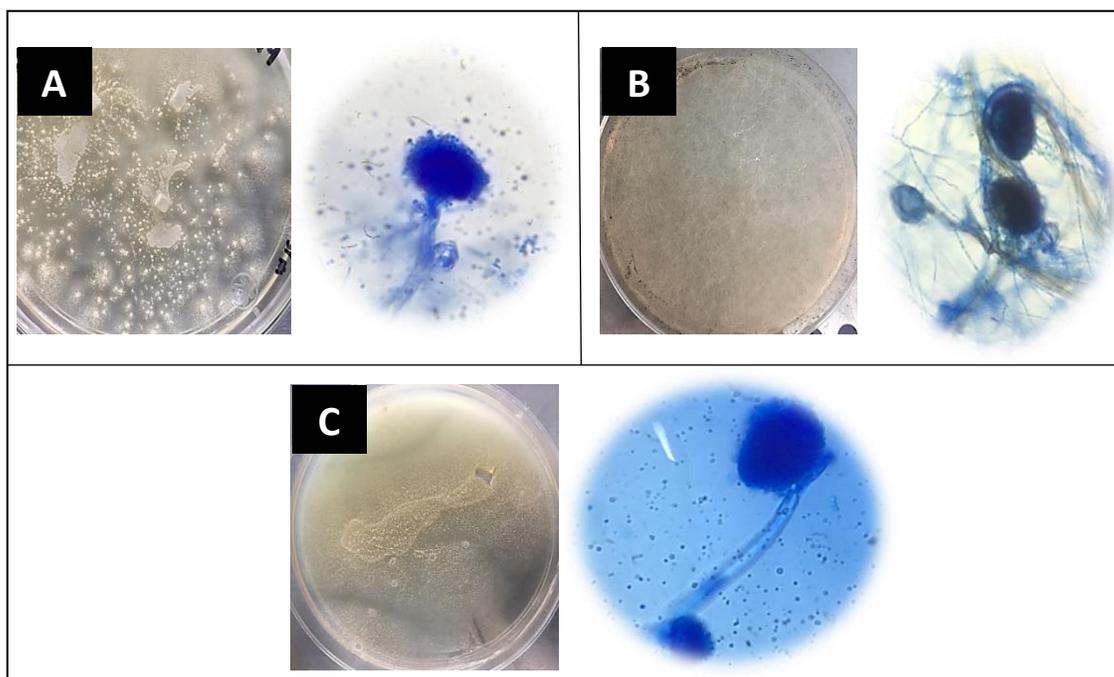


Figura 13. Comparación entre identificación macroscópica y microscópica. A) Cepa H1, B) Cepa Mz, C) Cepa H4, D) Cepa C+.

El crecimiento de estas cepas fue muy distinto entre ellas, sin embargo compartieron características similares macroscópicamente como se puede observar en la figura 14. En el caso de la cepa identificada como CH se presentó una coloración blanquecina de las esporas y en la observación en el microscopio. En el inciso B) se observa un abundante crecimiento de masa micelial de forma algodonosa de color amarillento, microscópicamente se puede observar conidias globosas negras con un micelio café. En la cepa H8 presento un cultivo polvoriento con colocaciones en tono café, se observa un desarrollo semejante a las anteriores cepas.



**Figura 14. Comparación entre identificación macroscópica y microscópica. A) cepa CH, B) cepa C3, C) cepa H8.**

En la figura 15 se observa que el cultivo de la cepa H6 presento una coloración de tonalidades café oscuro y blanco, con una apariencia un poco algodonosa, del punto de vista microscópico se observa el crecimiento mayormente del micelio que de las conidias. Por otro lado la formación de colonias de la cepa H9 se aprecia polvorienta y de color blanco verdoso, la formación del micelio de igual forma es mayor.

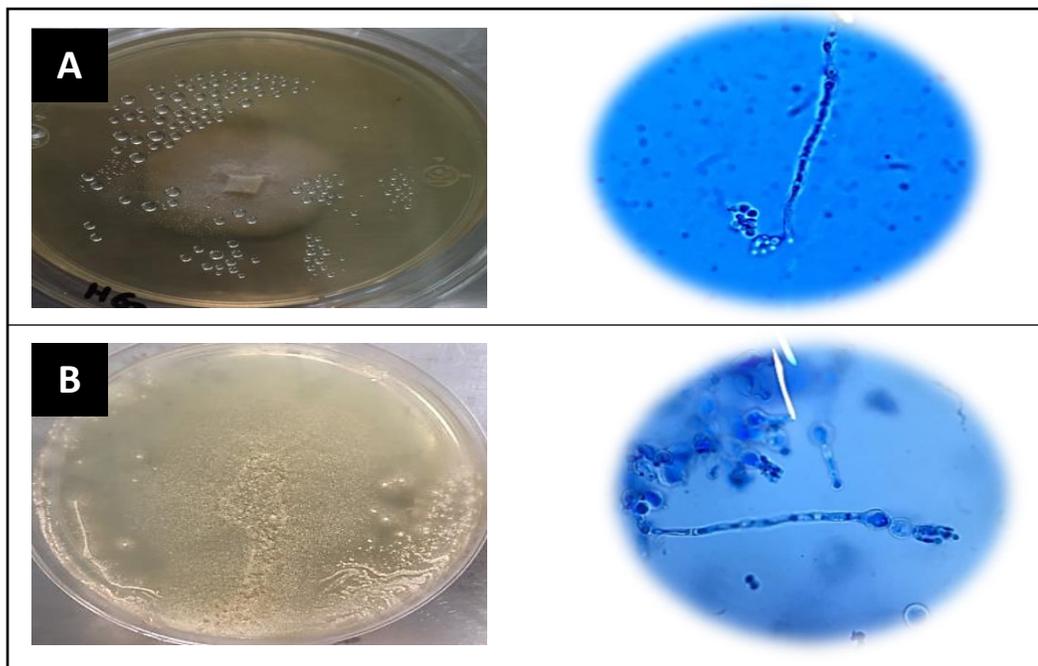


Figura 15. Comparación entre identificación macroscópica y microscópica. A) cepa H6, B) cepa H9.

