

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



Estudio cinético de la producción de enzimas fúngicas mediante la fermentación de
residuos de *Agave salmiana*.

Por:

MARIA DEL PILAR MARIN CORTEZ.

TESIS

Presentada como requisito parcial
para obtener el título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS.

Saltillo, Coahuila, México

Diciembre 2017

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

Estudio cinético de la producción de enzimas fúngicas mediante la fermentación de
residuos de *Agave salmiana*.

Por:

MARIA DEL PILAR MARIN CORTEZ.

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS.

Aprobada por el Comité de Asesoría:



Dr. Armando Robledo Olivo
Asesor Principal



Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez
Coasesor



M.C. Sarahi del Carmen Rangel Ortega
Coasesor



Dr. José Duñez Alanís

Coordinador de Ciencia Animal

Saltillo, Coahuila, México
Diciembre 2017

DEDICATORIA

En primer lugar a **mis papas Salomón y Elena**, por guiarme con amor y cariño en mi vida y traspasarme un poco de conocimiento con buenos consejos
Gracias por enseñarme y transmitirme valores los que hacen de mí una persona de bien.

"A veces el hombre más pobre deja a sus hijos la herencia más rica".

Ruth E. Renkel.

A mis hermanos, **David y Adriana** por sus regaños y consejos que me han servido para mejorar en los ámbitos académicos y sociales. Gracias por compartir valioso tiempo conmigo.

A mi **Amor** por tratar de enseñarme a ser constante, optimista y mejor persona. Gracias por darme tu apoyo, cariño y por aprender juntos para ser exitosos en la vida.

"El éxito es ese viejo trío: habilidad, oportunidad y valentía".

Charles Luckman.

Mis **amigas(os)** que forman parte de mi vida por otorgarme su amistad, comprensión y por brindarme su apoyo académico y en mi vida diaria.

AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por guiarme en los momentos difíciles, te doy gracias por darme la fortaleza, paciencia y sabiduría para alcanzar mi meta, sobre todo por acompañarme en mi vida.

A mi **Alma Terra Mater** por brindarme los recursos necesarios para tener una educación superior y así forjarme como un profesional.

Al **Dr. Armando Robledo Olivo** por brindarme consejos, apoyo para realizar y llevar a cabo este trabajo, por el tiempo empleado para resolver mis dudas y así con mis dudas resueltas trasmitirme conocimiento.

A mis **Maestros** que en cada clase contribuían en mi formación profesional y moral.

INDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	I
AGRADECIMIENTOS	II
RESUMEN	VI
1. INTRODUCCIÓN	1
2. JUSTIFICACIÓN	2
3. HIPÓTESIS.....	3
4. OBJETIVOS	3
4.1 . Objetivo general	3
4.2. Objetivos específicos	3
5. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
5.1. Fermentación de residuos lignocelulolíticos.....	4
5.2. El Agave Salmiana como fuente de lignocelulosa.....	5
5.3. Aprovechamiento de residuos de agaves.	6
5.4. Enzimas fúngicas.	7
5.5 . Celulasas.	7
5.6. Xilanasas.....	8
5.7. Lacasa.....	8
5.8. Azucares Fermentables.	9
6. METODOLOGÍA.....	11
6.1. Obtención de Agave Salmiana.....	11
6.2. Microorganismo utilizado.....	11
6.3. Conteo de esporas.....	11

