

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO  
NARRO**

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

PROGRAMA DOCENTE DE INGENIERIA EN CIENCIA Y  
TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



PRODUCCIÓN DE LA ENZIMA  $\beta$ -GLUCOSIDASA EN  
CULTIVO FÚNGICO SÓLIDO CON FOLLAJE DE  
*FLOURENSIA CERNUA* USANDO UN DISEÑO  
EXPERIMENTAL BOX-BEHNKEN.

POR:

**SÁNCHEZ FLORES ARIEL**

**Tesis**

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**Ingeniero en Ciencia y Tecnología de Alimentos**

Saltillo, Coahuila, México a Febrero de 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA "ANTONIO NARRO"  
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL  
PROGRAMA DOCENTE DE INGENIERO EN CIENCIA Y  
TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Producción  $\beta$ -Glucosidasa en Cultivo Fúngico Sólido con Follaje de  
*Flourensia Cernua* usando un Diseño Experimental Box-Benhken.

Por:

**SANCHEZ FLORES ARIEL**

TESIS

Que ha sido aprobada por el comité asesor como requisito para obtener el  
título de:

**INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

APROBADA

Dr. Miguel Ángel Medina Morales

Asesor Principal



Dr. Antonio Aguilera Carbó  
Coasesor



Lic. Laura Olivia Fuentes Lara  
Coasesor

Dr. José Dueñas Manis

Coordinador de División de Ciencia Animal

COORDINACIÓN DE CIENCIA  
ANIMAL

Saltillo, Coah. México, Febrero 2017.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA "ANTONIO NARRO"

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

PROGRAMA DOCENTE DE INGENIERO EN CIENCIA Y  
TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Producción  $\beta$ -Glucosidasa en Cultivo Fúngico Sólido con Follaje de  
*Flourensia Cernua* usando un Diseño Experimental Box-Benhken.

Por:

SANCHEZ FLORES ARIEL

TESIS

Que se somete a consideración del H. Jurado examinador como requisito  
parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



Dr. Antonio Aguilera Carbó  
Presidente



Lic. Laura Olivia Fuentes Lara  
Vocal



Dr. Efraín Castro Narro  
Vocal



Dr. Miguel Mellado Bosque  
Vocal Suplente



Dr. José Duedes Alánis  
Coordinador de Ciencia Animal

Saltillo, Coah. México, Febrero 2017.

## AGRADECIMIENTOS

### **A Dios**

Por cuidar siempre mis pasos en mi caminar, guardarme todos estos años con vida y una buena salud. A ti dios te agradezco por permitirme culminar mis estudios en tiempo y forma, darme la sabiduría y entendimiento para poder tomar buenas decisiones a lo largo de mi existir, por ayudarme a caer y levantarme de los golpes que me dio la vida y entender que tu misericordia y amor son infinitos. No tengo con que pagarte todas las bendiciones que has dado a mi familia y en especial a mí que en todo momento he sentido que tu manto me protege a donde quiera que vaya y tu mano me guía por el camino del bien, gracias señor reconozco que sin ti no hubiera logrado este objetivo tan importante en mi vida y que sin ti mi existir no tendría sentido y no sería nadie. De igual manera te agradezco por darme los padres tan maravillosos que tengo y cuidarlos todos estos años con salud y bienestar ya que para mí significan el todo y son mi más grande amor, sin ellos; sus consejos y enseñanzas mis objetivos no podrían ser alcanzados.

*Mira que te mando que te esfuerces y seas valiente; no temas ni desmayes que Jehová tu dios estará contigo a donde vayas. Josue1:9.*

### **A ti madre: Sofía Flores Ruiz**

A ti mama te agradezco todo el amor que me brindas incondicionalmente día con día, por tus consejos, tu enorme paciencia, por tus motivaciones y tu comprensión hacia mí, por inculcarme buenos valores y hacer de mí una persona de bien, y sobre todo por estar siempre cuando tu hijo te necesita. Te agradezco por enseñarme a ver siempre el lado bueno a cada circunstancia o dificultad que se nos presentara; también por enseñarme a tener siempre una sonrisa en mi rostro a pesar de lo que fuera. Te doy gracias por los desvelos que has tenido por mí y por estar a mi lado en cada etapa de mi vida, hoy culminamos una etapa más juntos y sé que vendrán más, dios no me pudo bendecir de mejor manera sino al darme la mejor madre. Gracias mama te amo.

### **A ti papa: Ariel Sánchez de la Garza**

A ti papa te doy gracias por cada regaño y cada estirón de orejas que me diste si no hubieras echo eso de seguro me hubiera desviado del camino y no sabría dónde estaría ahorita. Te agradezco por todo lo que me has enseñado gracias a ti soy bueno realizando muchas cosas, te agradezco por tener un corazón tan grande y lleno de bondad que te puedes quitar la camisa para dárnosla a mama o a mí. También por enseñarme que en la vida hay principios que se deben de seguir y lazos que nunca se deben de romper. Las palabras se quedan cortas para agradecerte todo lo que has sacrificado para poder lograr esta meta juntos. Gracias papá te amo.

### **A mis familiares**

A mi familia en general tíos, tías, primos, primas les quiero agradecer por ser parte de este logro en mi vida y por estar ahí cuando los necesite, gracias por su apoyo y motivación que me fueron de mucha ayuda. Muchas gracias familia por todas sus oraciones.

### **A mis amigos**

De carrera y generación gracias por el apoyo que mutuamente nos brindamos a lo largo de toda nuestra estancia en la universidad. A mis amigos (romíes) a ustedes les agradezco por haber formado una familia muy unida son tantos los momentos y alegrías que pasamos juntos y eso lo llevo muy bien guardado que jamás se olvidara.

### **A mi alma terra mater (Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro)**

A mi grandiosa universidad por recibirme y cobijarme durante estos 5 años, gracias por ser una casa de estudios tan noble y tan bella, por formarme académicamente y hacerme una mejor persona. Por todos esos momentos inolvidables que viví a tu lado, porque sin duda la mejor decisión que tome fue realizar mis estudios aquí. Vaya a donde vaya llevo tu nombre grabado conmigo y lo representare y defenderé con gran orgullo.

### **A mis maestros del departamento DCTA (Ciencia y Tecnología de Alimentos)**

Gracias por haberme formado profesionalmente y dejarme todo su conocimiento.

### **Al Dr. Miguel A. Medina Morales**

Por su apoyo, disponibilidad y dedicación que mostro en el presente trabajo, ya que sin todos sus conocimientos, técnicas y orientación no hubiese sido posible la culminación de este proyecto. Gracias Dr. Miguel por impartirnos tantas enseñanzas y conocimientos.

### **Al Dr. Antonio Aguilera Carbó**

Muchas gracias Dr. Tony por darme la oportunidad de ser parte de este trabajo y poder concluir así mis estudios.

### **Al T.LQ. Carlos “Carlitos”**

Por formar parte del equipo de trabajo, orientarme y apoyarme dentro del laboratorio con reactivos, equipos y tener siempre disposición para responder dudas que se presentaran. Gracias Carlitos.

**Al Ing. Juan López Trujillo**

Gracias Juanito por apoyarme desde el inicio hasta el final de este trabajo te lo agradezco enormemente fuiste indispensable para que esto se llevara a cabo. Gracias por la paciencia y tiempo prestado para responderme dudas y orientarme cuando me perdía.

## **DEDICATORIAS**

Gracias dios por prestarme vida y una buena salud, gracias por colmarme de bendiciones, por tu inmenso amor, hoy termino esta etapa de mi vida y te la dedico ya que sin ti no hubiera logrado terminarla.

Esto va para ustedes papas:

Ariel Sánchez de la Garza

Sofía Flores Ruiz

# INDICE

I.INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 JUSTIFICACIÓN.....	¡Error! Marcador no definido.
1.2 HIPÓTESIS .....	5
1.3 OBJETIVO GENERAL .....	5
1.3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	5
<b>2. Revisión de Literatura.....</b>	<b>6</b>
2.1 Antecedentes .....	6
2.2 <i>Flourensia cernua</i> (hojasen) .....	7
2.3 Genero <i>Flourensia</i> .....	7
2.4 Ubicación.....	7
2.5 Características .....	8
2.6 Usos Medicinales .....	9
2.7 Celulosa.....	9
2.8 Hemicelulosa .....	10
2.9 Lignina.....	10
2.10 Fermentación .....	11
2.11 Fermentación en Medio Sumergido .....	11
2.12 Fermentación en estado sólido .....	12
2.13 Ventajas del uso de fermentación en estado solido.....	13
2.14 Inconvenientes del uso de fermentación en estado sólido.....	13
2.15 Características del sustrato .....	14
2.16 Factores que influyen en el medio cultivo en sólido .....	14
2.16.1 Contenido de humedad .....	14
2.16.2 Temperatura .....	15
2.16.3 pH.....	15
2.17 Aplicaciones de la fermentación en estado sólido a la industria alimentaria. ....	15
2.18 Hongos.....	16
2.19 Importancia en Fermentación .....	16
2.20 Hongos Filamentosos .....	17
2.21 <i>Aspergillus niger</i> .....	18



2.22	Secreción de enzimas por <i>Aspergillus niger</i> .....	18
2.23	Síntesis de enzimas por <i>Aspergillus niger</i> .....	19
2.24	Enzimas .....	19
2.25	Enzimas Celulasas.....	20
2.25.1	Endo- $\beta$ - 1,4-glucanasa .....	20
2.25.2	Exo- $\beta$ - 1,4-glucanasa .....	20
2.25.3	$\beta$ -glucosidasas.....	21
2.26	Uso de las Celulasas .....	22
2.27	Diseño Experimental .....	23
2.28	Selección del diseño experimental .....	23
2.29	Diseño Experimental Box-Behnken .....	24
<b>3.</b>	<b>Materiales y Métodos</b> .....	<b>25</b>
3.1	Material Biológico y acondicionamiento .....	25
3.2	Producción de esporas de <i>Aspergillus niger</i> GH1 .....	26
3.3	Condiciones de cultivo .....	27
3.4	Ajuste del cultivo fúngico al diseño experimental de optimización.....	28
3.5	Preparación del medio mineral.....	29
3.6	Siembra.....	29
3.7	Recuperación de extractos enzimáticos.....	30
3.8	Preparación de Buffer de Citratos .....	30
<b>4.</b>	<b>Métodos Analíticos</b> .....	<b>31</b>
4.1	Actividad $\beta$ -Glucosidasa .....	31
4.2	Actividad Endoglucanasa .....	31
4.3	Actividad Exoglucanasa .....	32
4.4	Fenoles Hidrolizables Totales .....	32
<b>5.</b>	<b>Cinética de condiciones más favorables</b> .....	<b>33</b>
5.1	Preparación del medio de fermentación .....	33
5.2	Recuperación de extracto enzimático crudo.....	33
5.3	Técnicas Analíticas.....	34
5.3.1	Actividad $\beta$ -glucosidasa.....	34
5.3.2	Fenoles Hidrolizables Totales (Folin).....	34
5.3.3	Determinación de fibra por el método ácido detergente (FDA).....	35

5.3.4 Determinación de Lignina .....	36
5.3.5 Determinación de Celulosa.....	36
5.3.6 Determinación de fibra detergente neutro (FDN).....	37
5.3.7 Determinación de hemicelulosa.....	37
<b>6. Resultados y Discusión.....</b>	<b>38</b>
6.1 Actividad $\beta$ -Glucosidasa .....	38
6.2 Análisis de Varianza.....	43
6.3 Actividad Exoglucanasa y Endoglucanasa.....	44
6.4 Fenoles Hidrolizables Totales .....	45
6.5 Resultados de cinética .....	47
6.5.1 Actividad $\beta$ -glucosidasa.....	47
6.5.2 Celulosa, Lignina, Hemicelulosa .....	48
6.5.3 Fenoles Hidrolizables Totales.....	51
<b>7. Conclusiones.....</b>	<b>52</b>
<b>8. Perspectivas del Experimento.....</b>	<b>53</b>
<b>9. Literatura citada.....</b>	<b>54</b>

## INDICE DE CUADROS

Cuadro I. Clasificación taxonómica de <i>Flourensia cernua</i> .....	8
Cuadro II. Ajuste del diseño y sus variables.....	28
Cuadro III. Factores y niveles.....	29
Cuadro V. Contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina.....	48

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Flourensia cernua</i> .....	7
Figura 2. Ubicación geográfica de <i>Flourensia cernua</i> en Mexico.....	7
Figura 3. Estructura de celulosa.....	9
Figura 4. Parte de la estructura de la hemicelulosa.....	10
Figura 5. Estructura de la lignina.....	10
Figura 6. Degradación enzimática de la celulosa.....	21
Figura 7. Cepa de <i>Aspergillus niger</i> y hojaseñ nativo.....	25
Figura 8. Propagación de esporas.....	26
Figura 9. Esterilización de medio mineral .....	29
Figura 10. Siembra.....	29
Figura 11. Recuperación de extractos enzimáticos .....	30
Figura 12. Análisis de actividad $\beta$ -glucosidasa.....	31
Figura 13. Actividad enzimática para cada tratamiento analizado. ....	38
Figura 14. Actividad enzimática con niveles de humedad y niveles de pH.....	39
Figura 15. Actividad enzimática con niveles de inóculo y de pH.....	40
Figura 16. Actividad enzimática con los niveles de inóculo y humedad. ....	40
Figura 17. Análisis de Varianza (Diagrama de Pareto).....	43
Figura 18. Tratamientos con sus promedios respectivos dados en mg/g. ....	45
Figura 19. Gráfica de actividad enzimática con relación al tiempo de fermentación .....	47
Figura 20. Comportamiento de celulosa, hemicelulosa y lignina en cinética.....	49
Figura 21. Comportamiento de fenoles en cinética.....	51

## RESUMEN

Mejoramiento de la producción de la enzima  $\beta$ -glucosidasa en cultivo fúngico sólido con *Flourensia Cernua* como soporte/sustrato.

En la zona norte de México especialmente en la semidesértica existen recursos forestales que se pueden emplear como fuente de materia prima para producir metabolitos de interés. *Flourensia cernua* es un recurso forestal presente en esta zona y cuyo follaje puede ser biotransformado para obtener compuestos de alto valor agregado. En la presente investigación se empleó una fermentación en medio sólido para lograr la producción de la enzima  $\beta$  1,4-glucosidasa usando follaje de *F. cernua* e inoculado con *Aspergillus niger* GH1, bajo un diseño experimental Box-Benhken, el cual se usó para buscar las mejores condiciones de producción con cada tratamiento presente. A cada unidad experimental se les asignó sus condiciones de tamaño de inóculo, humedad y pH, de acuerdo al diseño experimental. Se incubó a una temperatura de 30°C por 36 horas. Después el extracto enzimático fue recuperado y se midió la actividad enzimática de interés. El resultado de la actividad enzimática de cada unidad experimental se vio afectado por las condiciones empleadas en cada tratamiento. Para el análisis estadístico se empleó Excel y el paquete estadístico Statistica. Se encontró que el tratamiento A fue el que mostró mayor producción de  $\beta$  1,4-glucosidasa con un total de 2406 U/L de actividad enzimática comparado con el tratamiento N que fue el que presentó el nivel más bajo con 951 U/L del tratamiento N. Con base en los resultados se observó que *Aspergillus niger* tiene capacidad para producir la enzima de interés al poder degradar los compuestos presentes en *F. cernua* y que puede tener una amplia aceptabilidad en el sector agroindustrial.

### Palabras Clave

$\beta$ -glucosidasa, fermentación sólida, *F. cernua*, *Aspergillus*.

## ABSTRACT

Improving the production of  $\beta$ -glucosidase enzyme in fungal solid culture using *Flourensia cernua* as support/substrate.