## 8.2 Actividad enzimática de las nueve cepas.

Se midió la actividad enzimática de tres enzimas amilasa, celulasa y xilanasa. El estudio se realizó a nueve hongos filamentosos clasificados como celololitos diferentes.

### 8.2.1 Actividad enzimática amilasa.

En el figura 16 se observa que en el ensayo de evaluación de la actividad amilasa los hongos clasificados como H8 y H6 presentaron la mayor actividad 600 U/L y 700 U/L respectivamente, esto se presentó a las 48 horas, sin embargo a las 96 horas sus niveles disminuyeron considerablemente determinando valores en el caso de hongo H8 de 124 U/L y en el H6 alrededor de las 28 U/L. Aun con esta disminución en la actividad, estas dos cepas muestran actividad considerable comparada con otros estudios donde han mostrado resultados de hasta 128 U/L de amilasa en hongos filamentosos como *Aspergillus*, sin embargo hay que tomar en cuenta la influencia de pH y temperatura para el desarrollo enzimático <sup>[9]</sup>. Además, Se demostró que la producción óptima de amilasas se obtiene durante la fase exponencial de crecimiento con bajas concentraciones de CO<sub>2</sub> (de 2% a 5%) <sup>[23]</sup>.

La producción de Amilasas aumento a las 96 h en la cepa H9 llegando cerca de las 700 U/L y en cepas como H4, CH y MZ el aumento fue poco más del doble comparados con los valores obtenidos a las 48 h.

El hongo identificado como C+ fue uno de los que menos actividad presento, a las 48 horas tuvo una producción de 98 U/L pero a las 96 horas no hubo actividad.

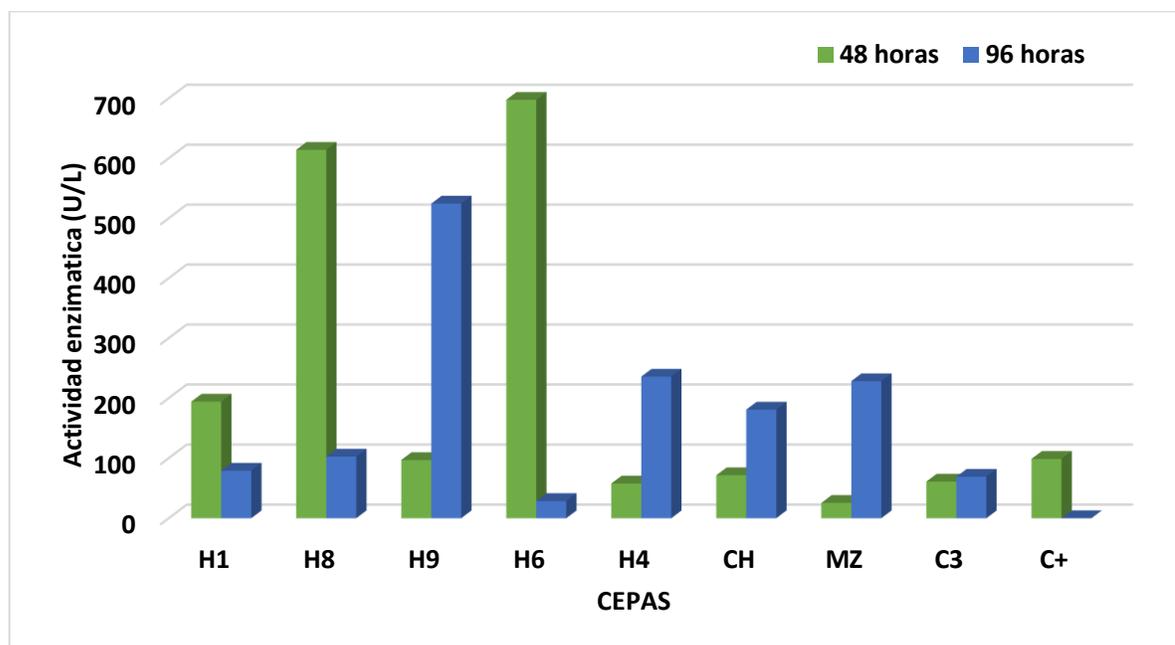


Figura 16. Actividad enzimática de la amilasa.

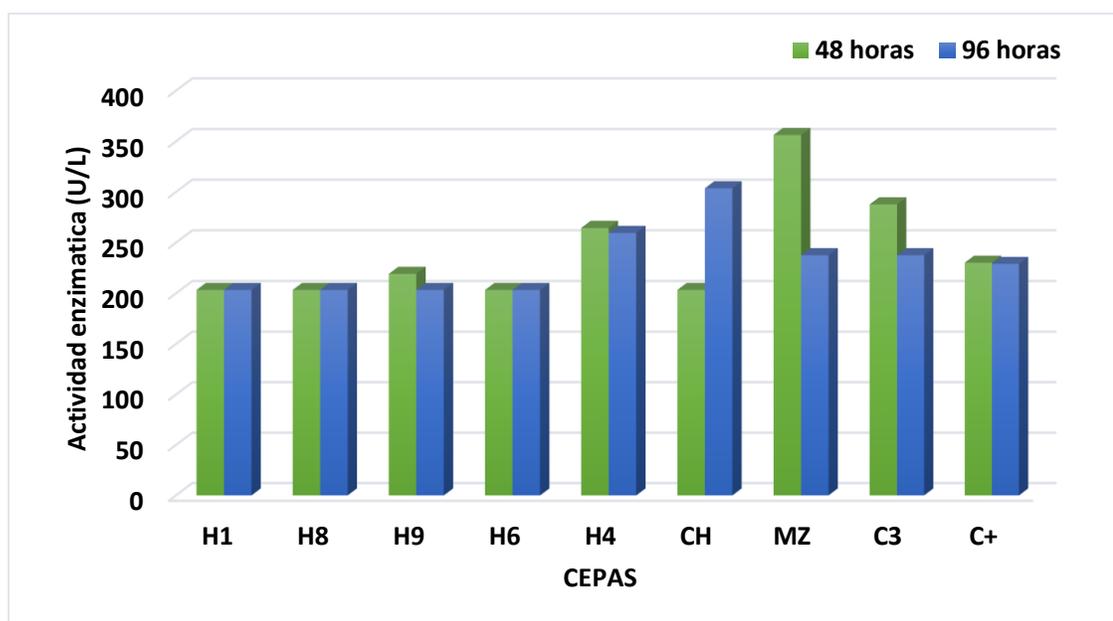
### 8.2.3 Actividad enzimática de la celulolítica