6.4.	Preservación del microorganismo.	12
6.5.	Fermentación de Agave Salmiana.	12
6.6.	Obtención del extracto enzimático.	12
6.7.	Tratamiento de muestra en seco.	13
6.8.	Determinación de azúcares totales por el método de fenol-sulfúrico.	13
6.9.	Determinación de azúcares reductores por el método de Miller.	13
6.10.	Preparación de solución amortiguadora Acetato sódico 50 mM (pH 6.0).	14
6.11.	Determinación de actividad xilanasa.	14
6.12.	Preparación de solución amortiguadora citrato-fosfato (pH 5.0).	15
6.13.	Determinación de actividad endo-glucanasa.	15
6.14.	Tratamiento del solido fermentado.	16
6.15.	Determinación de fibra cruda, detergente neutro y detergente acido.	16
7.	RESULTADOS	17
7.1.	Obtención y caracterización de los residuos de Agave Salmiana	17
7.2.	Evaluación de la degradación de compuestos lignocelulosicos de los residuos de Agave Salmiana por el efecto de fermentación la fúngica.	18
7.3.	Evaluación cinética de la producción de enzimas hemicelulolíticas derivado de la fermentación en estado sólido de residuos de Agave Salmiana.	22
8.	CONCLUSIONES	24
9.	BIBLIOGRAFÍA	25

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Imagen de Agave en México.....	5
Figura 2. Residuos de Agaves de la elaboración de bebidas alcohólicas.....	6
Figura 3. Complejo celulosa-hemicelulosa-lignina de la célula vegetal.....	9
Figura 4. Contenido de fibra cruda en el sólido fermentado.....	18
Figura 5. Contenido de fibra detergente neutro(FDN) en el dolido fermentado.....	19
Figura 6. Contenido de fibra detergente acido en el sólido fermentado.....	20
Figura 7. Cinética de degradación de la hemicelulosa.....	21
Figura 8. Cinética de la actividad Endo-celulasa en residuos de <i>Agave Salmiana</i>	22
Figura 9. Cinética de la actividad xilanasa en residuos de <i>Agave Salmiana</i>	23

INDICE DE CUADROS

CUADRO 1. Contenido de carbohidratos en el <i>Agave Salmiana</i>	17
---	----

RESUMEN

En esta investigación se estudió una cinética de degradación de residuos de agave Salmiana por la cepa *Aspergillus niger* por fermentación en un medio sólido. Al Agave Salmiana se le realizaron pruebas como: azúcares totales, azúcares reductores, lignina, celulosa y hemicelulosa para obtener parámetros iniciales de la degradación del material lignocelulósico. Se obtuvo pencas al azar de agave Salmiana las cuales se cortaron en cubos de 1 cm³ y aplicando un secado en estufa, posteriormente se realizó la fermentación sólida en cajas petri, luego se inoculó esporas de *Aspergillus niger* incubado a 30°C. En este periodo se adquirieron tiempos de 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 y 192 h para la obtención de los extractos enzimáticos. Para la determinación de las enzimas hemicelulolíticas se utilizó las metodologías de actividad xilanasa y actividad Endoglucosidasa. Al sólido fermentado se le determinaron fibra cruda, lignocelulosa y hemicelulosa con la ayuda del equipo ANKOM₂₀₀ FIBER ANALIZER. Los resultados obtenidos Las actividades enzimáticas se reportaron en g/L, con incrementos variados los valores superiores en 2.24 xilanasa y 1.89 Endo-celulasa Se obtuvieron actividades enzimáticas que fueron buenas en relación con los compuestos del residuo fermentado, aunque menos que otros materiales vegetales.

Palabras clave: Cinética, *Agave Salmiana*, Fermentación, *Aspergillus Niger* y Enzimas hemicelulolítica

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la industria alimentaria genera una gran cantidad de residuos al hacer la transformación de la materia prima en alimentos o productos de consumo. Sin embargo, este proceso productivo implica un grave problema ambiental, debido a la acumulación de materiales de desecho, los cuales son esparcidos o quemados a cielo abierto. Muchos de los residuos de la industria alimenticia poseen un alto contenido de almidón, celulosa, hemicelulosa, lignina y pectina (Sánchez y Cardona, 2008), los cuales pueden utilizarse como sustratos para la producción de enzimas (Radhika et al., 2013; Binder y Raines, 2010). Las enzimas obtenidas por procesos fermentativos se pueden utilizar en el mismo proceso de producción dentro de la industria alimentaria o en diversos sectores industriales.