In northern Mexico exist, especially in the semi-desert area, resources can be used as a source of raw material to produce metabolites of added-value. *Flourensia cernua* is Present forest resources in this area which and foliage can be biotransformed paragraph obtain compounds of high value added. In the present investigation, a fermentation medium was used Solid active paragraph achieve production of  $\beta$ -glucosidase enzyme 1.4 cernua F. Using foliage and inoculated with *Aspergillus niger* GH1, under an experimental design Box-Benhken, which He used paragraph Search Best Production Conditions with each present treatment. Each Unit will be assigned its experimental conditions inoculum size, humidity and pH, according to the experimental design and incubated at 30 ° C for 36 hours. After the enzyme extract was recovered and reading Enzyme activity was taken. The result m of enzyme activity of each experimental unit was affected by the conditions used in each treatment. Statistical Analysis for itself Employment Excel and Statistica statistical package. They found that treatment (A) was the mayor showed  $\beta$ -glucosidase production total of 1.4 UN 2406 U / L enzyme activity compared to treatment (N) That was the one that presented the lowest level with 951 U / L Treatment (N). Based on the results it was found that *Aspergillus niger* have unable to produce the enzyme of interest to power degrade the present compounds in F. cernua and can have a wide  $\zeta$ acceptability in the agribusiness sector.

### Keywords

$\beta$  -glucosidase, solid fermentation, F. cernua, *Aspergillus*

## I. INTRODUCCIÓN

Un proceso biológico es aquel que se lleva a cabo mediante un ser vivo. Los procesos biológicos están hechos de algún número de reacciones químicas u otros eventos que resultan en una transformación. La regulación de los procesos biológicos ocurre cuando algún proceso es modulado en su frecuencia, velocidad o alcance. Estos procesos han sido usados por los seres humanos desde hace miles de años, por ejemplo, las plantas que hoy cultivamos son en muchos casos distintas de sus antepasados silvestres, ya que el hombre ha modificado y seleccionado sus propiedades a lo largo de más de diez mil años en función de sus necesidades, una muestra más es la obtención de algunas bebidas alcohólicas que se hacían desde antes del 2000 A.C, en Babilonia, Egipto, Grecia y Roma, igualmente se producía queso y pan ácimo. En la elaboración de todos estos alimentos se utilizaban microorganismos. En años recientes se ha dado enfoque a usar estos bioprocesos para degradación de biomasa y recuperación de metabolitos todo esto aplicando la biotecnología. La biotecnología tiene sus fundamentos en la tecnología que estudia y aprovecha los mecanismos e interacciones biológicas de los seres vivos, en especial los unicelulares, mediante un amplio campo multidisciplinar. Esta ciencia está ganando terreno rápidamente ya que ofrece varias ventajas sobre las tecnologías convencionales como rendimiento superior, mejora en la nutrición, reducción de plaguicidas, desarrollo de nuevos materiales. Las enzimas juegan un papel muy importante en la mayoría de las reacciones de los seres vivos ya que son reguladoras de estas mismas reacciones. Es por eso que en los últimos años se ha dado enfoque a la producción de estas misma a nivel industrial utilizando biomasa residual que se encuentra presenta en nuestro ecosistema. Una enzima es una proteína soluble producida por las células del organismo, que favorece y regula las reacciones químicas en los seres vivos. Dicho de otra manera son moléculas de naturaleza proteica que catalizan reacciones químicas. Estas hacen que una reacción química que es energéticamente posible, pero que transcurre a una velocidad muy baja sea cinéticamente favorable. En estas reacciones las enzimas actúan sobre unas moléculas denominadas sustratos las cuales se convierten en moléculas diferentes denominadas productos. Las enzimas no modifican el balance energético ni el equilibrio de aquellas reacciones en las que

intervienen su función se limita a ayudar a acelerar el proceso. Esto quiere decir que la reacción bajo el control de una enzima alcanza su equilibrio de manera mucho más rápida que una reacción no catalizada. Las enzimas suelen ser utilizadas a nivel comercial e industrial para la producción de alimentos, el desarrollo de biocombustibles y la elaboración de productos de limpieza entre otros usos; es por eso que este campo de investigación y experimentación está alcanzando grandes iniciativas de interés lo que resulta una serie de nuevos productos y una mejora en el proceso. Entre los diversos tipos de enzimas existentes se encuentran las enzimas celulolíticas o dicho de otra manera las enzimas que son capaces de degradar la celulosa. La celulosa es un polisacárido constituido por moléculas de glucosa con una estructura lineal en la cual se establecen múltiples hidrogeno en los puentes hidroxilo lo cual lo hace rígido e insoluble en agua. Este polisacárido forma parte de la biomasa vegetal por consecuente se encuentra en gran medida en los suelos.

Existen tres enzimas que intervienen en la degradación de la celulosa trabajando en conjunto: 1) Endo- $\beta$ -1,4-glucanasa que ataca los enlaces  $\beta$  1-4 de la macromolécula formando fragmentos de oligosacáridos solubles. 2) Exo  $\beta$  1-4 glucanasa que separa al disacárido celobiosa desde los extremos de la molécula. 3)  $\beta$  Glucosidasa que hidroliza la celobiosa con formación de glucosa y de esta forma seguir en otras rutas de degradación diferentes.

Para la obtención de dichas enzimas a nivel industrial se emplean hongos filamentosos en sistemas de cultivo líquido o llamado también medio sumergido. Aun cuando siguen vigentes, se han desarrollado e implementado procesos en estado sólido. Porque se ha demostrado en diversos estudios que presentan ciertas ventajas con respecto al medio sumergido. Los cultivos sólidos son definidos como aquellos bioprocesos que presentan ausencia de agua libre, pero con la humedad suficiente para que el microorganismo pueda desarrollar su crecimiento y llegue a la producción de metabolitos. La SSF ha ganado la atención significativa para el desarrollo de bioprocesos industriales debido a la menor demanda de energía asociada con altos rendimientos de producto y una menor producción de aguas residuales con menor riesgo de contaminación bacteriana.

La fermentación es la descomposición de la materia orgánica por medio de microorganismo fermentadores en este caso un hongo *Aspergillus niger*. Este es un hongo que produce un moho negro en vegetales. Es una de las especies más corrientes del género *Aspergillus*. En procesos de fermentación es sumamente empleado debido a su fácil manipulación, inocuidad y su gran crecimiento de esporas. En este caso se utilizó este hongo porque presenta la actividad de las tres enzimas de interés endoglucanasa, exoglucanasa y  $\beta$ -glucosidasa. Como materia orgánica y fuente de sustrato se utilizó una planta silvícola llamada *Flourensia cernua* o conocido como hojaseñ. Cuyo follaje es una fuente de materia prima y puede ser biotransformado para una obtención de compuestos con valor agregado. Se presenta con abundancia en la región donde estamos ubicados y con un propósito de aprovechar recursos agroindustriales como medios fermentativos, es por eso que se decidió utilizar esta planta. La implementación de microorganismos en los diversos procesos biotecnológicos ha incrementado progresivamente. Debido a que éstos pueden complementar, y en algunas ocasiones reemplazar los procesos anteriormente usados. Causando un menor impacto negativo en la naturaleza y proporcionando más ventajas. Ya que representan una disminución en los costos de producción y mayor rendimiento. Son muchas las aplicaciones de los microorganismos, sin embargo, un punto muy importante es la producción de enzimas. Esta es una actividad de gran importancia en la optimización los procesos que necesitan ser catalizados. Por ello es preciso ampliar el conocimiento acerca de dicha acción microbiana en los procesos biotecnológicos de la industria. A pesar de los avances biotecnológicos en la elección de enzimas aún hace falta explorar ambientes nuevos o exóticos para encontrar microorganismos que desarrollen enzimas con propiedades excepcionales. A pesar de la multiplicidad de los microorganismos, un número limitado se usa como fuente de enzimas. Porque es más fácil llevar a cabo la purificación de varias enzimas a partir de un microorganismo para reducir costo.

El objetivo de este trabajo de investigación es mejorar la producción de la enzima  $\beta$ -glucosidasa en medio sólido fúngico usando el hojaseñ como sustrato soporte, bajo un diseño experimental de optimización, cuantificar la actividad enzimática y así validar el tratamiento con mayor actividad.



## 1.1 JUSTIFICACIÓN

En los últimos treinta años, la preocupación debido a la contaminación asociada a la presencia de compuestos sintéticos como los plásticos y su incidencia sobre los suelos de cultivo. Pese al uso de aditivos que buscan incrementar la degradación de los materiales sintéticos, la alternativa de emplear materias primas de origen natural, se convierte cada vez en una mejor opción. Dentro de las potenciales materias primas que permiten cumplir con estos requerimientos se encuentran los polisacáridos de origen natural. Existen numerosas tecnologías que permiten la transformación y aprovechamiento de la biomasa. La biomasa residual originada de residuos agrícolas, forestales, urbanos está compuesta por hidratos de carbono: celulosa, hemicelulosa, almidón, glucosa o fructosa. La sustitución de los procesos químicos por naturales es el principio básico de la biotecnología. La cual busca reducir el impacto negativo de dichos procesos en el medio ambiente. Ya que además de requerir gran inversión de capital, demandan condiciones especiales para la obtención de productos de gran interés como las enzimas. Como parte de la recuperación de desechos agroindustriales o la utilización de plantas silvestres que se tenga abundancia en ciertas zonas. Se utiliza el follaje de estas mismas como medio fermentativo y sustrato soporte. Se buscan recursos naturales para aprovecharse y obtener compuestos de interés agroindustrial.

También se busca eliminar ciertos compuestos presentes en el hojase como lo son los taninos. Los taninos son compuestos polifenólicos muy astringentes y de gusto amargo que presentan las plantas. Protegen a las plantas de las heridas y de los ataques exteriores, resultan ser tóxicos para los microorganismos y algunos herbívoros que las consumen. Para los rumiantes o animales que suelen consumir ciertas plantas los taninos resultan ser poco digeribles o en algunos casos indigeribles. Es por eso que en el presente trabajo de investigación se busca eliminar estos compuestos y ayudar a su digestión.

## **1.2 HIPÓTESIS**

Es posible producir alta actividad de la enzima  $\beta$ -glucosidasa en medio solido fúngico a partir de follaje de hojaseen.

## **1.3 OBJETIVO GENERAL**

Producir la enzima  $\beta$ -glucosidasa bajo un diseño experimental de optimización en un bioproceso fúngico.

### **1.3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Aplicar un diseño de optimización en el bioproceso fúngico.
- Determinar actividades enzimáticas adicionales a obtener en el proceso fermentativo.
- Validar las condiciones de fermentación obtenidas del diseño experimental.

## 2. Revisión de Literatura

### 2.1 Antecedentes

Alrededor del mundo los residuos o desechos vegetales son los principales recursos renovables que existen, se considera que cerca del 85 por ciento de estos residuos son considerados agrícolas y agroindustriales (Sztern y Pravia,1999). Los microorganismos cumplen un papel sumamente importante en la descomposición y posterior transformación de estos compuestos (Saber,2001). Por esta razón a lo largo de los años se han desarrollado nuevos procesos y técnicas usando estos residuos como materia prima para la obtención de productos con un valor agregado como lo son las enzimas y proteínas unicelulares (Oliveira et al.,2006). Entre las enzimas más importantes se encuentran las celulasas, hemicelulasas, proteasas, lipasas, fosfatasas (Mondini et al., 2004). Cuando los microorganismos producen enzimas extracelulares suelen ser potencialmente útiles en la degradación de diferentes sustratos, ya que estas tienen ciertas ventajas con respecto a las enzimas intracelulares. Enzimas extracelulares son capaces de hidrolizar moléculas de gran tamaño como la celulosa, hemicelulosa, pectina, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos el microorganismo las asimila como fuente de carbono y energía. Moléculas como la celulosa están presente en gran medida en el compost de residuos agrícolas y esto los convierte en un sustrato ideal para poder aislar un microorganismo y degradar compuestos (Sztern y Pravia,1999). Se estima que aproximadamente 4000,000,000 toneladas de celulosa se forman anualmente. Esta gran cantidad no se acumula sobre la tierra debido a la acción de bacterias y hongos capaces de degradar con eficiencia estos materiales. (Aro et al; 2005). El uso de estas enzimas celulasas, xilanasas han ganado mucha atención debido a que los productos que se obtienen a partir del hidrolisis como azúcares solubles son indispensables en producción de combustibles, procesos químicos, alimenticios y de fermentación (Kuhada et al.,1998).

## 2.2 *Flourensia cernua*(hojasen)

La especie bajo estudio es un miembro de la familia Compositae, Asteraceae, pertenece al género *Flourensia*. La especie *Flourensia cernua* es conocida con varios nombres en México, por ejemplo: hojasen, Hojas de Sen, arbusto de alquitrán y escobilla negra.



Figura 1. *Flourensia cernua*

## 2.3 Genero *Flourensia*

Se describen 23 especies del género *Flourensia*, 9 mexicanas y 14 sudamericanas. (Dillon 1976). El género *Flourensia* es importante debido a la gran cantidad de metabolitos secundarios que posee; estos son ampliamente utilizados para aplicaciones biológicas y ecológicas

## 2.4 Ubicación

Es nativa del desierto de Chihuahua, en México se encuentra en los estados de Chihuahua, Sonora, Coahuila, Durango, San Luis Potosí y Zacatecas (Briones y Villarreal, 2001). En los Estados Unidos de Norteamérica se localiza en el Oeste de Texas y Sur de Nuevo México y Arizona. La mayoría de las especies del género se encuentran en América Latina. Es común en los suelos aluviales derivados de piedra caliza, el material base principal de los suelos del desierto de Chihuahua. La especie ha sido descrita como de larga duración.

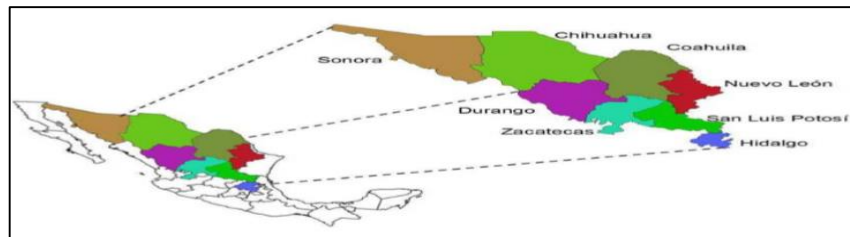


Figura 2. Ubicación geografica de *Flourensia cernua* en Mexico

## 2.5 Características

*F. cernua* es un arbusto que crece de una red de raíces que se puede extender hasta 4 metros es muy ramificado de 1 a 2 m de altura que exuda una sustancia resinosa con olor a alquitrán. La mayoría son de poca profundidad. Tiene muchas ramas delgadas, resinosas, color café a grisáceas. Las ramas están cubiertas con hojas alternas, compuestas de dos folíolos, elípticas a oblongas. Las flores son cabezuelas en corimbos o panículas y presentan de 12 a 20 flores por cabezuela. El fruto es un aquenio cabelludo muy veloso de 6 mm de largo y 2 mm de ancho, de 2 a 4 aristas desiguales de 2-3 mm de largo, casi obscurecidas por los largos del aquenio, el sistema radical es pivotante de color café, de consistencia leñosa y poco flexible (Correl y Johnston, 1970) .

Cuadro I. Clasificación taxonómica de *Flourensia cernua*

<b>Reino</b>	Metaphyto.
<b>Subreino</b>	Spermatophyto
<b>Clase</b>	Angiospermas
<b>Subclase</b>	Dicotyledonas
<b>Orden</b>	Companulatae
<b>Familia</b>	Compositae
<b>Subfamilia</b>	Tubuliflorae
<b>Tribu</b>	Heliantheae
<b>Género</b>	Flourensia
<b>Especie</b>	Cernua D.C

## 2.6 Usos Medicinales

*Flourensia cernua* tiene usos medicinales. En México se usa para hacer un té que se consume para tratar diversas afecciones gastrointestinales tales como indigestión y la diarrea, se usa para desórdenes respiratorios (Arredondo, 1981). Las hojas y las cabezas de las flores se venden en los mercados de agricultores en México y Estados Unidos. También se usa para construirle cierta a protección a cultivos.