En el estudio de producción de la enzima celulasa los hongos que tuvieron una actividad fueron los hongos identificados como MZ y CH, en caso el hongo CH aumento un tercio de producción de las 48 a las 96 horas de tratamiento, por el contrario del hongo del MZ que su mayor actividad se registró a las 48 horas y disminuyo con el paso de los días. En la figura 17 se puede observar como la producción de la enzima fue de 356 U/L en hongo MZ y 304 U/L el CH respectivamente. Este comportamiento se debe a que el hongo pasa por tres fases: fase logarítmica, estacionaria y de declinación en la fase logarítmica empieza el crecimiento acelerado, en la fase estacionaria cuando comienza a disminuir el crecimiento, debido a que el sustrato ha sido metabolizado o empieza la formación de sustancias tóxicas para el microorganismo y el crecimiento decae y por lo tanto

la producción de sus metabolitos. Los datos obtenidos son mayores a los que son mostrados en algunos trabajos como donde utilizan como variable de estudio agitación-aeración y presenta el mejor resultado al cabo de 7 días de iniciada la experimentación, con una actividad enzimática de 78.70 U/L [14].

Figura 17. Actividad enzimática de la celulasa.

### 8.2.4 Actividad enzimática de la xilanasa



En el análisis realizado para la producción de la enzima xilanasa que se observa en la figura 18, no todos los hongos mostraron capacidad productora de esta enzima, ya que de los nueve hongos que fueron sometidos a tratamiento cinco de ellos no presentaron actividad. A las 48 h los hongos que no habían mostrado alta producción en las enzimas amilasa y celulasa, en este caso fueron los que presentaron actividad xilanasas. El H1 fue él que tuvo una mayor producción 4376 U/L y el H8 2034 U/L, esta actividad se presentó en las primeras 48 horas, sin embargo a las 96 horas ya no hubo actividad alguna. Los hongos que le siguen son el CH con 1105 U/L y el MZ con 973 U/L a las 96 horas. A pesar de la xilanasas es una de las enzimas mayormente producidas por los hongos filamentosos, es especial por el *Aspergillus niger*, en este caso no hubo mucha presencia de las mismas en los diferentes cepas analizadas, esto se puede deber al sustrato de CMC utilizado para su fermentación.

La variación de la actividad enzimática de cada hongo se debe a que son diferentes hongos filamentosos y no producen y degradan las mismas enzimas; sin embargo se presentaron positivos en el área de producción celulítica en comparación con otros estudios.

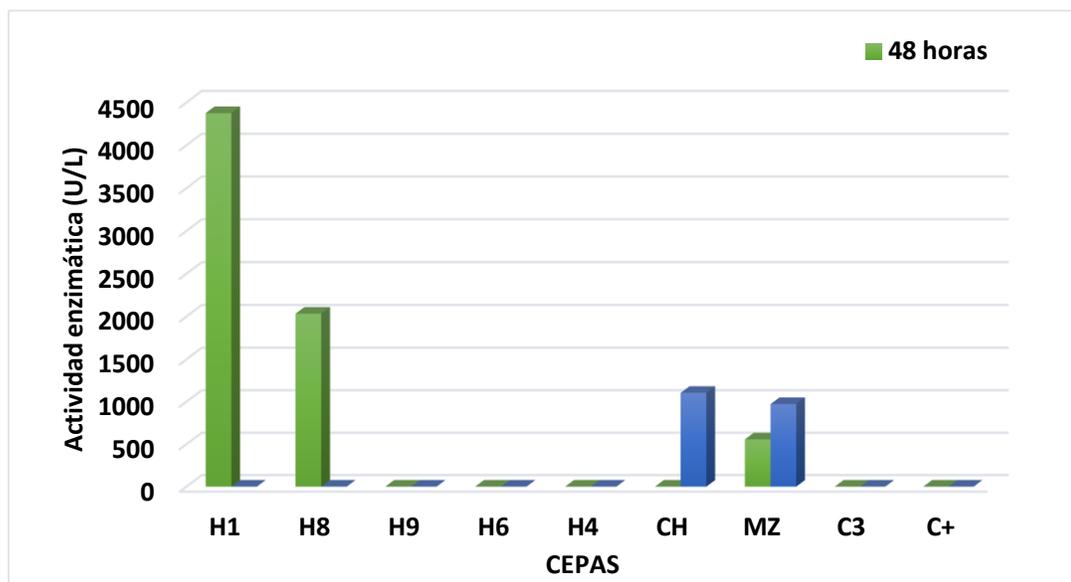


Figura 18. Actividad enzimática de la xilanasa.

### 8.2.5 Análisis de contenido proteico

El contenido de proteínas fue analizado en los nueve hongos, los valores más altos registrados fueron los de los hongos H6 y MZ con una producción de 5.477 mg/ml y 5.509 mg/ml respectivamente, pero podemos observar en la figura 19 que en su mayoría la producción mayor fue en la 96 horas de tratamiento, excepto en hongo C+ que fue a las 48 horas sin embargo la diferencia no fue significativa. Esto concuerda con el crecimiento microbiano por lo que a mayor tiempo de fermentación mayor producción de biomasa.