Dentro de este ámbito, al aplicar procesos biotecnológicos (empleando microorganismos) en la degradación de los residuos agroindustriales, aparte de obtener el producto deseado en el proceso de elaboración de alimentos, también se obtienen residuos orgánicos tanto sólidos como líquidos. Estos residuos, pueden servir de sustrato para procesos fermentativos (Binder y Raines, 2010), de los cuales pueden obtenerse metabolitos de interés. Las enzimas que tienen más interés en la industria son generalmente empleadas para la clarificación de jugos, dar suavidad o como ablandador de tejidos, además de otras aplicaciones.

En la región sureste de Coahuila, se utiliza como materia prima el *Agave salmiana* (mejor conocido como “maguey pulquero”) para la producción de diversos alimentos, como el aguamiel, el mezcal, el destilado de pulque y el tradicional pan de pulque, que es una industria altamente remunerable en nuestra región, así mismo es utilizado para la alimentación del ganado (Martínez et al., 2007; Martínez, 2013; Gentry, 1972). Durante la producción del mezcal y el alcohol destilado, se generan residuos provenientes de la recolección y procesamiento de las pencas de agave utilizados como materia prima.

Estos residuos se degradan lentamente en el ambiente o se emplean como combustible, y no se les da un uso posterior.

Debido a lo mencionado con anterioridad, es necesario la implementación de tecnologías biológicas que consideren el aspecto económico y ecológico, para cumplir los mismos niveles de producción. La fermentación fúngica sobre los residuos de agave permitirá producir metabolitos de interés industrial, dando un valor agregado a los desechos agroindustriales.

Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo es el de utilizar los residuos del procesamiento del agave como sustrato de fermentación, para la producción de enzimas fúngicas.

2. JUSTIFICACIÓN

El calentamiento global es un problema actual que confronta el planeta por las diferentes acciones como la tala de árboles, las emisiones de gases contaminantes por automóviles y la industrias, la generación de desechos orgánicos e inorgánicos son algunas de las causantes, igualmente la industria alimentaria genera un problema ambiental por la gran cantidad de acumulación de residuos pues se tiene una deficiencia para su descomposición, actualmente hay proyectos de investigación que ayudan a minimizar este problema, con la aplicación de procesos biotecnológicos que apoyan para la recuperación de residuos, para utilizarlos en fermentaciones para lograr metabolitos de interés que tienen gran importancia en la industria alimentaria, ya que se emplean en procesos de producción de alimentos para crear una eficiente manufactura de productos alimenticios, dar texturas y colores deseables para el consumidor, por lo antes mencionado se propone la utilización de *Aspergillus Níger* para la degradación del *Agave Salmiana* para producir metabolitos de interés que son las enzimas hemicelulolíticas y así mismo dar valor agregado al producto generado.

3. HIPÓTESIS

La utilización de residuos de agave como soporte sustrato en fermentación sólida, permitirá la producción fúngica de enzimas hemicelulolíticas.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Estudiar la cinética de degradación de residuos de agave por la cepa *Aspergillus niger* en fermentación en medio sólido.

4.2. Objetivos específicos

- Obtener y caracterizar de manera básica los residuos de *Agave Salmiana*.
- Evaluar la degradación de compuestos lignocelulósicos de los residuos de *Agave Salmiana* por el efecto de fermentación la fúngica.
- Evaluar la cinética de producción de enzimas hemicelulolíticas derivado de la fermentación en estado sólido de residuos de *Agave Salmiana*.

5. REVISIÓN DE LITERATURA

5.1. Fermentación de residuos lignocelulolíticos.

La fermentación en estado sólido es un proceso donde la materia orgánica es degradada a sus componentes más elementales. Dentro de los compuestos más abundantes en la biosfera está en primer lugar la celulosa y en segundo lugar en importancia la lignina; la degradación de estos son un paso importante en el ciclo del carbón (Cohen et al., 2002). Es una técnica conocida desde hace siglos y se define como el proceso fermentativo en el cual los microorganismos crecen sobre una matriz sólida en escasez o ausencia de agua libre (Blandino et al., 2005; Krishna, 2005). El sustrato debe contener sólo la humedad suficiente para favorecer el crecimiento y la actividad metabólica del microorganismo (De Ory et al., 2007).