## 2.7 Celulosa

La celulosa es el principal componente de la pared celular de las plantas. Teniendo en cuenta su estructura química, se define como un polisacárido lineal formado por monómeros de glucosa unidos por enlaces betas 1-4. La celulosa es una fuente rica de energía al ser degradada en monómeros estructurales. Para la degradación de la celulosa se debe tener en cuenta su susceptibilidad al hidrólisis enzimática ya que está es afectada significativamente por los rasgos estructurales de los materiales celulósicos, grado de acumulación de agua, orden molecular, contenido de material asociado como la lignina, estructura capilar de las fibras de celulosa, área superficial, además del rasgo sugerido como el más importante la cristalinidad (Vilches, 2000). Para que la celulosa pueda ser degradada o convertida a un azúcar simple el hongo tiene que ser capaz de producir enzimas hidrolasas y entre ellas las celulasas. Las celulasas incluyen enzimas endoglucanasas, exoglucanasas y  $\beta$ -glucosidasas. Estas tres enzimas deben de actuar de una manera sinérgica para lograr convertir a la celulosa en un azúcar simple como la glucosa (Sanchez-Ramirez et al., 2016)

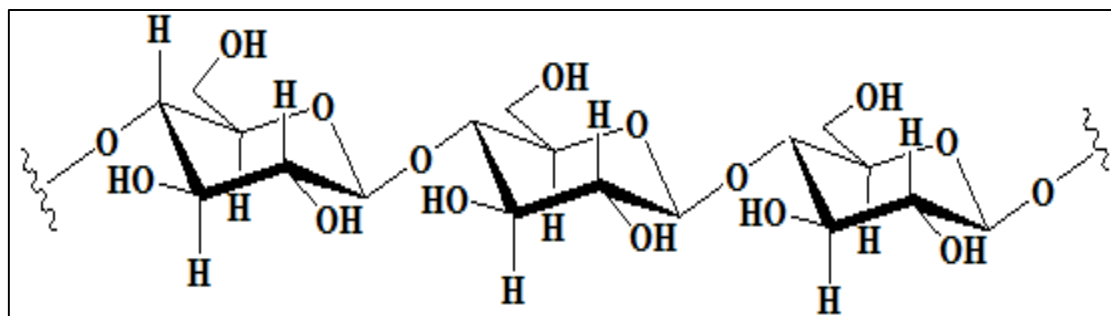


Figura 3. Estructura de la celulosa.

## 2.8 Hemicelulosa

La hemicelulosa es un polímero constituido por enlaces glucosídicos, está formado por más de un tipo de azúcar y presenta ramificaciones. La cadena principal de la hemicelulosa puede consistir en una sola unidad (homopolímero) como lo son los xilanos, o también puede estar constituida por dos o más unidades (heteropolímero) un ejemplo son los glucomananos (Vázquez 2013). El papel de la hemicelulosa es ayudar a la unión de la celulosa y la lignina.

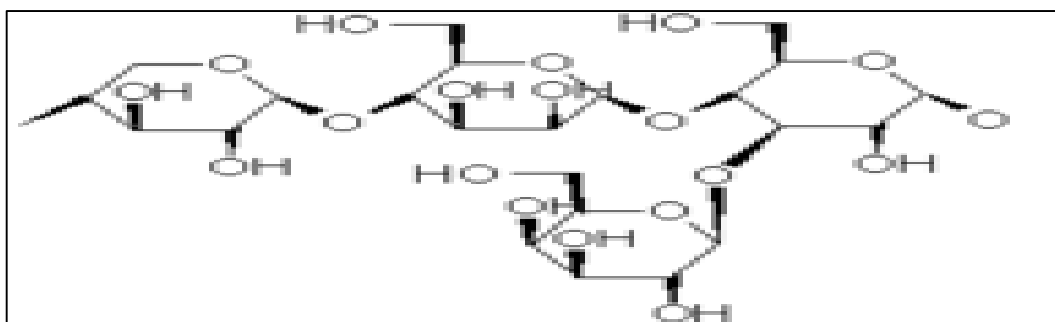


Figura 4. Parte de la estructura de la hemicelulosa

## 2.9 Lignina

La lignina es en si la tercera parte de la biomasa lignocelulósica. Es un polímero amorfo que está formado por unidades de fenilpropano ligado por diferentes tipos de enlaces como pueden ser alquil-éter o alquil-carbono (García et al., 1984). Alcoholes cinamílicos se les denomina a los monómeros que forman la lignina, estos se diferencian por las sustituciones que presenta el anillo aromático.

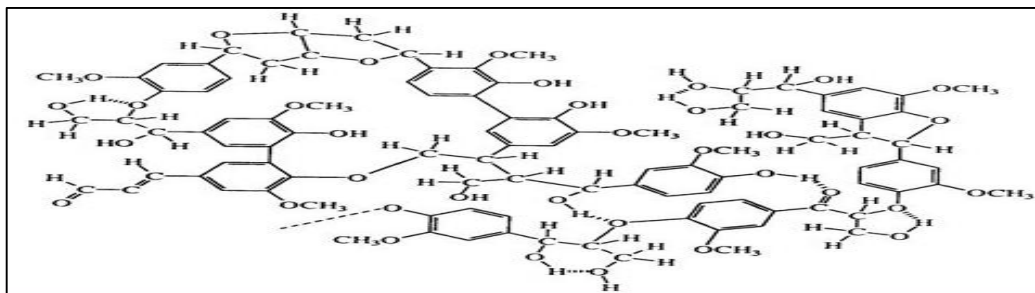


Figura 5. Estructura de la lignina

## **2.10 Fermentación**

Hernández (2003) define una fermentación desde un punto de vista biotecnológico, y dice que es el proceso en el cual los microorganismos producen biomasa y metabolitos a partir de utilizar sustancias orgánicas, y la descomposición de los sustratos se lleva a cabo por enzimas que son producidas por los microorganismos.

Las fermentaciones pueden ser naturales o artificiales esto depende si el hombre intervino en ellas, también se pueden clasificar según el estado del sustrato que se vaya a emplear.

## **2.11 Fermentación en Medio Sumergido**

La fermentación en medio sumergido se define como un cultivo donde las células microbianas están dispersas de forma homogénea en un recipiente agitado. El desarrollo de esta técnica ha sido de gran importancia porque permite el desarrollo de cultivos de organismos aerobios en condiciones homogéneas y con una densidad de biomasa moderada y con esto simplifica el estudio de estos organismos.

La fermentación sumergida (FS) como aquella en donde hay por lo menos la misma concentración de agua y de sustrato sólido (nutrientes) en el proceso, es decir que hay una solución. 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 (Rodríguez-Couto et al. 2006).

El desarrollo de la biotecnología en especial de la fermentación en estado líquido y la facilidad que proporciona en cuanto al manejo de sus variables, ha permitido realizar el cultivo del micelio de macrohongos con aumento en la producción de sus metabolitos, lo que ha impulsado aún más su obtención y el estudio de los compuestos con potencial como medicamentos tanto del medio agotado como del micelio (Fazenda et al. 2008).



## **2.12 Fermentación en estado sólido**

En la actualidad nadie tiene duda de las contribuciones que brindan las fermentaciones a las industrias alimentarias tanto en medio húmedo como en medio sólido (Pastrana 1996). Muchos de los procesos que se usan hoy en día son el resultado de una adaptación de modernas tecnologías de fermentación aplicadas a la fabricación de alimentos tradicionales como el pan, queso, cerveza y vino (Pastrana 1996). A diferencia de los cultivos sumergidos donde los nutrientes se encuentran solubles en el medio líquido, en un estado sólido el sustrato que transforma el microorganismo es un sólido. El cultivo en medio sólido se define como el proceso donde los microorganismos crecen sobre la superficie de materiales sólidos, porosos y humedecidos. La humedad tiene niveles de 0.4-0.9. El material sólido puede ser natural o inerte. A partir del cultivo sólido se han obtenido productos de interés industrial por el cultivo de microorganismos sobre residuos agrícolas. (Nigam y Robinson, 2014). Existen dos tipos de fermentación en estado sólido: la primera de ellas se define a aquellos cultivos en los que el material sólido humedecido actúa como principal fuente de nutrientes y a la vez como soporte para el microorganismo, en ciertas ocasiones el sustrato se enriquece con nutrientes adicionales para ayudar a mejorar la producción. En el segundo tipo de fermentación el soporte es un sólido inerte nutricionalmente que solo sirve como anclaje para el microorganismo.

La mayoría de las enzimas utilizadas en procesos industriales se producen por fermentación en medio líquido o sumergida. (MacCabe et al., 2002). Ya que los costos de recuperación de las enzimas son inversamente proporcionales a la concentración en el medio de fermentación dado en g/L. En los últimos años se han desarrollado nuevos sistemas alternativos para la producción de enzimas por hongos filamentosos como lo es la fermentación en estado sólido (FMS). Mientras que las bacterias y levaduras requieren de gran actividad de agua, los hongos filamentosos pueden crecer a valores más bajos. El bajo nivel de agua favorece la germinación y el crecimiento micelar de los hongos.

### **2.13 Ventajas del uso de fermentación en estado sólido**

- Medios de cultivos simples, ya que el sustrato brinda los nutrientes requeridos o necesarios.
- Rendimientos comparables y en ocasiones superiores a los procesos en medio sumergido.
- Bajos requerimientos de energía
- Fermentadores con menos espaciado, y consecuente menores volúmenes de agua.
- Simplicidad en los diseños de los fermentadores y de su control.
- Mayor facilidad para la aplicación del inoculo, ya que las esporas se pueden utilizar directamente.
- Ambientes similares a donde el microorganismo habita.
- Riesgo menor de contaminación bacteriana.
- Poca necesidad de disolventes para extraer productos.

### **2.14 Inconvenientes del uso de fermentación en estado sólido**

(Pastrana (1996), Costa y col. (2009), Federal, (2007), Santis Navarro, y col (2014):

- Necesidad de molienda o pre hidrolisis parcial de los sustratos.
- Dificultad para poder obtener los niveles adecuados de humedad durante la fermentación.
- Uso de inoculo grande.
- Escases de diseños para la producción de fermentadores.
- Dificultad para poder controlar factores del cultivo como temperatura, pH, y oxígeno libre.
- Ausencia de métodos para determinar un crecimiento microbiano.

## **2.15 Características del sustrato**

En casi todas las fermentaciones en estado sólido el soporte y el sustrato coinciden. Por eso las formulaciones de los medios de cultivo se basa en materiales tales como granos de cereales, residuos agrícolas o forestales (L. Pastrana 1996). Dependiendo del producto que se desee obtener, los sustratos deben de poseer algunas características.

- Insolubles en agua o en la solución de humectación.
- Elevado contenido de carbohidratos y/o proteínas.
- Estructura granular que permita la adhesión y penetración del microorganismo.
- Baja formación de masas durante la incubación, baja aglomeración de micelio.

En el tratamiento de efluentes existe otra estrategia la cual consiste en utilizar materiales de soporte inertes que son impregnados con una solución de sustrato que a su vez actúa como humectante. La solución nutritiva presenta menos problemas, solo es necesario tener precaución con el pH inicial. Destacan materiales de soporte residuos celulósicos agrícolas previamente tratados para desproveerlos de nutrientes (Pastrana et al.,1995).

## **2.16 Factores que influyen en el medio cultivo en sólido**

Existen diversos factores los cuales condicionan o afectan al medio de cultivo en estado sólido. Dichos factores pueden actuar de manera positiva o negativa durante el proceso.

### **2.16.1 Contenido de humedad**

Es el factor más decisivo. El nivel adecuado de humedad depende en sí de la naturaleza del sustrato y los requerimientos del microorganismo (Troller 1980). La influencia de la humedad sobre el crecimiento y las rutas metabólicas del microorganismo está bien sostenida y documentada. El requerimiento de humedad para la producción de metabolitos es superior a la necesaria para el crecimiento, se debe de tener control adecuado de este factor (Sargantanis et al.,1993).

### **2.16.2 Temperatura**

Como una consecuencia de la actividad metabólica de los microorganismos, es que se puedan producir elevaciones de temperatura principalmente en el sustrato. Esto afecta directamente a la germinación, crecimiento, o a la formación directa del producto (Sargantanis et al.,1993).

La temperatura depende también de otras variables como la actividad del agua, los rangos óptimos para la producción de metabolitos se ven ajustados por las variaciones de temperatura que puedan existir (Sargantanis et al.,1993).

### **2.16.3 pH**

En ambos casos de cultivo de fermentación este factor es uno de los más críticos en estos procesos. Los sistemas en estado sólido tienen una estabilidad en este punto. Esto es debido a la capacidad que tienen los sustratos empleados de tampón. Una vez ajustado el pH inicial no se ve la necesidad de seguir monitoreando este factor (Lonsane et al., 1985).

## **2.17 Aplicaciones de la fermentación en estado sólido a la industria alimentaria.**

Las principales aplicaciones de este tipo de fermentación en la industria alimentaria son Una de ellas es la obtención de alimentos aplicando mejoras en el proceso tradicional o en dicho caso implementando nuevos procesos, se incluyen en este grupo prevenir algún deterioro en alimentos, obtener aromas característicos o mejorar la composición nutritiva. Otra es la producción de enzimas para poder emplearse en alguna de las finalidades anteriormente mencionadas. Por último, se aplica este modo de fermentación para la obtención de moléculas que tengan interés en el campo en tecnología de los alimentos, como lo son ácidos orgánicos, colorantes, etc. (L. Pastrana 1996).

## **2.18 Hongos**

Los hongos son organismos eucariotas, se caracterizan por ser inmóviles. No realizan la fotosíntesis ya que son heterótrofos viven a partir de la materia orgánica producida por microorganismos. Pueden reproducirse por esporas o por hifas. También pueden tener septos que son paredes internas que pueden presentar poros para permitir el paso del citoplasma. En los extremos de las hifas es donde se lleva a cabo la asimilación de nutrientes y la excreción de las hidrolasas que son enzimas extracelulares necesarias para la degradación de una gran variedad de substratos complejos. (Herrera y Ulloa, 1998). A diferencia de las plantas la pared celular está compuesta en su mayoría por quitina. Su hábitat es muy diverso, pueden estar presentes en materia orgánica en descomposición del suelo, en ambientes acuáticos, en desiertos, sedimentos marinos, o infectando otros organismos como las plantas, animales y el hombre. No poseen cloroplastos por lo tanto son heterótrofos, incapaces de fabricar su alimento. De acuerdo a su morfología macroscópica y microscópica se dividen en hongos filamentosos, levaduriformes y carnosos (Madigan et al., 2003)

## **2.19 Importancia en Fermentación**

A través de los años los hongos han sido los organismos mayormente utilizados con diversos propósitos y diversos fines. Desde fermentaciones biológicas en la antigüedad, hasta aplicaciones biotecnológicas importantes hoy en día. Como lo son la biorremediación para detoxificar algunos metales en la industria, en la producción de enzimas para la industria alimentaria, entre otras (Arenas, 2011).

## 2.20 Hongos Filamentosos

Están compuestos por hifas o filamentos que se pueden unir y entrelazar de forma abundante hasta formar el micelio que puede verse a simple vista. Las hifas pueden estar divididas por tabiques llamados septos, con la presencia de un núcleo o también pueden ser aseptadas o cenocíticas (con muchos núcleos). El micelio se clasifica en aéreo (o reproductivo), éste crece en la superficie del medio de cultivo y contiene las estructuras reproductivas (conidias o esporas) y el micelio vegetativo, que está dentro del medio de cultivo para absorber y obtener los nutrientes. (Madigan et al., 2003). Los hongos filamentosos secretan un conjunto de enzimas capaces de atacar los componentes de la pared celular vegetal. Estas enzimas han recibido gran atención debido a su potencial de aplicación. En respuesta a la demanda creciente de estas enzimas, se ha impulsado el estudio y la investigación de diferentes microorganismos. Los cuales destacan los hongos filamentosos que son la fuente principal de hidrolasas (celulasas, xilanasas). Los principales géneros incluyen *Aspergillus niger* y *Aspergillus versicolor* principalmente por sus altos niveles de secreción de proteínas, producción de enzimas extracelulares y su fácil recuperación. (De Vries y Visser,2001).