Un estudio realizado en el 2014 por Cortés Sánchez y col., presentaron valores mayores a nuestros resultados en condiciones con una agitación de 180rpm y 30°C en los medios Litmus ( $14.95 \pm 0.5$  mg/mL) y leche Svelty sin grasa ( $17.6 \pm 0.5$  mg/mL), los que presentaron las mayores proporciones de proteína a las 72h y 48h de cultivo respectivamente, por lo podemos suponer que el sustrato, velocidad de agitación utilizadas en este estudio no eran los convenientes para tener un producción proteica alta [8].

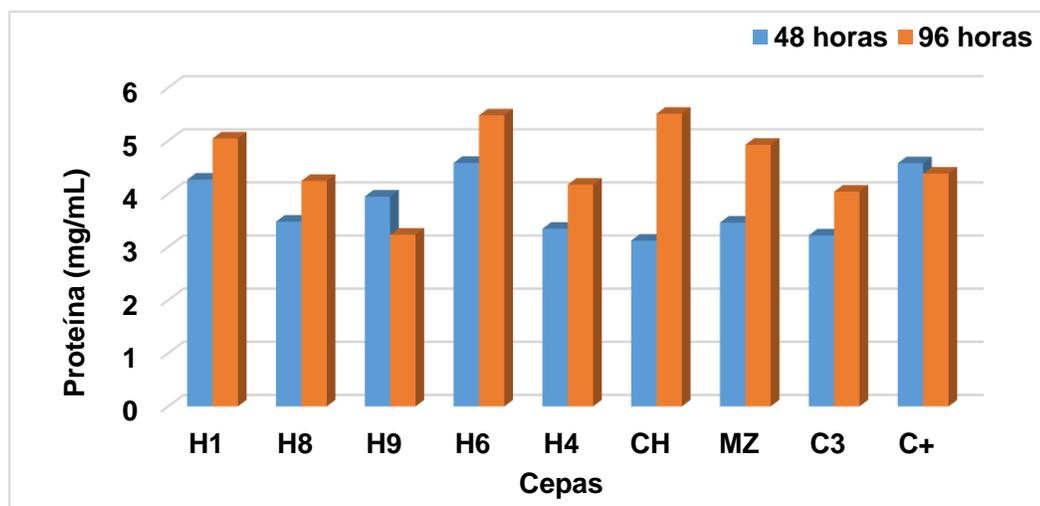


Figura 19. Contenido proteico.

### 8.3 Selección del hongo para evaluación de cinética de producción.

Para la selección del hongo nos basamos en los resultados arrojados por el experimento y observamos que el hongo con mayor producción fue el identificado como MZ con una producción de 356 U/L.

#### 8.3.1 Actividad celulítica del hongo seleccionado

##### 8.3.2.1 Evaluación de actividad enzimática de la amilasa.

Como se puede observar en la figura 20 el comportamiento de la actividad enzimática vario de forma considerable en cada concentración de sustrato; en el caso de la concentración del 1% a la hora 0 no hubo actividad, a las 24 horas ya se observaba actividad ya que hubo una producción de 477 U/L, sin embargo alrededor de las 75 horas hubo un descenso muy marcado para posteriormente volver a ver un nuevo inicio de actividad, sin embargo las 120 horas no fueron suficientes para

monitorear sus fases de desarrollo, en ese muestreo se tuvo una actividad enzimática de 600 U/L.

En la concentración de 1.5% de sustrato a las 0 horas hubo una considerable actividad enzimática, se observó una producción de 541 U/L para ir ascendiendo hasta las poco más de 1,000 U/L, sin embargo en el muestreo tomado a las 72 horas no se presenció de actividad enzimática alguna, para que a las 96 horas se manifestar un ascenso hasta las 800 U/L y a las 120 horas no se registrara actividad enzimática de la amilasa.

En el caso de la concentración CMC al 2 % se mostró un desarrollo semejante al sustrato de concentración de 1.5% actividad semejante a la de la concentración de 1%, a diferencia de que está a las 0 horas mostro una producción más baja de 200 U/L y su más alta producción fue de las 1,000 U/L en la muestra tomada a las 96 horas y a las 120 horas no hubo actividad alguna.

A pesar de que no se presenció un desarrollo constante de producción enzimática hasta alcanzar su punto máximo para después detener por completo su producción enzimática, se obtuvieron resultados muy favorecedores de la producción de esta enzima. La mayor producción fue de 1,165 U/L que se encuentra muy por encima de los resultados reportados por otros autores, por ejemplo una investigación realizada en el 2016 Vargas C. y col. su mayor producción de amilasa fue de 128 U/L, a las 48 horas de incubación, manteniendo la fermentación a un pH de 4 ya 250 rpm <sup>[27]</sup>. Comparando estos resultados con los obtenido en la primera evaluación de amilasa que se hizo donde su mayor producción fue de 200 U/L, podemos observar que la concentración de sustrato influyo de manera significativa, demostrando que a mayor concentración de sustrato hay una desarrollo de la máxima velocidad de actividad enzimática. Uno de los factores que puedo influir en la interacción de la enzima es que no se llevó un control del pH del cultivo, como se sabe el pH óptimo para su desarrollo se encuentra entre los rangos de 5 a 7 <sup>[11]</sup>.

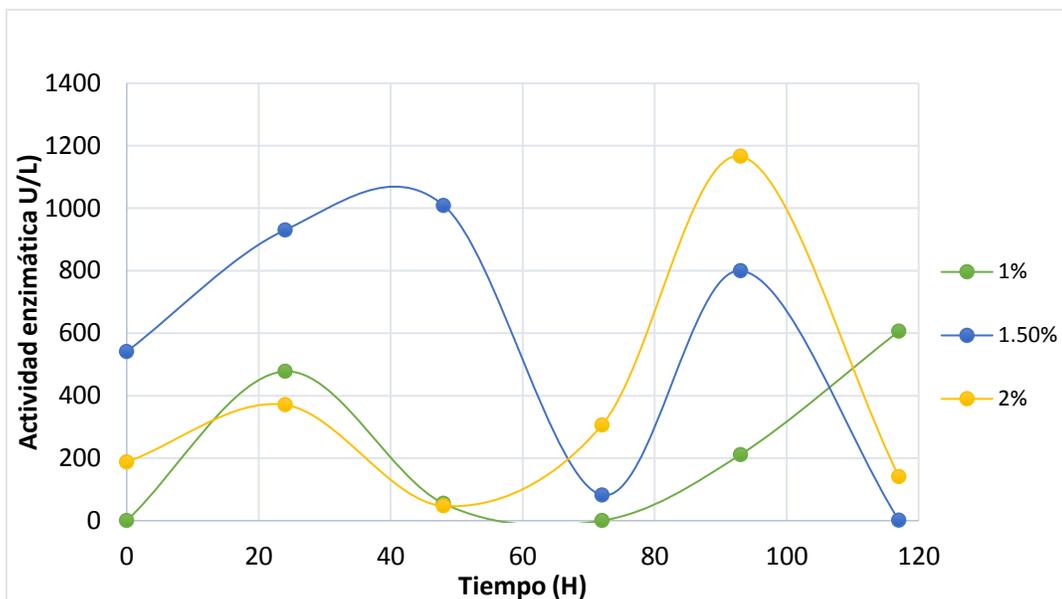


Figura 20. Actividad enzimática de la amilasa a concentraciones 1%, 1.5% y 2% de CMC.

### 8.3.2.2 Evaluación de actividad enzimática de la celulasa.

La figura 21 muestra los resultados del análisis de la actividad enzimática de la celulasa donde podemos notar que en el sustrato de concentración de 1% fue el más constante en desarrollo, a las 0 horas hubo una producción de 200 U/L y mostro su máximo desarrollo a las 96 horas, con una producción de 422 U/L aproximadamente el doble que al inicio y las 120 horas de tratamiento se observó un descenso considerable sin embargo no se muestra una nula actividad enzimática.

El 1.5% de concentración de sustrato inicio con 254 U/L a las 0 horas de tratamiento, para posteriormente disminuir un poco su producción e ir aumentando la misma paulatinamente hasta las 96 horas donde se observó la producción de 345 U/L siendo esta su mayor producción, aun así se encuentra un tercio por debajo en comparación con la del sustrato al 1% a la misma hora de tratamiento, sin embargo en este no se presentó una disminución significativa de producción de enzimas.

En el tratamiento al 2% de concentración de CMC se presencié una producción celulolítica de 400 U/L, siendo esta mayor producción de inicio en comparación con

los otros tratamientos, sin embargo se observó un descenso a las 24 horas de la mitad de producción inicial, al transcurrir los días se observa en la figura 21 que hubo un aumento en el desarrollo hasta alcanzar a las 96 horas 617 U/L de actividad enzimática y de igual manera que sucedió con las anteriores concentraciones de sustrato su actividad disminuyo de forma considerable.

Hay que considerar también que las celulasas se adsorben fuertemente sobre la celulosa. De tal manera que en las fases iniciales de un proceso de producción, donde sólo se detectan bajos niveles de celulasas, lo que ocurre realmente es que éstas están fuertemente adsorbidas sobre el sustrato es por eso que inicialmente se observa poca actividad <sup>[3]</sup>.

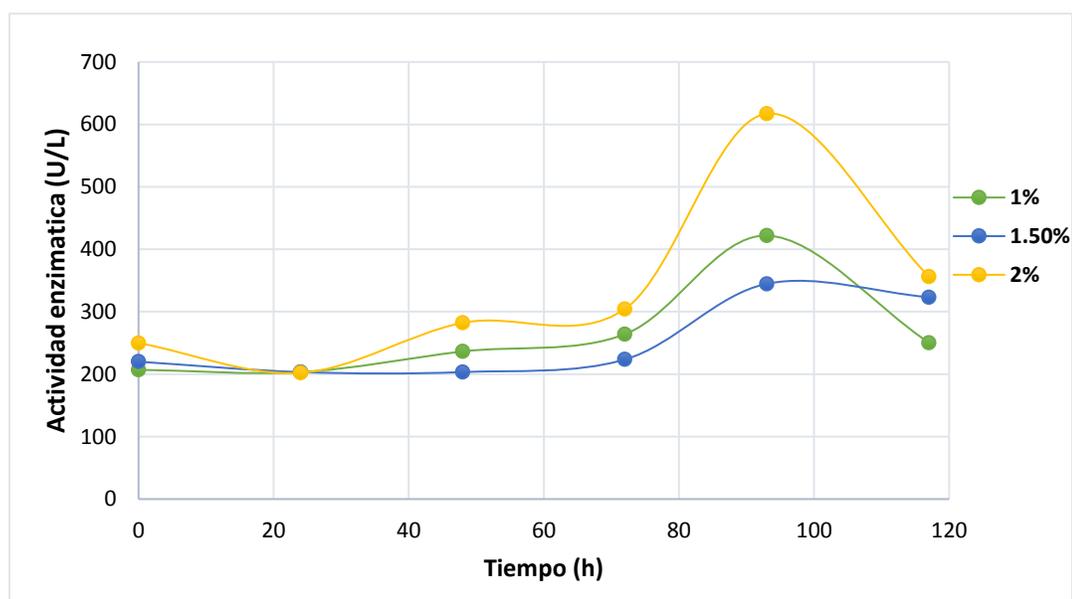


Figura 21. Actividad enzimática de la celulasa a concentraciones 1%, 1.5% y 2% de CMC.

### 8.3.2.3 Evaluación de actividad enzimática de la xilanasa

Se evaluó la actividad de la xilanasa en los tres diferentes concentraciones de sustrato de CMC; cómo podemos observar en la figura 22 el sustrato al 1% nos presentó una producción de 500 U/L a las 0 horas de tratamiento para después aumentar poco más del doble (1,184 U/L) de la producción inicial, siendo esta su máximo punto de producción de enzimas, al continuar con el tratamiento podemos observar que comienza un descenso considerablemente notable hasta que llegar

casi a cero su producción enzimática a las 72 horas para después volver a trabajar y ascender pero no tanto como al inicio de tratamiento y se mantuvo constante hasta las 120 horas.