### **2.21 *Aspergillus niger***

*Aspergillus* pertenece a la división *Deutoromycota*, estos mismos corresponden a los hongos filamentosos. A este tipo de hongos hasta la fecha no se les conoce una forma sexuada de reproducción. Los *Aspergillus* dentro de la división pertenecen a la clase de *Hyphomycetes* estos son hongos que son capaces de formar micelios, pero carecen de esporocarpios (Brito Carolina; Elizabeth López 2012). *Aspergillus niger* es la especie que más existe en la naturaleza, destruye material de origen natural en especial que sean abundantes en azúcares, almidones o gomas. (Brito Carolina; Elizabeth López 2012). El ciclo de vida de la especie *Aspergillus* comprende desde una germinación mediante esporas, el crecimiento micelar este se da como una serie de árboles ramificados a nivel microscópico, por último, se presenta la esporulación esta incluye la formación de micelio, aérea de donde se desprenden los racimos de esporas (Brito Carolina; Elizabeth López 2012). Viniestra-González et al., (1993) y Llaralde Corona et al., (1997) mencionan que la producción de enzimas a nivel industrial a partir de *Aspergillus* están asociadas a la producción de micelio llevado a cabo durante la fase llamada vegetativa. Carlsen et al., (1996) describe y caracteriza a la fase vegetativa como el crecimiento exponencial de la biomasa, pues una vez que se ramifica el micelio es capaz que se doble la cantidad de las puntas del micelio que es por donde se lleva a cabo el crecimiento de la biomasa. *Aspergillus niger* es un organismo ampliamente utilizado en la producción de una gran variedad de glucanasas, con un espectro tal que puede lograrse la completa degradación de la celulosa.

### **2.22 Secreción de enzimas por *Aspergillus niger***

Las enzimas son sintetizadas en la superficie del retículo endoplásmico y transportados a través de la membrana al espacio de éste. Las proteínas contenidas en éstos espacios se procesan posteriormente en el aparato de Golgi y en otras vesículas y se secretan al medio ambiente externo de la célula por fusión de las vesículas con la membrana plasmática.

### **2.23 Síntesis de enzimas por *Aspergillus niger***

El proceso de síntesis de enzimas en *Aspergillus niger*, el ARN polimerasa dentro de la célula de éste, se une a centros de ADN específicos denominados promotores, iniciando la síntesis de ARN mensajero (ARN) y la transcripción de un operón. La transcripción se produce en el núcleo y el ARN primario que se transcribe se modifica ampliamente en el núcleo antes de que salga al citoplasma para asociarse con los ribosomas. En el extremo del gen estructural, una región de terminación hace que la ARN polimerasa cese la transcripción y se disocie del ADN.

### **2.24 Enzimas**

Las enzimas son moléculas de naturaleza proteica que catalizan reacciones químicas a muy altas velocidades y con un elevado grado de especificidad, si existiera una ausencia de las enzimas las transformaciones químicas que las células requieren tardarían mucho tiempo en llevarse a cabo o no se efectuarían (Baduí S., 1996). Las enzimas intervienen en los procesos fisiológicos llevados a cabo por organismos vivos, en la cual tienen una elevada especificidad para catalizar un gran número de reacciones de interés práctico, en los sistemas biológicos constituyen las bases de las complejas y variadas reacciones que caracterizan los fenómenos vitales. Es posible que la mayor parte de las estructuras proteínicas celulares esté formada por enzimas, encargadas de las diversas funciones de síntesis, degradación, oxidación, de la actividad vital de los distintos organismos. Alrededor de un 65% de las enzimas que se producen industrialmente están de una u otra manera relacionadas con la industria alimentaria. Las enzimas más utilizadas son las hidrolasas que se componen de amilasas, celulasas, proteasas, glucanasas, lipasas y pectinas.



## **2.25 Enzimas Celulasas**

Las celulasas son enzimas que son capaces de hidrolizar la celulosa, y convertirla en moléculas de glucosa libre. Para la hidrólisis de la celulosa se necesita la acción sinérgica de un grupo de celulasas. El sistema de celulasas típico se compone de tres tipos de enzimas: la endo-  $\beta$ -1,4-glucanasa, exo-  $\beta$ -1,4-glucanasa y la  $\beta$ -1,4-glucosidasa (Martínez-Anaya et. al., 2008).

Los humanos no producimos celulasas y por esta razón la celulosa pasa por el sistema digestivo sin ser digerida y sin poder ser absorbida, Las celulasas son hidrolasas que pueden degradar la celulosa de los alimentos vegetales mejorando el valor nutricional de los alimentos y permitiendo la digestión de parte de la fibra presente en ellos.

### **2.25.1 Endo- $\beta$ -1,4-glucanasa**

Este tipo de enzimas hidrolizan regiones internas de la cadena celulolítica principalmente en regiones amorfas, generando celooligosacáridos; celobiohidrolasa, que remueve celobiosas de las extremidades del polisacárido, incluyendo la forma cristalina. Altera la estructura cristalina y expone las cadenas de polisacáridos de celulasas individuales.

### **2.25.2 Exo- $\beta$ -1,4-glucanasa**

Esta enzima libera glucosa de las extremidades reductoras, parte de 2 a 4 unidades de glucosa desde los extremos produciendo disacáridos (celobiosa) (de Vries et al., 2001; Aro et al., 2005).

### 2.25.3 $\beta$ -glucosidasas

Hidrolizan la celobiosa a glucosa generando fuente de carbono de un fácil metabolismo.

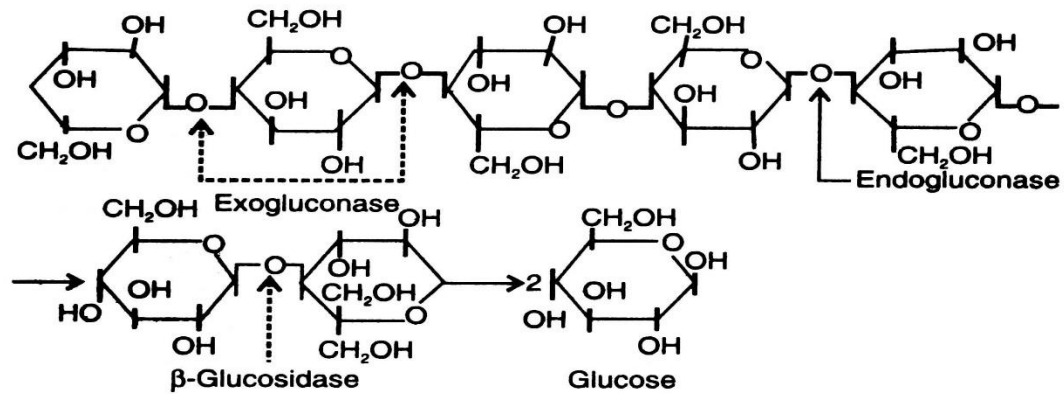


Figura 6. Degradación enzimática de la celulosa

Las  $\beta$ -glucosidasas son enzimas hidrolíticas que actúan sobre los enlaces glucosídicos  $\beta$  (1-4) de oligosacáridos, originando como producto final monómeros de glucosa.

Cuando aumenta el grado de polimerización de los oligosacáridos disminuye la afinidad de esta enzima ya que se inactiva sobre los polímeros. Las  $\beta$ -glucosidasas también poseen actividad transferasa por lo que en ocasiones pueden formar compuestos de mayor tamaño que los oligosacáridos iniciales, esto determina su utilización (Casablanca Alarcon et., al 2011). Otra cualidad de estas enzimas es el hidrolisis de compuestos glucosilados y se aplica en la industria de zumos de frutas y sus derivados (Palmeri *et al.*, 2007). También tienen una aplicación en la producción de etanol a partir de residuos agrícolas (Sue *et al.*, 2006). Todas las aplicaciones que posee esta enzima hace que se promueva su investigación, buscar el mejoramiento en su producción y ayudar a disminuir la contaminación en el ambiente y planeta.

## **2.26 Uso de las Celulasas**

Hoy en día estas enzimas tienen muchas aplicaciones en la industria alimentaria, como la extracción y clarificación de zumos vegetales, extracción de aceite de oliva o mejora de la calidad de los productos de panadería. También tienen importancia en la industria de la cerveza y el vino. También se utiliza en otros campos, como la alimentación animal, la lavandería, textil y papel.

Industria textil: remoción de impurezas y modificación de propiedades físicas de las fibras de celulosa.

Lavandería: formulación de detergentes debido a su capacidad de para modificar la superficie celulítica del hilo de las prendas.

Pulpa y papel: actúan como reforzadores de los blanqueadores aplicados y reducen el tiempo de refinación.

Industria de alimentos: extracción y clarificación de jugos, néctares y purés de frutas y vegetales. Mejoran la calidad de los cereales y aceite de oliva.

Cervecería y vino: crean un complejo de óptima maceración, mejoran su estabilidad, rendimiento del hidrolisis y filtrabilidad.

## **2.27 Diseño Experimental**

Los diseños experimentales son una herramienta muy poderosa alrededor del mundo de la ciencia; en cuanto a mejorar un producto o algún tipo de proceso. Los métodos que proponen los diseños experimentales han encontrado una amplia aplicación en diversas disciplinas (Montgomery, 2005). La aplicación de los diseños experimentales y sus técnicas para desarrollar nuevos procesos resulta en:

- Tratar de mejorar los procesos de producción
- Reducir la variabilidad de los procesos de producción
- Disminuir, tiempos y costos (Montgomery, 2005).

Se aprende a través de una serie de actividades en las cuales se hacen conjeturas sobre un proceso, se realizan experimentos para poder generar datos; entonces se usa la información que se obtuvo del experimento para establecer nuevas conjeturas, las cuales recaerán en nuevos experimentos y así sucesivamente.

Pasos para establecer un diseño experimental

- Reconocimiento del problema
- Seleccionar la variable de respuesta
- Seleccionar los factores y niveles
- Selección del tipo de diseño
- Llevar a cabo el experimento
- Análisis los datos estadísticamente
- Conclusiones y recomendaciones

## **2.28 Selección del diseño experimental**

Para poder seleccionar un diseño hay que tener en cuenta ciertas consideraciones, como el tamaño de las muestras, orden en la ejecución de los ensayos y determinar si existen restricciones implicadas. También es importante tener en mente los objetivos que se quieren alcanzar (Montgomery, 2005).

## **2.29 Diseño Experimental Box-Behnken**

Un diseño de Box-Behnken es un tipo de diseño de superficie de respuesta, por lo tanto, no tiene un diseño factorial. Este tipo de diseños presentan combinaciones de tratamientos que están en los puntos medios de los bordes del espacio experimental y requieren por lo menos tres factores continuos. El diseño Box-Behnken permite una estimación muy eficiente de los coeficientes de primer y segundo orden. Como suelen tener menos puntos de diseño, suelen ser menos costos de realizar que otro tipo de diseños compuestos con el mismo número de factores. Cuando se elige utilizar este tipo de diseños es para obtener una optimización dentro del proceso.

### 3. Materiales y Métodos

#### 3.1 Material Biológico y acondicionamiento

La cepa de *Aspergillus niger* GH1 se tomó de la colección perteneciente a la Universidad Autónoma de Coahuila (UAdeC). Se almaceno en una suspensión crioprotectora a  $-20^{\circ}\text{C}$ . El hojaseñ fue recolectado en una zona que se encuentra en el sur de la ciudad de Saltillo, Coahuila, México. El hojaseñ se recolecto tal y como estaba con tallos, ramas y follaje, ya en el laboratorio el follaje fue separado, seleccionado y colocado en charolas para ser deshidratado en una estufa a  $50^{\circ}\text{C}$ .



Figura 7. Cepa de *Aspergillus niger* y hojaseñ nativo

### 3.2 Producción de esporas de *Aspergillus niger* GH1

En matraces Erlenmeyer de 250 ml se coloca agua destilada, extracto de soya y PDA todo en medio estéril después se le agrega una alícuota de 40 uL de suspensión crioprotectora de *Aspergillus niger* GH1 y se pasa a incubar por 48 horas a 30°C. Al termino del tiempo se recolectan las esporas usando Tween 80 al 0.1 M. Una vez que se tenían todas las esporas acumuladas se realizó un conteo de estas, se llevó acabo con el fin de establecer el contenido de esporas para posteriores análisis y procesos en el experimento. El conteo se realizó en la cámara de Neubaver con diluciones 1:50 y 1:100.



Figura 8. Propagación de esporas

### **3.3 Condiciones de cultivo**

Se consideró esta fermentación como control testigo para después establecer un diseño experimental de optimización. En bandejas de aluminio identificadas (12.5cm de diámetro x 3cm de altura), se colocaron 15 gr. de follaje de hojaseen previamente seleccionado. El medio mineral base que se utilizó contenía (g/l) 2.5 de NaNO<sub>3</sub>, 1.0 de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 de KCl, 0.5 de MgSO<sub>4</sub>. El medio se esterilizo en autoclave a 121°C x 15 minutos y se dejó enfriar. Consecuente se humedecieron las charolas donde se tenía el material vegetal (hojaseen) se les agrego 35 ml de medio mineral para un ajuste de humedad de 70% y se le añadió la cantidad de esporas correspondientes de  $2 \times 10^7$  por gramo de sustrato. Al cabo de un tiempo de 36 horas de fermentación en incubadora ajustada a 30°C se sacaron las charolas y se procedió a la obtención de extractos enzimáticos crudos agregándoles 35 ml de buffer de citratos 0.1 M pH 4.6. y aplicando vacío con una bomba.



### 3.4 Ajuste del cultivo fúngico al diseño experimental de optimización

Se utilizó un diseño experimental Box-Behnken para buscar una optimización en la particular producción de  $\beta$ -Glucosidasa. Este tipo de diseño permite una estimación de los coeficientes de primer y segundo orden. Los diseños de Box-Behnken no tienen puntos axiales, por lo que se puede estar seguro de que todos los puntos de diseño se encuentran dentro de la zona de operación segura.

Cuadro II. Ajuste del diseño experimental y sus variables

Inóculo	pH	Humedad	Inóculo	Ph	Humedad
1.00E+08	5.5	80	3.00E+08	5.5	75
1.00E+08	5.5	80	3.00E+08	5.5	75
1.00E+08	5.5	80	3.00E+08	5.5	75
3.00E+08	5.5	75	5.00E+08	5.0	75
3.00E+08	5.5	75	5.00E+08	5.0	75
3.00E+08	5.5	75	5.00E+08	5.0	75
3.00E+08	6.0	80	1.00E+08	5.0	75
3.00E+08	6.0	80	1.00E+08	5.0	75
3.00E+08	6.0	80	1.00E+08	5.0	75
3.00E+08	5.5	75	3.00E+08	5.0	70
3.00E+08	5.5	75	3.00E+08	5.0	70
3.00E+08	5.5	75	3.00E+08	5.0	70
1.00E+08	6.0	75	5.00E+08	5.5	80
1.00E+08	6.0	75	5.00E+08	5.5	80
1.00E+08	6.0	75	5.00E+08	5.5	80
5.00E+08	5.5	70	1.00E+08	5.5	70
5.00E+08	5.5	70	1.00E+08	5.5	70
5.00E+08	5.5	70	1.00E+08	5.5	70
5.00E+08	6.0	75	3.00E+08	5.0	80
5.00E+08	6.0	75	3.00E+08	5.0	80
5.00E+08	6.0	75	3.00E+08	5.0	80
3.00E+08	6.0	70			
3.00E+08	6.0	70			
3.00E+08	6.0	70			

### 3.5 Preparación del medio mineral

Se preparó el medio mineral con las sales y sus cantidades correspondientes. Se ajustaron 3 matraces con diferente cantidad y diferente pH, y pasaron a esterilizarse.



Figura 9. Esterilización de medio mineral

### 3.6 Siembra

Tuvimos 3 tratamientos por triplicado a diferente humedad, pH y cantidad de esporas. Se ingresaron los factores y sus tres respectivos niveles al diseño experimental y nos brindó las combinaciones que había que aplicar para cada tratamiento y para cada charola.

Cuadro III. Factores y niveles

Inoculo	1.00E+08	3.00E+08	5.00E+08
pH	5.0	5.5	6.0
Humedad	70%	75%	80%



Figura 10. Siembra

### 3.7 Recuperación de extractos enzimáticos

Se añaden a cada charola 15 ml de buffer de citrato (pH 4.6), se vacían en vaso Bercelius y se mezcló con el material fermentado. Posteriormente se filtra usando embudo buchner con una bomba de vacío y recuperando el extracto en un matraz Kitasato. El líquido filtrado (extracto enzimático) se coloca en vasos de plástico y se lleva congelar.