En el caso del sustrato al 1.5%, este no tuvo producción alguna de enzimas a la hora de inicio del tratamiento, su actividad se percibió hasta las 24 horas para posteriormente descender a las 48 horas del experimento, pero a las 74 horas aproximadamente se observa su máximo punto de producción siendo 1,500 U/L, y después desciende de manera constante hasta que en las 120 horas no se ve actividad enzimática.

De igual forma que la concentración del sustrato anterior, en el de 2% a las 0 horas de tratamiento muestra una producción de 500 U/L de enzimas y aumenta hasta alcanzar las 2,000 U/L de xilanas a las 48 horas y después desciende manera constante hasta las 120 horas donde ya no hay rastro de actividad enzimática.

Aquí podemos notar que la producción de xilanas fue cuatro veces mayor a las 48 horas de fermentación con una concentración de CMC del 2% en comparación con los resultados obtenidos cuando se midió la actividad enzimática con una concentración de sustrato de 0.25%.

Se han reportados diferentes estudios relacionados con la producción de xilanas en diferentes sustratos y tipos de fermentaciones, por ejemplo Suprabha G. Nair y col. en el 2008 aislaron 10 cepas de hongos de suelos recogidos en diferentes partes de Kerala en India, seis de ellas tuvieron una producción de 40 IU/mL <sup>[25]</sup>. Otro caso presentado tuvo una actividad de la xilanas de 9.08 U/mL a las 72 horas de fermentación usando como sustrato olote de maíz <sup>[28]</sup>. Haciendo una comparación de los resultados se aprecia que los valores reportados por esos estudios son mucho menores a los arrojados por este experimento. Esto puede ser debido a la influencia del sustrato utilizado y las concentraciones utilizadas.

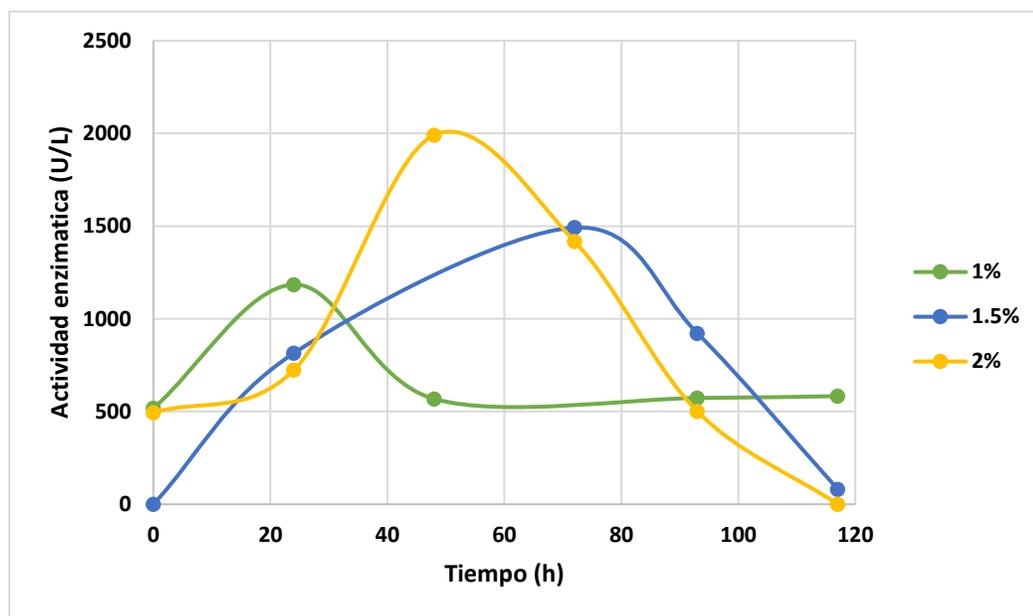


Figura 22. Actividad enzimática de la xilanasa a concentraciones 1%, 1.5% y 2% de CMC.

#### 8.3.2.4 Evaluación de actividad proteica

El análisis de proteínas se realizó por el método de Bradford.

Con la evaluación notamos que en el tratamiento con el sustrato de concentración al 1% la producción de proteínas es baja en comparación con las otras concentraciones, ya que en esta los valores fluctuaban entre 2 a 3 mg de proteínas por ml; en el caso del tratamiento a 1.5%, este inicia la hora 0 del tratamiento con 5.519 mg/ml de proteína para ascender hasta 8 mg/ml, sin embargo a las 72 horas del tratamiento este disminuye su producción a la mitad y vuelve a ascender pero no de manera tan significativa como anteriormente ocurrió.

En el caso del tratamiento con concentración del 2% en CMC su producción ocurre de manera ascendente las primeras 48 horas, es en las 72 donde disminuye, sin embargo su disminución no es muy significativa, al día siguiente de nuestro muestro se nota que hubo un aumento considerable en la producción alcanzando los 8.324 mg/ml de proteínas, siendo este el valor más alto de todos los tratamientos, pero a las 120 horas ocurre un decremento notable del rendimiento proteico.