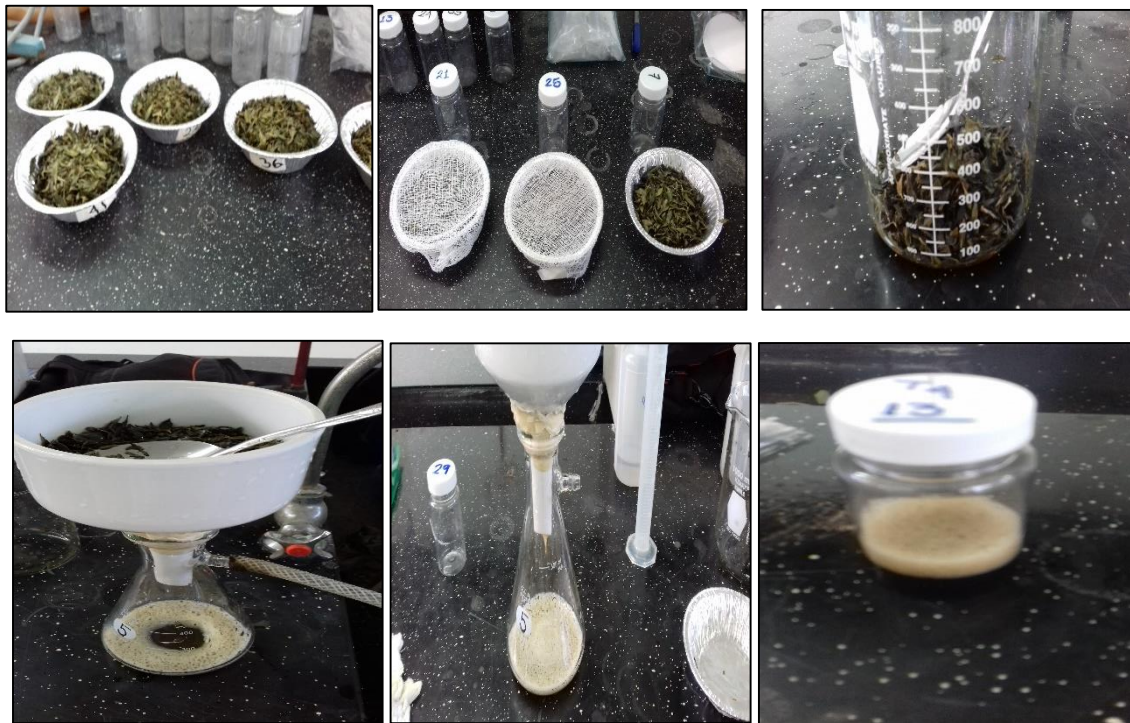


Figura 11. Recuperación de extractos enzimáticos

### 3.8 Preparación de Buffer de Citratos

Para preparar un litro de buffer de citratos 0.1M, se pesan 21.01g de ácido cítrico y 29.41g de citrato de sodio. Cada uno se disolvió por separado en matraz con un volumen de 500 ml de agua destilada. Una vez bien disueltos se agregan 255 ml de solución de ácido cítrico en otro matraz y 245 ml de solución de citrato de sodio, este volumen se ajusta a 1000ml agregando agua destilada. Por último, se verifica que le pH fuera el indicado de 4.6.

## 4. Métodos Analíticos

### 4.1 Actividad $\beta$ -Glucosidasa

En tubos de ensaye se colocaron 400 uL de búfer de citratos 0.1M pH 4.6. Después se agregan 50 uL de p-nitrofenil- $\beta$ -D glucopiranosido 9 M. Se incuban en agua a 50°C para agregarles 50 uL del extracto enzimático ya diluido a 1:10. Se dejan pasar 10 minutos, se agregaron 50 uL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.1M para detener reacción. La absorbancia fue medida en espectrofotómetro a 400 nm y así medir el p-nitrofenol liberado. Se define una unidad de  $\beta$ -Glucosidasa como la cantidad de enzima necesaria para liberar un micromol de p-nitrofenol por cada unidad de tiempo. Para llevar a cabo esta medición de se tuvieron que preparar blancos de enzima, blancos de sustrato y la mezcla de reacción.



Figura 12. Análisis de actividad  $\beta$ -glucosidasa

### 4.2 Actividad Endoglucanasa

Se prepara reactivo carboximetil al 2% y se colocan 200 uL en tubos de ensaye, pasan a incubarse en agua 50°C. Una vez que se llegó a esa temperatura se agregan 50 uL de extracto enzimático diluido 1:10. Al paso de 10 minuto, se les agrega reactivo DNS para detener reacción y poder cuantificar los azúcares reductores que se liberaron por la vía enzimática. Al terminar de agregar el DNS los tubos deben ser puestos a ebullición por un tiempo de 5 minutos. Después se dejan enfriar a temperatura ambiente y se les agrega 2 ml de agua destilada. La medición de azúcares se toma a 540 nm. Una unidad de endo  $\beta$ -1,4-glucanasa se expresa como la cantidad de enzima que se necesita para poder liberar un micromol de glucosa por unidad de tiempo. Fue necesario preparar blancos de enzima, blancos de sustrato y la mezcla de reacción.

### **4.3 Actividad Exoglucanasa**

Se prepara celulosa al 2%. En tubos de ensaye se colocan 200 uL de celulosa al 2%. Se incuban en agua hasta alcanzar una temperatura de 50°C, ya teniendo esta temperatura se agregan 50 microlitros de extracto enzimático diluido 1:10. Se deja pasar 10 minutos de reacción y se agrega el reactivo DNS para que la reacción se detenga. Se llevan los tubos a ebullición por 5 minutos, y se dejan enfriar a temperatura ambiente posterior se les añade 2 ml de agua destilada. Se mide la cantidad de azúcares en un espectrofotómetro a 540 nm.

### **4.4 Fenoles Hidrolizables Totales**

Para la determinación de fenoles hidrolizables totales se basó en la técnica reportada por Wong-Paz et al. (2015). Se empleó el reactivo de Folin-Ciocalteu. Se preparan tubos de ensaye donde se agregan 200 uL de muestra, después se les añade 200 uL de reactivo Folin más 200 uL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.01M. Por último, se le agregan 2 ml de agua destilada a cada tubo. Las absorbancias se toman en espectrofotómetro a 750 nm. Para esto primero se realizó una curva patrón usando ácido gálico.

## **5. Cinética de condiciones más favorables**

Se realizó una prueba de cinética con las condiciones más favorables que resultaron del experimento. Se llevó a cabo para validar los valores obtenidos en la producción de  $\beta$ -Glucosidasa. Las condiciones más favorables fueron pH 5.5, inóculo o cantidad de esporas  $3 \times 10^8$ , humedad de 75%.

### **5.1 Preparación del medio de fermentación**

Se monitorearon 9 tiempos desde 0 horas a 48 horas de fermentación por triplicado; es decir tres repeticiones por cada monitoreo de análisis. El monitoreo se realizó cada 6 horas. En charolas de aluminio identificadas de (12.5cm de diámetro x 3cm de altura) se pesaron 15 gr de hojaseñ, se les agregó el medio mineral ajustado a un pH de 5.5 y estéril, la cantidad de esporas que fue  $3 \times 10^8$ . Una vez inoculado se lleva a incubar a una temperatura de 30°C. El monitoreo se realizó cada 6 horas.

### **5.2 Recuperación de extracto enzimático crudo**

Ya cumplido el tiempo de fermentación de cada tratamiento, se procedió a recuperarse el extracto enzimático. A cada charola se le añadió 15 ml de búfer de citratos ajustado a pH 4.6 y se filtra al vacío con una bomba. El extracto enzimático se coloca en vasos de plástico con tapa bien identificados y se lleva a congelar para posteriores análisis.

## **5.3 Técnicas Analíticas**

### **5.3.1 Actividad $\beta$ -glucosidasa**

En tubos de ensaye se deposita un volumen de 800 uL de búfer de citrato ajustado a pH 4.6 (0.1M). Después se les añade 100 uL de p-nitrofenil-B-D-glucopiranosido (0.009M). Se colocan a incubar en agua caliente hasta alcanzara una temperatura de 50°C. Teniendo esa temperatura se les agrega 100 uL de extracto enzimático diluido 1:10. Se deja reaccionar por 10 minutos, para detener la reacción se les adiciona carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 0.1M. Se toman las absorbancias a 940 nm en espectrofotómetro.

### **5.3.2 Fenoles Hidrolizables Totales (Folin)**

Se basó en la técnica reportada por Wong-Paz et al. (2015). Se emplea el reactivo de Folin-Ciocalteu. En tubos de ensaye se agregan 200 uL de muestra, más 200 uL de reactivo Folin más 200 uL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.01M. Al último se le agregan 2 ml de agua destilada. Las absorbancias se toman a 750 nm.

### 5.3.3 Determinación de fibra por el método ácido detergente (FDA)

Para preparar la solución de ácido detergente se necesita ácido sulfúrico 1 N estandarizado, se agregan 20 g de trimetil cetil bromuro de amonio por litro de solución. Se pesa 1 gr de muestra y se coloca en vasos Berzelius posterior se les agrega 100 ml de solución ácido detergente a temperatura ambiente y 2 ml de decahidronaftaleno. Se coloca el vaso con su contenido en el aparato de reflujo (Labconco), a temperatura media. Cuando empieza a hervir se baja la temperatura para que la ebullición sea suave y se monitorea un tiempo de una hora. Una vez que transcurre el tiempo de digestión, los vasos se sacan y se filtran con vacío a través del crisol de vidrio capa porosa que debe de estar a peso constante. Se lava con agua caliente hasta eliminar toda la solución detergente acida. Se pasa a quitar el vacío y se agrega 1 ml de acetona grado reactivo y se vuelve aplicar vacío. Se sacan en la estufa a 103°C por un periodo de dos horas. Se deja secar en la estufa, después enfriar en desecador por 25 minutos y se pesó.

Calcular

$$\%FDA = \frac{\text{peso de crisol con fibra} - \text{peso de crisol solo}}{\text{g de muestra}} \times 100$$



### 5.3.4 Determinación de Lignina

Se utilizó el residuo (fibra) de la determinación del ácido detergente se utilizó. Se colocaron los crisoles que contenían la fibra ácido – detergente en una bandeja de vidrio de poca profundidad que tenga una capa de 1 cm de espesor de agua fría, (la fibra dentro de los crisoles no se debe mojar). Se agrega a los crisoles 25 ml de solución combinada de permanganato de potasio sin llenarlos demasiado. Con una varilla de vidrio en cada crisol se remueve la muestra deshaciendo los grumos y bañar todas las partículas que se adhieren a las paredes internas de crisol con la solución de  $\text{KMnO}_4$ . Se dejan los crisoles 90 más 10 minutos a temperatura de 20 – 25 °C agregando si fuera necesario una cantidad adicional de la solución combinada de permanganato de potasio. El color morado lo debe conservar constantemente. Se colocan los crisoles en los matraces de filtración, y se filtra toda la porción líquida. Los crisoles se colocan en bandejas limpias de vidrio o porcelana y se llenan hasta la mitad con la solución desmineralizada, después de 5 minutos se filtra y se vuelve a llenar con la solución anterior. Posterior se lavan las paredes internas de los crisoles, el color de la fibra debe ser blanco. (Tiempo 20 – 30 minutos). Se llenan y se lavan los crisoles con alcohol etílico al 80%, y pasa a filtrar. Los crisoles se dejan durante la noche a 105°C en la estufa. Al día siguiente se sacan y dejan enfriar en un desecador y se pesan. El contenido de lignina se calculó en base a la pérdida de peso original de la fibra obtenida por el método ácido – detergente.

Calcular

$$\% \text{ Lignina} = \frac{\text{peso de la fibra ac. detergente} - \text{peso de la fibra X KMnO}_4}{\text{Peso de la muestra original seca}} \times 100$$

### 5.3.5 Determinación de Celulosa

Se incinera la muestra procedente de la determinación de lignina a 500°C durante 3 horas en mufla, se deja enfriar y se pesa. La pérdida de peso fue equivalente al contenido de celulosa.

Calcular

$$\% \text{ Celulosa} = \frac{\text{crisol} + \text{residuo de fibra x KMnO}_4 \text{ (estufa)} - \text{crisol} + \text{ceniza (mufla)}}{\text{Peso de la muestra original seca}} \times 100$$

### **5.3.6 Determinación de fibra detergente neutro (FDN)**

Se pesa 1 g de muestra y deposita en un vaso de Berzelius. Se añaden 100 ml de la solución detergente neutro. El vaso con su contenido se coloca en el aparato de reflujo (Labconco). Cuando la solución empieza a hervir se reduce la temperatura para que la ebullición fuera suave durante una hora. Por separado se puso un crisol de capa porosa de vidrio a peso constante. Una vez que transcurre el tiempo de hervor se filtra con vacío a través del crisol de vidrio. Se lava con agua caliente, enjuagando previamente el vaso. Se retira el vacío y se añade 1 ml de acetona desprendiendo la capa de fibra con el agitador. Se deja la acetona aproximadamente 1 minuto y se aplica nuevamente vacío. Posteriormente se lava el exterior del crisol con agua destilada desde una piseta. Se coloca en estufa para secar a 103 – 105 °C durante toda la noche. Al día siguiente se saca la muestra y se coloca en un desecador durante 25 minutos y al final se pesa.

Cálculo:

$$\text{F.D.N.} = \frac{\text{peso de crisol más fibra} - \text{peso de crisol solo}}{\text{g de muestra}} \times 100$$

### **5.3.7 Determinación de hemicelulosa**

El contenido de hemicelulosa se realiza mediante una diferencia de resultados obtenidos previamente.

Cálculo:

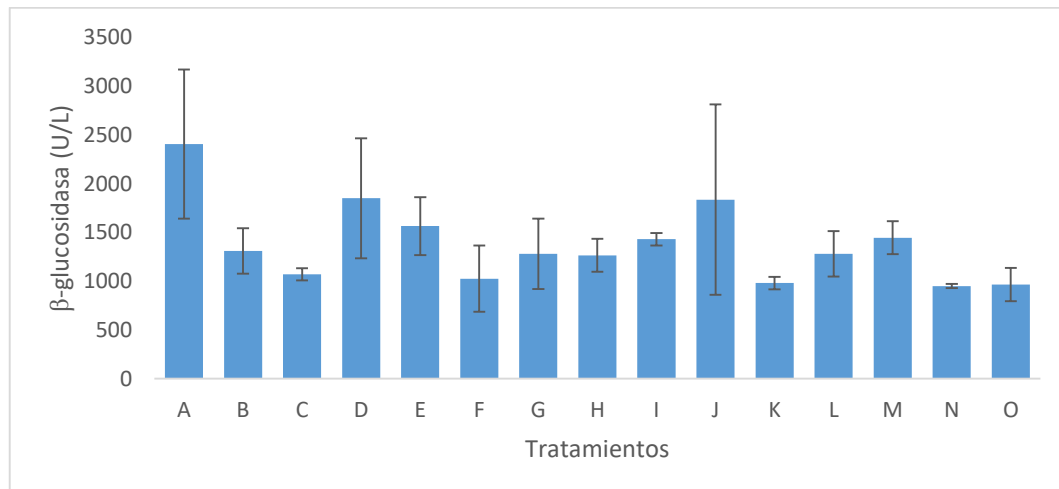
$$\% \text{ Hemicelulosa} = \text{FDN} - \text{FDA}$$

## 6. Resultados y Discusión

### 6.1 Actividad $\beta$ -Glucosidasa

En la siguiente figura se muestran los tratamientos con su actividad enzimática promedio. Se promediaron las actividades de las tres repeticiones para cada tratamiento.

Figura 13. Actividad enzimática para cada tratamiento analizado.



Como se puede ver en la figura 14 el tratamiento que presento una mayor producción enzimática fue el A con un total de 2406 U/L, esto se obtuvo de promediar las 3 repeticiones y sus actividades que se analizaron para cada tratamiento.

El tratamiento con menor producción fue el N con un promedio de 951 U/L. En los resultados obtenidos se observa que la humedad es el factor que más influye en la producción enzimática seguido del pH. La humedad es muy importante y crucial para que el hongo pueda ejercer su crecimiento y posterior degradar el sustrato. El pH de igual manera es de importancia para que las enzimas se produzcan, en estudios anteriores en el laboratorio se vio que a pH mayores a 7 los hongos pierden viabilidad.