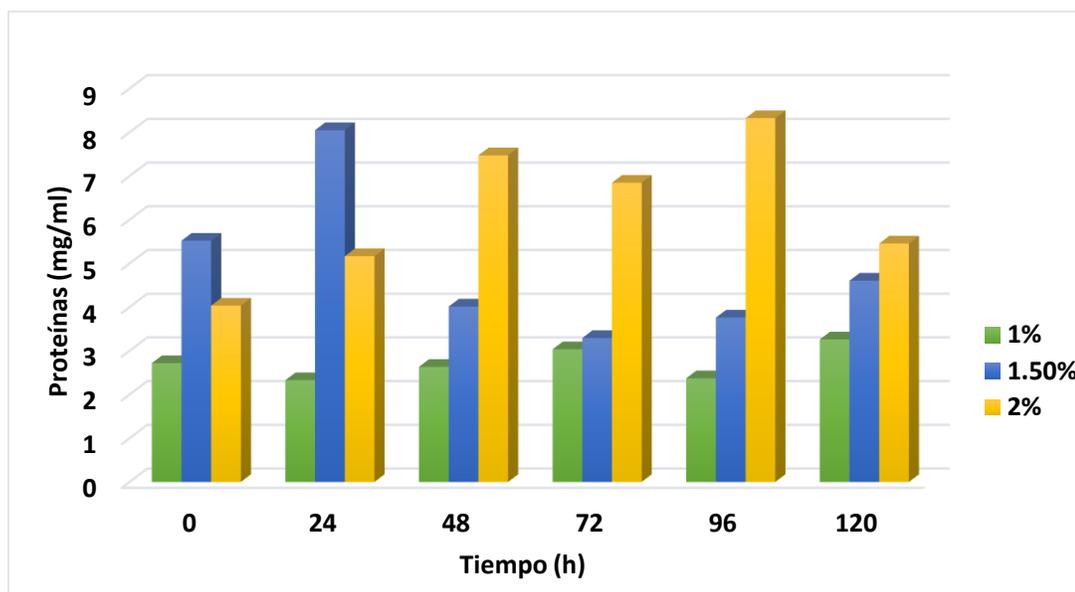


Figura 23. Evaluación de producción de proteínas a concentraciones 1%, 1.5% y 2% de CMC.

### 8.3.2.5 Análisis de producción de biomasa

La concentración de sustrato de 1% fue el que menor cantidad de biomasa produjo. Su producción se mantuvo casi estable, solo en el caso de las 0 y 48 horas que fue donde se produjo una disminución de contenido.

En la figura 15 se observa que el sustrato de 1.5% inicia en la hora 0 con 1.83 gramos de biomasa y de forma constante va incrementando este peso, pero no de una forma tan significativa sino con pocos decimos de gramos, al llegar al cuarto día del tratamiento se observa que su productividad disminuye.

En el tratamiento del 2% se observa una fluctuación en la producción de biomasa, ya que en las 48 y 96 de tratamiento se reflejó una disminución de rendimiento para que al final del tratamiento (120 horas) hay un incremento notable de poco más de 1 gramo y medio de biomasa.

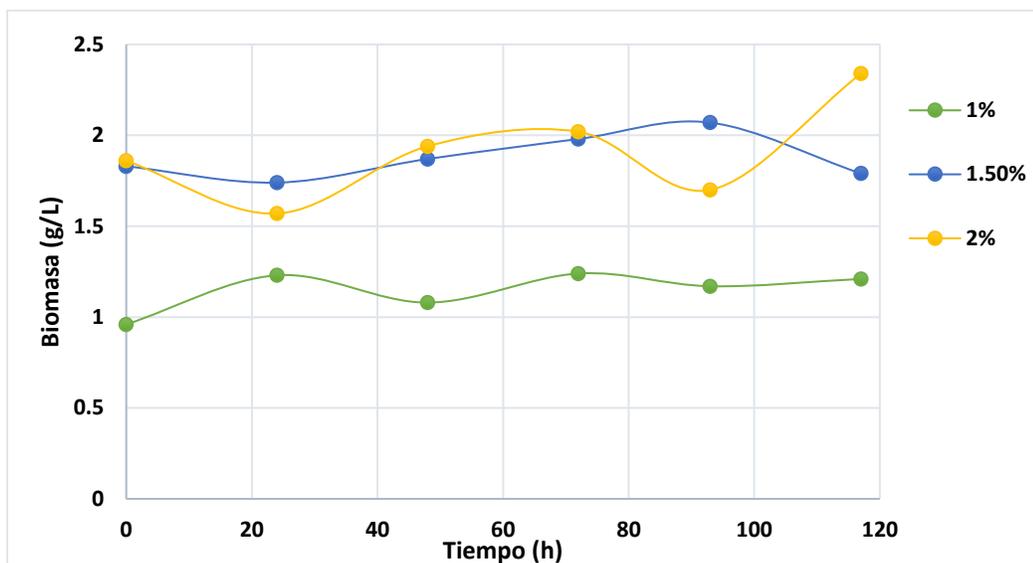


Figura 24. Producción de biomasa.

## 9. CONCLUSIONES

De la colección DCTA-UAAAN las 9 cepas que se evaluaron fueron reactivadas en los medios de cultivo para la producción de enzimas celulolíticas.

La producción de la enzima amilasa con mayor actividad fue la presentada por la cepa H6 con 700 U/L, la mayor producción de enzima celulasa fue la cepa MZ con 356 U/L y la xilanasa presento 4376 U/L por la cepa H1.

La cepa MZ presento los valores más altos de producción de celulasa por lo cual se seleccionó para la caracterización cinética.

En la cinética de producción con la cepa MZ los valores obtenidos fueron con el tratamiento al 2 % de CMC a las 96 h con 61 U/L.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Acosta Aranda, J.A. (2013). *Cinética de producción de celulasa y proteasa termoestables sobre olote de maíz por Rhizomucor pusillus SOC-4A* (tesis licenciatura). Saltillo, México: Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, pág. 25-26.
- [2] Banik, G., Cremonesi, P., La chapelle, A., Montalbano, L., 2003. *Nuevas metodologías en la restauración de material de papel*. Prato, Padova (2), pág. 39-40.
- [3] Blanco, M.J. (1990). Producción de celulasas a partir de dos cepas hiperproductoras de *Trichoderma lonibrachitum*: QM 9414 y Rut C30. *CIEMAT*, pág 12-13.
- [4] Castellanos, O., C. Ramírez, D., Montañez, V.M. (2006). *Perspectiva en el desarrollo de las enzimas industriales a partir de la inteligencia tecnológica*. Ingeniería e investigación, 26, (2), pág. 52-53.
- [5] Castillo Rosales, E., Rodríguez Alegría, M.E. (2014). *Enzimas aplicadas en procesos industriales*. Revista Digital Universitaria UNAM, 15, (12), pág.3-4.
- [6] Cepero de García, M.A., Restrepo Restrepo, S., Franco Molano, A.E., Cárdenas Toquica, M., Vargas Estupiñan, N. (2012). *Biología de Hongos*. Bogotá, Colombia: Ediciones Uniandes. pág. 2-3.
- [7] Cooper Bribiesca, B.L. (2013). *Enzimas xilanolíticas bacterianas y sus aplicaciones industriales*. Vertientes, 16, (1), pág. 20-21.
- [8] Cortés Sánchez, A.J., Guadarrama, L. M. y Díaz Ramírez, M. (2014). *Producción de biomasa a partir de Aspergillus oryzae en cultivo sumergido*. Biotecnia, 16, (3), pág. 13-14.
- [9] Delpiano Tedros, M.A. (2009). *Estudios del efecto de la adición de extremos hidrofóbicos en la expresión y purificación de celulas recombinantes*. Santiago, Chile: Universidad de Chile, pág. 3-8.
- [10] Escudero Agudelo, J., Daza Merchán, Z. T., Gil Zapata, N.J., Mora Muñoz, O.Y. (2013). *Evaluación de las enzimas celulolíticas producidas por hongos nativos mediante fermentación en estado sólido (SSF) utilizando residuos de cosecha de caña de azúcar*. Revista Colombiana de Biotecnología, 15, (1), pág. 109.