En un estudio previo que se llevó a cabo en este mismo laboratorio la máxima producción enzimática fue de 731.3 U/L y la mínima de 538 U/L, si lo comparamos con los resultados obtenidos en este experimento se ve que hubo un incremento considerado en cuanto a la producción de la enzima  $\beta$ -glucosidasa.

Villena y Gutiérrez-Correa (2003:79), establecieron la estructura y fisiología de los hongos filamentosos, demostraron que la formación de la biopelícula ocurre en tres fases:

- Adsorción, que se ve favorecida por la hidrofobicidad de las esporas de *A. niger*
- Fase de crecimiento inicial y desarrollo que inicia con la germinación de la espora esto ocurre entre las 4 y 10 h.
- Por último, la fase de maduración, en la cual la densidad de biomasa se incrementa notablemente desde las 48 h hasta las 120 h.

En estudios realizados por Díaz et., al (2015) se demostró que la cepa de *Aspergillus niger* tiene la capacidad de secretar el complejo enzimático de celulasas para hidrolizar los enlaces beta 1-4 y liberar dextrinas, maltosas y/o glucosa a partir de compuestos glucosilados y celulosa.

Figura 14. Actividad enzimática con niveles de humedad y niveles de pH.

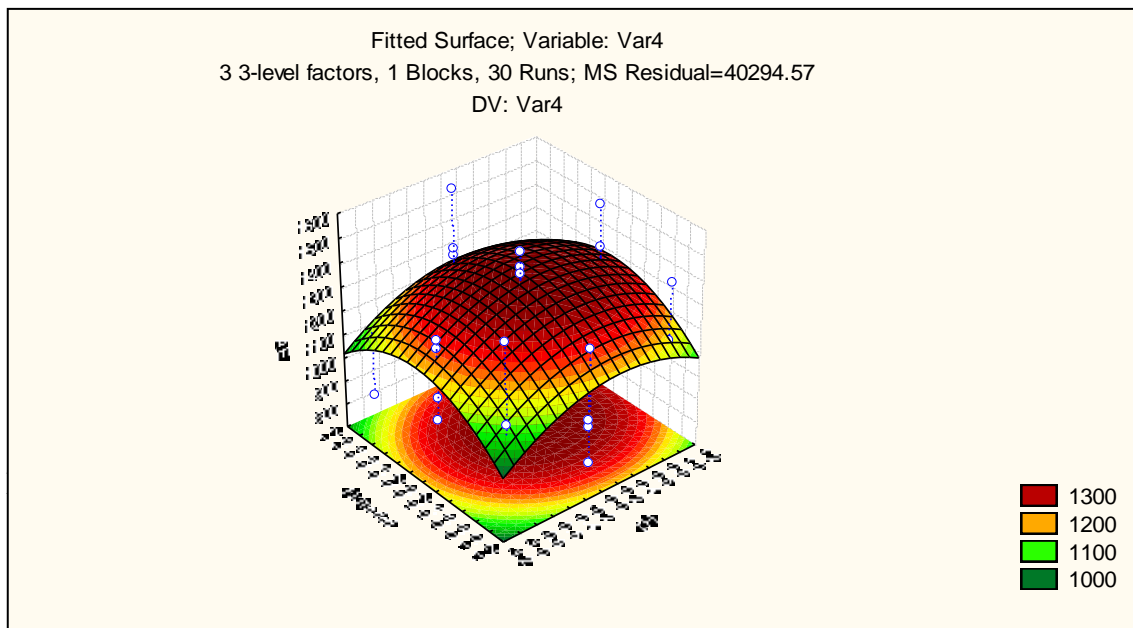


Figura 15. Actividad enzimática con niveles de inóculo y de pH.

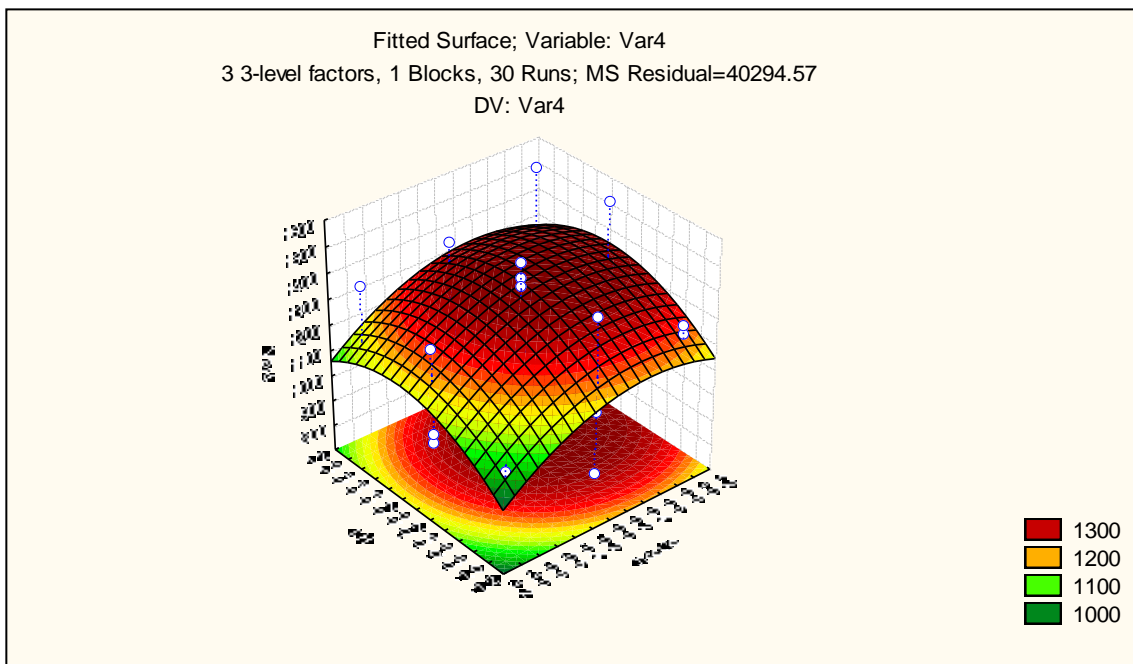
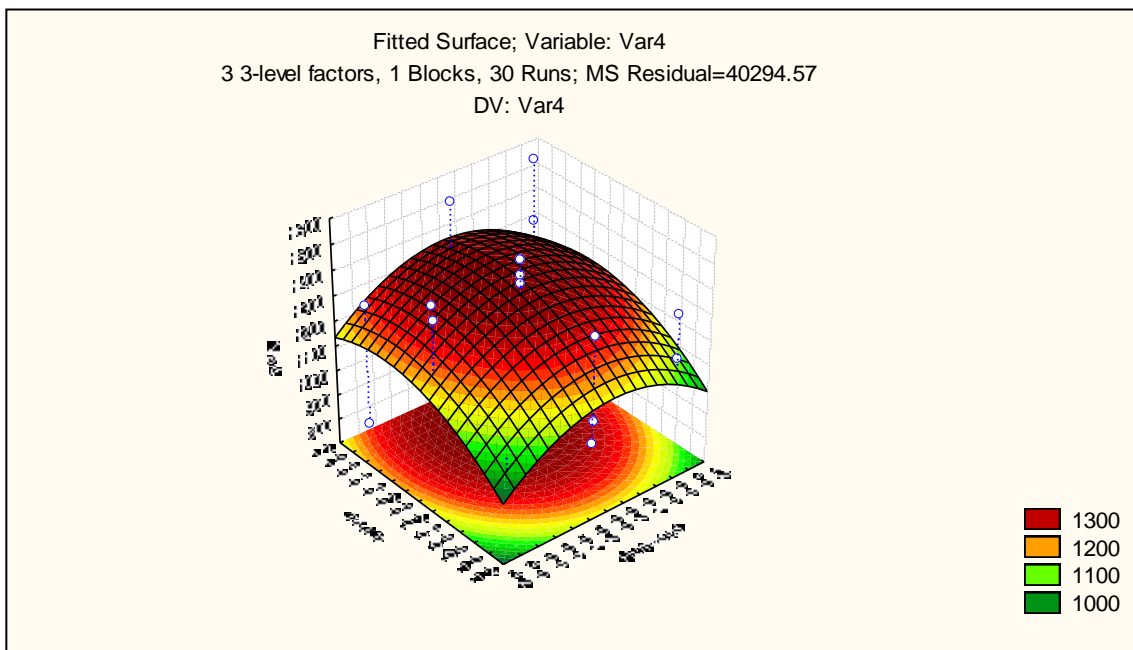


Figura 16. Actividad enzimática con los niveles de inoculo y humedad.



Como podemos observar en las tres graficas anteriores se representan los niveles donde mejor se expresó la actividad enzimática, se combinan los tres factores entre si y se busca el punto máximo de actividad.

Se observa que en las tres graficas lo que predomina en los tres factores son los niveles medios de estos, en el caso de la segunda grafica el inoculo tiende a salirse un poco del centro, sin embargo, se mantiene en los márgenes que permite el experimento.

El uso de este tipo de diseños experimentales permite con gran eficacia identificar los valores óptimos y la relación que existe entre dos variables (Junior et al., 2014).

Costa, M., Reyes y col., (2009) Demostraron en su trabajo que la enzima muestra mayor actividad a niveles de pH 6 con una tendencia hacia bajo. Levin y Forchiassin (1997). En estudios realizados obtuvieron los pH óptimos para la producción de las tres enzimas que intervienen en la degradación de la celulosa 3.1, 4.1 y 5.3 para endoglucanasa, exoglucanasa y  $\beta$ -glucosidasa respectivamente. Para nuestro caso y la producción de endo y exo el pH no favorecía a estas enzimas, pero para la  $\beta$ -glucosidasa el pH estaba dentro de los rangos óptimos.

Los niveles utilizados en este trabajo fueron de 5 a 6, de acuerdo a la literatura citada nos indica que estamos en los rangos para obtener la máxima expresión buscada. El pH suele ser de gran importancia para que una enzima pueda expresarse, por eso es importante seleccionar los niveles adecuados de este parámetro.

Lisboa García et al., (2015) reporta que a pH mayores que 7 los hongos filamentosos pierden viabilidad y eficacia, también indica que este tipo de hongos se desarrollan mejor a pH ácidos y promueven la producción de enzimas celulolíticas.

El contenido de humedad también es de suma importancia para que el hongo pueda crecer y posterior degrade el sustrato que tenga disponible. Para encontrar la humedad optima se debe de tener por lo menos un avance en el conocimiento del microorganismo y el sustrato a utilizar; para establecer nuestros niveles de humedad tomamos como referencia una investigación previa que se llevó en el laboratorio donde trabajamos, partiendo de ahí se decidió aumentar un nivel con respecto a los valores del anterior trabajo.

(Rodríguez y col., 1986) reconoce que no es solo la cantidad de agua que se tenga presente en el sistema la que ejerce influencia sobre la eficiencia del proceso, sino el

carácter de las interacciones que presente el agua y el medio sólido que se tenga disponible

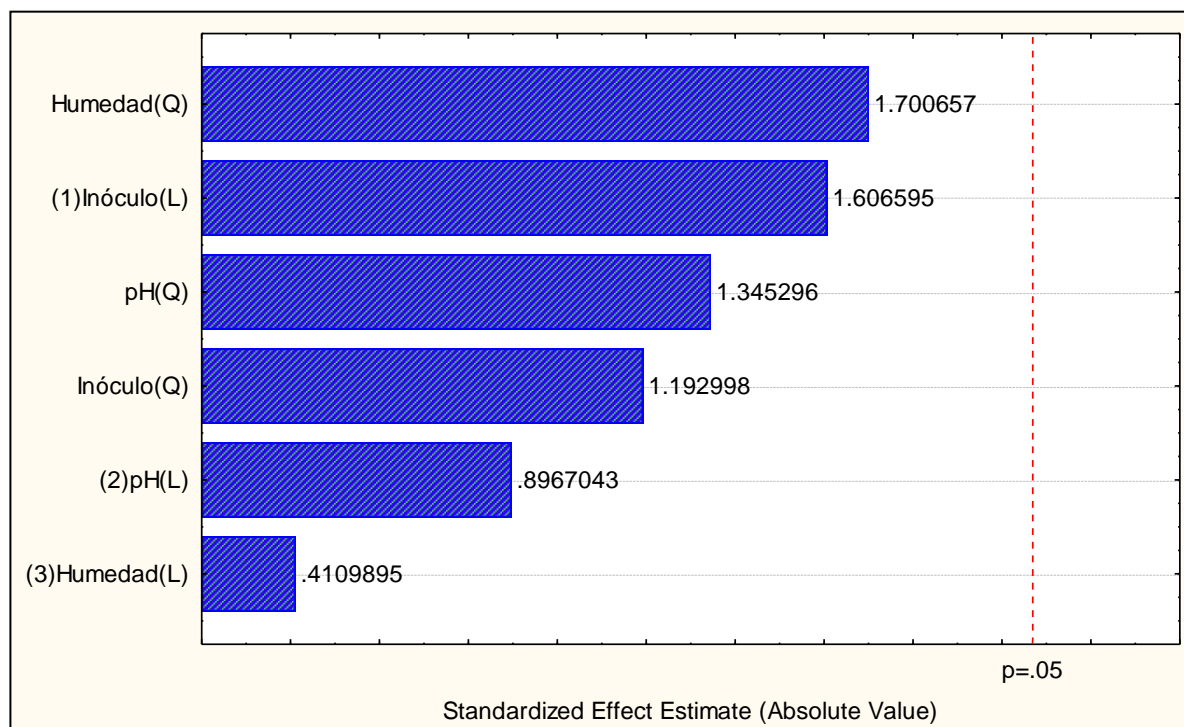
La cantidad de inóculo es el factor más importante ya que de él depende la cantidad de sustrato que se degrada. A mayor cantidad de esporas de *Aspergillus niger* se promovería un mayor crecimiento del hongo y una mayor degradación del material vegetal; mas no con esto se presentará una alta actividad enzimática (Tovar-Castro y col., 2005)

A medida que el inóculo es menor la fase (lag) es mayor, y contrario si el inóculo es mayor la fase de retardo (lag) será menor en contraste para esto existe una diferencia cercana de 12 horas (Tovar-Castro y col.

## 6.2 Análisis de Varianza

Los resultados se analizaron con un ANOVA, se consideró el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y un diagrama de Pareto.

Figura 17. Análisis de Varianza (Diagrama de Pareto)



Esta grafica representa el análisis de varianza cuadrático y lineal que se realizó con una probabilidad de 95%. Como se observa ninguna de las tres variables humedad, inoculo y pH mostro ser significativa para el proceso. La variable que más respuesta presenta es la humedad cuadrática, seguido del inoculo y por último el pH, pero sin llegar a ser significativas. Esto se puede ratificar en el cuadro 6 donde se representa la actividad enzimática de los 15 tratamientos, y se observa que el tratamiento “A” es el que sobresale con condiciones altas de humedad, condiciones medias de pH y condiciones bajas de inoculo, los tratamientos que sobresalen un poco son los que presentan las condiciones altas de humedad.

Sin embargo, si comparamos todos los tratamientos podemos observar que ninguno tiende a sobresalir en demasía, por lo que se dice que las tres variables y sus niveles seleccionados en este diseño no fueron capaz de mostrar alguna relevancia o



significancia en el proceso. En cuanto al coeficiente de determinación ( $R^2$ ) obtuvimos un resultado de 0.28 que pasado a porcentaje da un valor de 28%. Este valor nos da un estimado de que tan fiable es el modelo o que tanto se puede ajustar este mismo a las variables utilizadas. Nuestro valor de  $R^2$  28% es un resultado bajo a lo que se esperaba, esto se vio influenciado porque al analizar los tratamientos por duplicado se presentaba que un resultado del otro se alejaba considerablemente y al promediarlo resultaba un valor muy alto, así sucedió en la mayoría de los tratamientos; y al correr los datos en el análisis estadístico nos brindó una correlación demasiado baja para el experimento.