- [11] Espinel, E., López, E. (2009). *Purificación y caracterización de  $\alpha$ -amilasa de *penicillium commune* producida mediante fermentación en fase sólida*. Revista Colombiana de Química, 38, (2), pág. 193.
- [12] Espitia Rocha, L.C. (2009). *Determinación de la concentración de alfa y beta amilasas comerciales en la producción de etanol a partir de almidón de cebada empleando *Saccharomyces cerevisiae** (tesis de licenciatura). Pontifica Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia, pág. 27-29.
- [13] Flores Franco, F. (2014). *Evaluación del comportamiento de metabolitos en suero sanguíneo de ovinos con la inclusión de en dieta de nopal (*Opuntia ficus-indica*) combinado con enzima celulasa*. (Tesis de licenciatura). Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila, México, pág. 19.
- [14] García-Espejo C.N., Mamani-Mamani M.M., Chávez-Lizárraga G.A., Álvarez-Aliaga M.T. (febrero, 2016) *Evaluación de la actividad enzimática del *Trichoderma inhamatum* (BOL-12 QD) como posible biocontrolador*, the Selva Andina Research Society [online] Vol. 7, Art. 1. ISSN 2072-9294. Consultado 24 junio, 2019.
- [15] Guerrero Elias, H.Y. (2016). *Hidrólisis enzimática de fracciones de Nejayote para la obtención y recuperación de oligómeros de arabinosilanos y otras moléculas de alto valor agregado*. (Tesis maestría). Centro de investigación y asistencia en tecnología de diseño del estado de Jalisco, A.C., Guadalajara, Jalisco, pág.7-8.
- [16] Machado de Castro, A., Pereira, N. (2010). *Producción, propiedades y aplicación de celulasas en la hidrólisis de residuos agroindustriales*. Química Nova, 33, (1), pág. 182-183.
- [17] Martínez Guerra, J.J. (2014). *Libro electrónico de bioquímica*. Universidad Autónoma de Aguascalientes. Recuperado el 23 de julio de 2019, de <https://libroelectronico.uaa.mx/index.html>
- [18] Montecinos Pavez, C.A. (2009). *Estudio del efecto de la adicción de extremos hidrofóbicos en la expresión y purificación por HIC de xilanasas recombinantes* (tesis de licenciatura). Universidad de Chile, Santiago, Chile, pág 3-6.
- [19] Montes, B., Restrepo, A., MaEwen, J.G. (2003). *Nuevos aspectos sobre la clasificación de los hongos y su posible aplicación médica*. Biomédica, 23, (2), pág.215.

- [20] Mora Villalobos, M.E. (2015). *Evaluación de dos hongos filamentosos para la biosíntesis de celulasas a partir de residuos agroindustriales de mora (Rubus adenotrichos) mediante fermentación en medio sólido* (tesis de licenciatura). Universidad de Costa Rica, Facultad de Ciencias, San Jose, Costa Rica, pág. 6.
- [21] Ovando Chacón, S.L., Waliszewski, K.N. (2005). Commercial cellulases preparations and their applications in extractives processes. *Universidad y Ciencia*, 21, (42), pág. 111-112.
- [22] Ramírez, J., Ayala Acevez, M. (2014). Enzimas: ¿que son y cómo funcionan? *Revista Universitaria Digital UNAM*, 15, (12). Pág. 2. Recuperado el 29 de julio de 2019 de <http://www.revista.unam.mx/vol.15/num12/art91/art91.pdf>.
- [23] Roussos S., Perraud-Gaime I. (1996) Fisiología y Bioquímica de Microorganismos Utilizados en Procesos de Fermentación en Medio Sólido, *Fronteras en Biotecnología y Bioingeniería*.
- [24] Santos Orozco, L. (2014). Aislamiento de hongos filamentosos con propiedades de reducción de la enzima celulasa. (Tesis de licenciatura). Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila, México, pág.6-15.
- [25] Suprabha G., Sindhu R., Shankar S. (2008). Producción de xilanasas fúngica en condiciones de fermentación sumergida y en estado sólido. *Revista Africana de Investigación en Microbiología*, 2 (4), pág. 82
- [26] Suárez Arango, C. (2012). *Utilización de la fermentación líquida de Lentinula edodes (SHIITAKE), para la producción de metabolitos secundarios bioactivos y evaluación de su potencial empleo en la producción de un alimento funcional* (tesis maestría). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia, pág. 17-18.
- [27] Vargas C., M., Piro M., B., Navarro, A., Rubio M., C. (2016). Selección de un hongo filamentosos altamente productor de amilasas para ser usadas en detergentes biodegradables. *Micología ambiental*, 31, (1), pág. 23.
- [28] Vásquez Vanegas, A.M. (2013). *Producción de xilanasas por Apergillus sp. en fermentación sumergida y fermentación en medio sólido* (tesis maestría). Universidad Iberoamericana, Ciudad de México, México, pág. 12-13.