### **6.3 Actividad Exoglucanasa y Endoglucanasa**

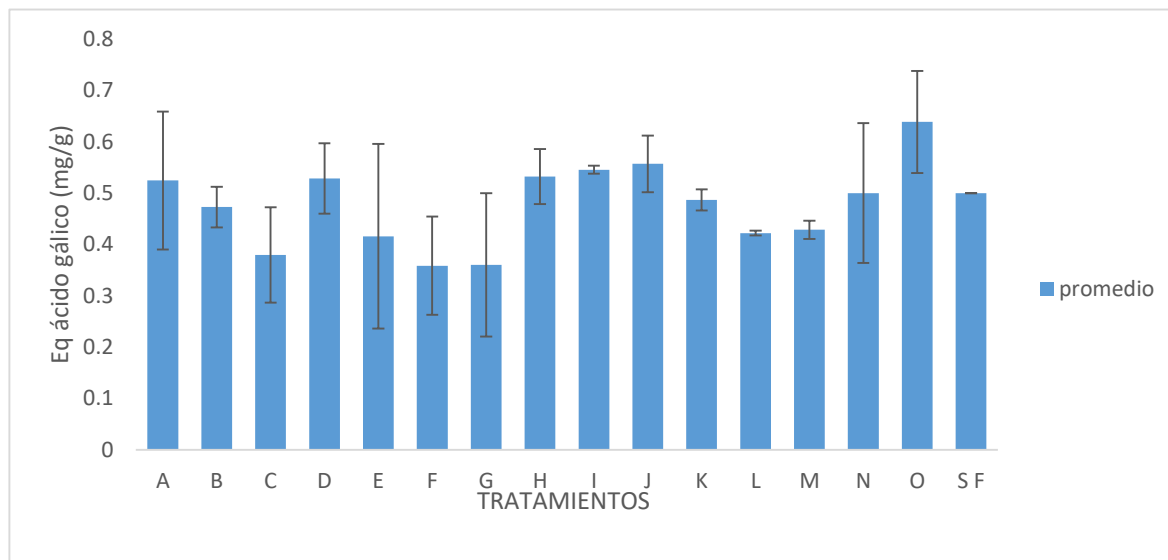
Los resultados de estas dos actividades enzimáticas resultaron dar una actividad de 0 o incluso en algún tratamiento la actividad se mostró negativa. Esto se debe que en el diseño experimental se manipularon las condiciones o factores que favorecían a la actividad  $\beta$ -Glucosidasa los cuales son la cantidad de inóculo, el contenido de humedad y las concentraciones de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . En estudios previos realizados en el laboratorio se comprobó que los factores que inciden o promueven actividad Endo son el tamaño de inóculo y las sales  $\text{NaNO}_3$  y  $\text{MgSO}_4$ . En cuanto al tamaño de inóculo se necesita de una cantidad menor de esporas para no ocasionar una posible competencia en la producción de micelio y en el presente experimento se realizó lo contrario la cantidad de inóculo se aumentó. En relación al  $\text{NaNO}_3$  era necesario aumentar los niveles de esta sal, sin embargo, no se movieron porque para la actividad  $\beta$ -glucosidasa que era la de interés los niveles eran los adecuados. La sal  $\text{MgSO}_4$ , en el estudio previo presentaba una tendencia negativa por lo que era necesario disminuir sus niveles, pero si se hacía esto afectaría la actividad de la enzima de principal interés es por eso que se mantuvieron los mismos niveles de esta sal.

En el diseño experimental utilizado se manipularon solamente los factores que tenían incidencia e influían en la actividad  $\beta$ -glucosidasa, es debido a esto que las enzimas Endoglucanasa y Exoglucanasa presentaron una actividad nula en el presente experimento.

## 6.4 Fenoles Hidrolizables Totales

Para la determinación de fenoles hidrolizables totales se basó en la técnica reportada por Wong-Paz et al. (2015)

Figura 18. Esta grafica representa los tratamientos con sus promedios respectivos



En la gráfica se observa que el tratamiento con el más alto promedio es el O con un promedio de 0.64 mg/g, y el que obtuvo el menor promedio fue el tratamiento F con 0.36 mg/g. En un experimento que se realizó tiempo atrás en el laboratorio de trabajo, se obtuvo un resultado de 5 mg/g si lo comparamos con nuestro resultado más alto existe mucha diferencia, esto quiere decir que en nuestro experimento hubo una mayor degradación de estos compuestos debido a que el tiempo de fermentación fue mayor y la cepa fúngica se adaptó mejor al experimento.

Wong-Paz et al. (2015) ha reportado un valor de polifenoles de 110.3 mg/g presente en *Flourensia cernua* nuestro valor más alto fue de 0.64 mg/g después del proceso de fermentación; con esto podemos decir que la cepa de *Aspergillus niger* GH1 empleada en nuestro experimento es capaz de degradar estos compuestos polifenolicos y liberar compuestos más pequeños como los monofenoles. La diversidad de compuestos fenólicos presentes en la materia vegetal, así como sus estructuras químicas ha

despertado gran interés por su importancia, esto ha generado que se investigan y desarrollen nuevas técnicas analíticas para la cuantificación e identificación de estos compuestos.

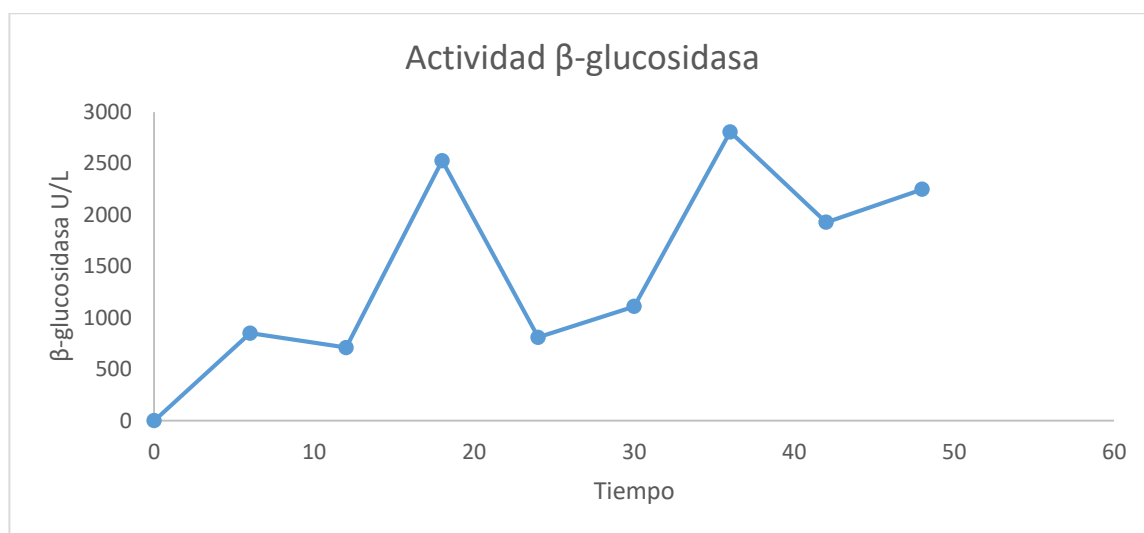
Una de las primeras técnicas analíticas es la espectrofotometría, sin embargo, no muestra suficiente información desde un punto de vista nutricional; es por eso que se ha recurrido a técnicas un poco más modernas y precisas como las cromatografías. Estas técnicas permiten la identificación individual de cada uno de los polifenoles de interés nutricional.

## 6.5 Resultados de cinética

### 6.5.1 Actividad $\beta$ -glucosidasa

Se observa que la mayor actividad se presentó en el tiempo de 36 horas, esto quiere decir que el hongo utilizado se adaptó y logro producir el número más alto de la enzima en ese tiempo. La medición de la rapidez del crecimiento de un hongo, nos indica la capacidad que tiene este microorganismo para colonizar el tipo de sustrato que se utiliza en el proceso de fermentación (Gutiérrez-Sanchez y col. 1999). El sustrato que utilizamos en nuestro experimento fue el hojaseñ y se pudo ver que el hongo si creció y colonizo el sustrato en un tiempo relativamente corto.

Figura 19. Grafica de actividad enzimática con relación al tiempo de fermentación.



Esta grafica nos muestra el comportamiento o la tendencia que la actividad enzimática sigue con relación a cómo van pasando las horas de fermentación. Observamos que la máxima actividad enzimática se presentó en las 36 horas, (Villena y Gutiérrez-Correa 2003) indican que *Aspergillus niger* tiene una fase de crecimiento inicial o germinación de esporas entre las 4 y 10 horas cuando se logra percibir la colonización total de la superficie, y alcanza una fase de maduración a partir de las 36 horas donde la densidad de la biomasa se incrementa notablemente. En nuestro experimento coincide con lo dicho por estos autores ya que *Aspergillus niger* mostro una mejor producción de biomasa y de enzimas en el rango de las 36 horas.

### 6.5.2 Celulosa, Lignina, Hemicelulosa

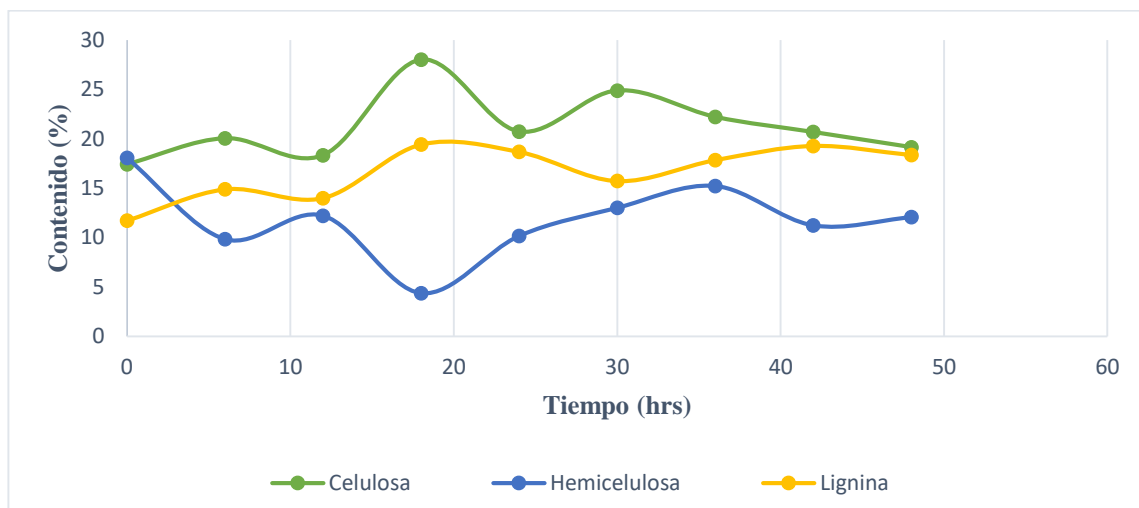
Se obtuvieron dos mediciones de estos parámetros por duplicado uno con el hojaseen nativo y el otro después de un tratamiento de fermentación de 36 horas.

Cuadro V. Contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina del hojaseen sin fermentar y tratamiento Box-Behnken.

	Box-Behnken 36 horas		Hojaseen Sin fermentar	
	Promedio	Desvest	Promedio	Desvest
<b>Celulosa</b>	<b>19.67</b>	<b>1.187</b>	<b>13.05</b>	<b>1.251</b>
<b>Lignina</b>	<b>17.5</b>	<b>0.354</b>	<b>11.19</b>	<b>2.355</b>
<b>Hemicelulosa</b>	<b>10.215</b>	<b>7.223</b>	<b>21.39</b>	<b>15.125</b>

Se analizó el tiempo de 36 horas del experimento principal ya que en este tiempo se presentó la máxima actividad de la enzima  $\beta$ -glucosidasa, también se analizó el hojaseen sin fermentar para poder tener y hacer un comparativo en cuanto al contenido inicial de fibra y un total de degradación al final.

Figura 20. Comportamiento de celulosa, hemicelulosa y lignina en cinética



Los resultados nos indican que la celulosa aparentemente no fue degradada, sino que al final de las 48 horas de fermentación los niveles se mantuvieron estables o en el mismo rango que en el tiempo inicial. Cuando se midió actividad endo y exo los resultados fueron nulos es por eso que los niveles de celulosa permanecieron estables, ya que estas dos enzimas son las iniciadoras de la degradación de la celulosa. Ya que la celulosa es un polisacárido y su degradación a un monosacárido (glucosa) implica la acción de estas enzimas, la endo  $\beta$ -glucanasa, que hidroliza celulosa a glucooligosacáridos; la exo  $\beta$ -glucanasa, que libera celobiosa de la celulosa; y la  $\beta$ -glucosidasa libera glucosa (Sziárto, et al., 2004).

Al no presentarse actividad de la primera enzima del complejo las subsecuentes eran más difícil de que pudieran mostrarse. Las endoglucanasas, es una de las celulasas que actúa de forma aleatoria sobre los enlaces  $\beta$ -1,4 glucosídico presentes en las regiones amorfas de la celulosa, esto provoca la disminución del grado de polimerización de la celulosa y la creación de nuevos extremos no reductores, que sirven de sustrato para la posterior acción de exoglucanasas e incremento de azúcares reductores como glucosa (Ovando-Chacón y Waliszewski, 2005).

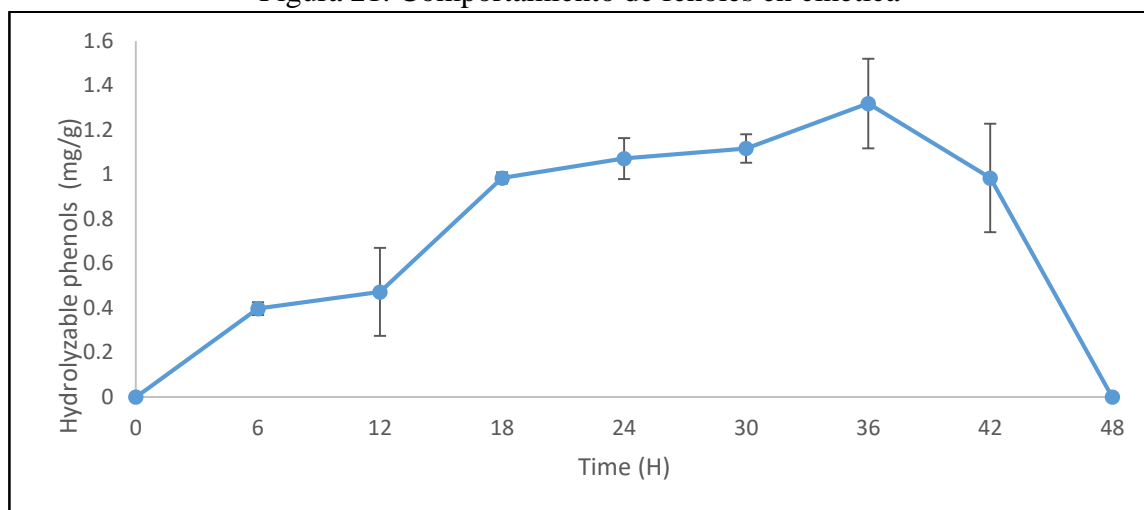
Igualmente, para la lignina no ocurrió una degradación, al término del experimento se obtuvo un aumento en el porcentaje. Al ocurrir la degradación de otros compuestos el material vegetal se ajusta a un nuevo porcentaje total, esto hace que los compuestos que no se degradan aumenten en cuanto a su porcentaje mas no en su cantidad. (Leonowicz et al., 1999), indica que la lignina es un polímero insoluble, y es el producto de la condensación de varias moléculas y no es formado por una vía enzimática, lo cual determina que su estructura sea altamente variable, dependiendo el tipo de planta, su estado fenológico y tasa fotosintética. Al ser insoluble su degradación se presenta con una dificultad mayor. Las enzimas que degradan a la lignina pertenecen al género oxidativo y actúan vía mediadores no-proteicos en contraste a las células y hemicelulasas hidrolíticas (Ortiz, M L. 2009).

En el caso de la hemicelulosa ahí si se presentó un consumo, se redujo casi a la mitad después de las 36 horas de fermentación. Con esto quiere decir que el complejo enzimático que se está produciendo afecta directamente a la hemicelulosa. El componente hemicelulósico principal de los materiales vegetales son los xilanos. Este polímero es de peso molecular más bajo que la celulosa y contiene ramificaciones con cadenas laterales cortas de azúcares diferentes fácilmente hidrolizables (Hendriks y Zeeman, 2009)

### 6.5.3 Fenoles Hidrolizables Totales

Para la determinación de fenoles hidrolizables totales se basó en la técnica reportada por Wong-Paz et al. (2015)

Figura 21. Comportamiento de fenoles en cinética



En la gráfica observamos que se presentó una mayor acumulación de estos compuestos en el tiempo de fermentación de 36 horas, esto coincide con la mayor acumulación de enzima  $\beta$  glucosidasa, ya que también la mayor expresión fue a las 36 horas. Wong-Paz et al. (2015) ha reportado que la planta *Flourensia cernua* sin recibir ningún tratamiento presenta valores altos de polifenoles, nosotros al someter a esta planta a un tratamiento fermentativo su número de polifenoles se redujo ya que hubo una degradación de ellos en el proceso. Y el hongo utilizado *Aspergillus niger* mostro su mejor adaptación en las 36 horas de fermentación esto coincide con lo dicho por (Villena y Gutiérrez-Correa 2003) donde indica que el hongo presenta su maduración a partir de las 36 horas y por lo tanto la densidad de la biomasa se incrementa.



## 7. Conclusiones

En el presente trabajo se cumplió con el objetivo principal, se mejoró la producción de la enzima  $\beta$ -glucosidasa utilizando un recurso agroindustrial presente en nuestra zona. *Aspergillus niger* GH1 puede ser ampliamente utilizado para degradar sustratos y producir metabolitos. La biodegradación fúngica y la presencia de la enzima  $\beta$ -glucosidasa hacen que *Flourensia cernua* sea una buena materia prima para producir este tipo de enzimas. *Aspergillus niger* también demostró ser capaz de degradar otros compuestos como los polifenoles y con esto se eliminan taninos que era otro objetivo del experimento, esto tiene aplicación en la nutrición animal ya que al eliminar los taninos de este material vegetal se aumenta su digestibilidad y lo aprovechan mejor los animales. A pesar de que la celulosa no sufrió aparente degradación eso no afectó la actividad de la enzima de interés. En cuanto a la optimización del proceso ahí si las variables seleccionadas no mostraron ser significantes en el diseño experimental y la correlación nos dio un valor demasiado bajo debido a las variaciones que presentaron las repeticiones de los tratamientos. Algunas de las celulasas comerciales provienen de especies de *Aspergillus*, sin embargo, la cantidad de enzima producida por estos microorganismos es todavía motivo de múltiples investigaciones, puesto que existen múltiples factores involucrados, entre ellos el medio de cultivo, que juega un rol determinante al momento de la expresión de la enzima.

## 8. Perspectivas del Experimento

De acuerdo a los resultados obtenidos en cuanto a la producción de la enzima y la utilización de un diseño experimental de este tipo se podrían plantear algunas perspectivas:

- Manipular otras variables (buscar más fuentes de nitrógeno).
- Plantear otra cinética con más tiempos monitoreados de fermentación.
- Concentrar el extracto enzimático para posteriores análisis.
- Someter a *Flourensia cernua* a un pretratamiento.
- Extraer compuestos fenólicos para fermentar y analizar si se presenta actividad enzimática libre de fibra.

## 9. Literatura citada

Acercamiento biotecnológico de *Flourensia cernua* para la producción de enzimas celulolíticas en cultivo fúngico sólido. (n.d.).

Aguilar, C.L.; Suzuki, C. N.; Paredes Guzmán, J. F.; Alencar, S. M.; Park, Y. K. Transformación de las B-glicosil isoflavonas por fermentación semi-sólida de harina de soja con *Aspergillus oryzae*.

Arredondo, V. D. G. (1981). Componentes de la vegetación del Rancho demostrativo Los Ángeles. Tesis licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo Coahuila México

Aregullin, M., & Rodríguez, E. (1983). Phytochemical studies of the genus *Flourensia* from the Chihuahuan desert. Department of Developmental and Cell Biology. University of California. Irvine, CA. 92717. Oct. Proceedings, Second Chihuahuan Desert Symposium

Arenas Guzman Roberto., (2011) *Micología Medic Ilustrada*. México, D.F. Mc Graw Hill. Cuarta Edicion 2011. ISBN: 978-607-15-0510-1

Aro N., T Paloma & M Penttila, (2005). Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiol. Rev.* 29:719-739.

Badui, D. S. (1996). *Química de los Alimentos*. Editorial Alhambra Mexicana S. A. México D. F. pag. 139, 281, 287.

Baraldo Junior, A., Borges, D. G., Tardioli, P. W., & Farinas, C. S. (2014). Characterization of beta -Glucosidase Produced by *Aspergillus niger* under Solid-State Fermentation and Partially Purified Using MANAE-Agarose. *Biotechnology Research International*, 2014, 317092.

Carlsen, Morten, Spohr, Andres B, Nielsen, Jens, Villadsen, John (1996) Morphology and physiology of an alpha-amylase producing strain of *Aspergillus oryzae* during batch cultivations, *Biotechnol Bioeng* 49:266-276.

Correl, D.S. and Johnston M.C. 1970. Manual of the vascular plants of Texas. Texas Research Foundation. Ranner, Texas, USA. 1881 p.

Costa, M., Reyes, A., Martinez, A., & Torres, M. (2009). Obtención de enzimas Hidrolíticas a partir de una cepa del hongo *Aspergillus ficuum* mediante fermentación en estado sólido, 96.

Costa, M., Lerchundi, G., Villarroel, F., & Torres, M. (2009). Producción de enzima fitasa de *Aspergillus ficuum* con residuos agroindustriales en fermentación sumergida y sobre sustrato sólido Phytase production by *Aspergillus ficuum* in submerged and solid state fermentation using agroindustrial waste as support, 73–83.

Couto, S. R. y M. Á. Sanromán (2006). Application of solid-state fermentation to food industry—A review. *Journal of Food Engineering* 76(3): 291-302

Díaz, L. A. L., Ríos, M. M., Vargas, E. E., & Moreno, A. (2015). Producción de celulasas por *Aspergillus niger* a partir de bagazo de caña de azúcar en biorreactor aireado, 6781, 39–49.

Dillon, M. D. 1976. Two species of *Flourensia* (Asteracea) From North Central México. *The South Western*. 21: 145-149.

de Vries R.P. & J. Visser. (2001). *Aspergillus* Enzymes Involved in Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides. *Microbiol. Mol. Biol.Rev.*65:497-522.

Edelmann A. and B. Lendl. (2002). Toward the Optical Tongue: Flow-Through Sensing of Tannin-Protein Interactions Based on FTIR Spectroscopy. *Journal of American Chemistry Society*. 124 (49): 14741-14747

Fazenda, M. L., R. Seviour, et al. (2008). Submerged Culture Fermentation of "Higher Fungi": The Macrofungi. *Advances in Applied Microbiology* 63: 33-103

Federal, D. (2007). *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 6, 33–40.

García F., Martín F y Rodríguez J.J., (1984) Posibilidades de aprovechamiento de la lignina en la industria química. *Ingeniería Química*. 10, 249-254.

García, N. F. L., da Silva Santos, F. R., Gonçalves, F. A., da Paz, M. F., Fonseca, G.G., & Leite, R. S. R. (2015). Production of  $\beta$ -glucosidase on solid-state fermentation by *Lichtheimia ramosa* in agroindustrial residues: Characterization and catalytic properties of the enzymatic extract. *Electronic Journal of Biotechnology*, 18(4), 314–319. <http://doi.org/10.1016/j.ejbt.2015.05.007>

Giraldo, Germán A., Padilla Sanabria, Leonardo, García Alzate, Luz Stella, Sánchez Tarquino, Lady Tatiana, Degradación de celulosa en desechos orgánicos domésticos en los estratos sociales 1 y 2 utilizando *Aspergillus niger* Ingeniería de Recursos Naturales y del Ambiente [en línea] 2012, (enero- ISSN 1692-9918).

Graminha, E. B. N., Gonçalves, A. Z. L., Pirola, R. D. P. B., Balsalobre, M. A. A., Da Silva, R., & Gomes, E. (2008). Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. *Animal Feed Science and Technology*, 144(1-2), 1–22.: [//doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.09.029](http://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.09.029)

Herrera T, Ulloa M., (1998). El Reino de los Hongos. México: UNAM, Fondo de Cultura Económica.

Introduction to Statistical Quality Control, 5th Edition by Douglas C. Montgomery. 3 Copyright (c) 2005 John Wiley & Sons, Inc.

Kelly, Catherine T. Fogarty, William M. Microbial enzymes and biotechnology 2nd edition. England: Elsevier Science Publishers, 1990.

Khanbabaee K. and van Ree T. (2001). Tannins: Classification and Definition. *Natural Products Reports*. 18:641-649.

Kumar, P.K.R. y Lonsane, B.K. (1989), Microbial production of gibberellins: state of the art. *Adv. Appl. Microbiol*, 28:30-140

Larralde-Corona, C.P., Lopez-Isunza, F., Viniegra Gonzales, G. (1997) Morphometric evaluation of the specific growth rate of *Aspergillus niger* grown in agar plates at high glucose levels. *Biotechnol. Bioeng*. 56:287-294

L. Pastrana (1996) Fundamentos de la fermentación en estado sólido y aplicación a la industria alimentaria, Ciencia y Tecnología Alimentaria, 1:3, 4-12, DOI: 10.1080/11358129609487556

Levin, L. y Forchiassin, F. 1997. Efecto de las condiciones de cultivo sobre la producción de celulasas por *Trametes trogii*. Revista Argentina de Microbiología. 29, 16-23.

Lonsane, B.K., Ghildyal, N. P., Budiartman, S y Ramakrishina, S. V. (1985) Engineering aspects of solid state fermentation. Enzyme Microb. Technol., 7:258.65

Los estratos sociales 1 y 2 utilizando *Aspergillus niger* Ingeniería de Recursos Naturales y del Ambiente [en línea] 2012, (enero- ISSN 1692-9918).

Luz Tovar-Castro, Mariano García-Garibay y Gerardo Saucedo-Castañeda (2005) Departamento de Biotecnología, UAM Iztapalapa, San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, Iztapalapa, México D.F. C.P. 09340. Tel/Fax: (55) 58 04 65 54,

MacCabe, A.P., M.T. Fernández-Espinar, L.H de Graaff, J. Visser and D. Ramon, (1996). Identification, Isolation and sequence of the *Aspergillus nidulans* xln C gene encoding the 34 kDa xylanase. Gene., 175:29-33.

Madigan, M. Martinko J & Parker, J. (2003). Brock biología de los microorganismos. (10 ed.). Madrid: Pearson Prentice Hall.

Manach C. and Scalbert A. 2005. Polyphenols: Food sources and bioavailability. Am. J. Clin. Nutr. (79) 727-747

Martínez-Anaya C, Balcázar-López E, Dantán-González E, Folch-Mallol JL. Celulasas fúngicas: Aspectos biológicos y aplicaciones en la industria energética. Rev. Latinoam Microbiol 2008; 50 (3-4) mo, E. Química orgánica básica y aplicada. Volumen 2. De la molécula a la industria. ED. Reverté. 1ªEd. España.

Mondini, C.; F. Farnasier y T. Sinicco. 2004. Enzymatic activity as a parameter for the characterization of the composting process. Soil Biol. Biochem. 36, 1587-1594.

Narro, A., David, J., & Ramírez, G. (1999). Universidad autónoma agraria Antonio narro, 1–65.

Oliveira, L.A.; L.F.A. Porto, y E.B. Tambourgi. 2006. Production of xylanase and protease by *Penicillium janthinellum* CRC 87M-115 from different agricultural wastes. *Bioresource Technol.* 97(6), 862-867.

Ortiz, M. L. (2009). Aproximaciones a la comprensión de la degradación de la lignina. *Orinoquia*, 13(2), 137–144.

Ovando-Chacón s, Waliszewski K. 2005. Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. *Universidad y Ciencia*. Vol. 21(42): 111-127. Disponible en: [www.ujat.mx/publicaciones/uciencia](http://www.ujat.mx/publicaciones/uciencia).

Palmeri, R., Spagna, G. 2007. b-glucosidase in cellular and acellular form for winemaking application. *Enzyme Microb Technol* 40: 382-9.

Pastrana, L Gonzales. P Pintado. J., y Murado, M.A. (1995). Interactions affecting gibberelic acid production in solid state culture: A factorial study. *Enzyme Microbiol. Technol.*, 17:784-90.

“producción de xilanasas por *aspergillus* sp. en fermentación sumergida y fermentación en medio sólido.” (n.d.).

RAO, P. V. Jagaramon, K. y Lakshmanan, C. M. (1993). Production of lipase by *Candida rugosa* in solid state fermentation 1: Determination of significant proces variables. *Process Biochem*, 28 (6):385-90.

Saber, M.S. 2001. Clean biotechnology for sustainable farming. *Eng. Life Sci.* 6, 1-7.

Sánchez-Ramírez, J., Martínez-Hernández, J. L., Segura-Ceniceros, P., López, G., Saade, H., Medina-Morales, M. A., ... Ilyina, A. (2016). Cellulases immobilization on chitosan-coated magnetic nanoparticles: application for *Agave Atrovirens* lignocellulosic biomass hydrolysis. *Bioprocess and Biosystems Engineering*.

Sánchez A., E.E. 2001. Aplicación y usos potenciales de la tanasa y taninos. Monografía QFB. U. A. de C. Saltillo. Coa

Santis Navarro, A. M., Barrena Gómez, R., & Gea Leiva, T. (2014). Estudio de la producción de lipasas por fermentación en estado sólido a partir de residuos ricos en grasas. Impacto ambiental y posibles usos

Sargantanis, J., Karim, M. N., Murphy, V. G. Ryoo D. y Tengerdy, R. P. (1993). Effect of operating conditions on solid substrate fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 42:149-58.

Sue, M., Yamazaki Kana, Yajima Shunsuke, Nomura Taiji, Matsukawa Tetsuya, Iwamura Hajime, Miyamoto Toru. 2006. Molecular and Structural Characterization of Hexameric  $\beta$ -D-glucosidases. *Wheat and Rye Plant Physiology* 141: 1237-1247

Szjártó N, Szengyel Z, Liden G, Reczey. 2004. Dynamics of cellulase production by glucose grown cultures of *Trichoderma reesei* RUT-C30 as a response to addition of cellulose. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Vol. 113: 115-124.

Sztern D. Y M. Pravia. 1999. Manual para la elaboración de compost, bases conceptuales y procedimientos. Organización Panamericana de la Salud, Montevideo.

Vilches, L. (2000). Determinación de las actividades exoglucanasas de cepas fúngicas nativas de las provincias de Huaylas y Huaraz. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima

Villena G, Gutiérrez Correa M. 2003. Biopelículas de *Aspergillus niger* para la producción de celulasas: algunos aspectos estructurales y fisiológicos. *Rev. Perú. Biol.* Vol. 10(1): 78-87. Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor San Marcos. Versión Online ISSN 1727-9933.

Viniegra-Gonzales, G. Saucedo-Castañedo, G., Larralde-Corona, C.P., Lopez-Isunza, F., Favela-Torres, E (1993) Symmetric branching model for the kinetics of mycelial growth. *Biotech. Bioeng.* 42:1-10

Troller, J.A (1980) Influence of water activity microorganism in food. *Food Technol.*, Moy: 76-80

Wong-Paz, J., Contreras-Esquivel, J.C., Rodríguez-Herrera, R., Carrillo-Inungaray, M. 2015. Total, phenolic content, in vitro antioxidant activity and chemical composition of plant extracts from semiarid Mexican region. *Asian Pac. J. Trop. Med.*, 8, 104 – 111.



Zhang P, Himmel M, Mielenz J. 2006. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnology advances*. Vol. 24: 452–481.

Hendriks, A. T. W. M., Zeeman, G. (2009). Pretreatments to enhance digestibility of lignocellulosic biomass. *100*: 10- 18.

Hu, Z., Wen, Z. (2008). Enhancing enzymatic digestibility of switchgrass by microwave-assisted alkali pretreatment. *Biochemical engineering journal*. 38: 369 – 378.