Se usan desechos de la agroindustria, los cuales son considerados los mejores sustratos para la fermentación en estado sólido ya que además de agregarle valor le proporcionan los nutrientes necesarios para el crecimiento del microorganismo (Krishna, 2005).

La reutilización de los residuos agroindustriales en los procesos de fermentación en estado sólido es de particular interés debido a su disponibilidad, bajo costo, Y características que permiten obtener diferentes compuestos de valor agregado, además de ser una alternativa amigable con el medio ambiente para su eliminación (Ozcirak y Ozturk, 2017).

5.2. El *Agave Salmiana* como fuente de lignocelulosa.

Los agaves (Figura 1) forman parte del grupo de las xerófilas, que son las plantas que crecen en los suelos con poca humedad. Existen cerca de 300 especies de agave, las cuales todas son nativas del continente americano, donde la mayoría pueden ser encontradas en México (Colunga-García et al., 2007).

Figura 1. Imagen de Agave en México.



Fuente: Iván Reséndiz-Cruz (http://www.naturalista.mx/listed_taxa/3693451)

El agave ha sido usado por el hombre desde hace 10,000 años para producir comida, bebidas y fibras (Jenna et al., 1998). México cuenta con la tradición de usar agave para producir bebidas alcohólicas destiladas (Colunga-García et al., 2007).

Durante la producción del mezcal y el alcohol destilado, se generan residuos provenientes de la recolección y procesamiento de las pencas del *Agave Salmiana* utilizados como materia prima. Estos residuos (Figura 2) se degradan lentamente en el ambiente o se emplean como combustible, y no se les da un uso posterior. Los residuos de Agave tienen azúcares fermentables por lo que se mira con potencial para la utilización de los desechos para creación de metabolitos de interés.

Figura 2. Residuos de Agaves de la elaboración de bebidas alcohólicas.



Fuente: digital post (<http://digitalpost.com.mx/universidades/biocombustible-con-residuos-de-agave/>)

5.3. Aprovechamiento de residuos de agaves.

Al tener la problemática de degradación del agave surge la necesidad de implementar soluciones, hay investigaciones relacionadas y literatura con este tema, como el caso de investigadores de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UNSNH), encabezados por Agustín Jaime Castro Montoya y José María Ponce Ortega, crearon bioetanol con estos desechos (Sánchez, 2015).

Otra investigación que se desarrolló fue en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), es producción de enzimas ligninocelulosicas a partir del uso de residuos de *Agave Salmiana* como soporte-sustrato por Isela Almaraz Peralta se le dieron las condiciones de producción de enzimas ligninocelulosicas y la degradación de sustrato son óptimos para su productividad (Almaraz, 2016).

Aunque en la actualidad se siguen realizando estudios para la explotación de este residuo, por la problemática que genera su degradación.

5.4. Enzimas fúngicas.

La capacidad catabólica de la celulosa y hemicelulosa es una característica común para diversos hongos y otros microorganismos. Por el contrario, al ser la lignina un hetero polímero muy recalcitrante, solamente es mineralizado (transformado hasta dióxido de carbono y agua) en forma limitada por algunas bacterias y extensivamente por un grupo de hongos (Kirk y Farrell, 1987).

5.5. Celulasas.

El estudio de las celulasas comenzó desde los años 80 del siglo XX. Estuvo primeramente asociado al mejoramiento de la producción industrial de alimento animal. Durante las últimas dos décadas, el uso de celulasas ha aumentado considerablemente por sus amplias aplicaciones en diferentes industrias, sobre todo en las de detergentes, extracción de jugos y de biocombustibles (Oulad et al., 2009).

La acción enzimática para llevar a cabo la hidrólisis de la celulosa implica la operación secuencial y la acción sinérgica de un grupo de celulasas, que presentan diferentes sitios de enlace, debido a la naturaleza compleja de la molécula de celulosa (Lee, 1997).

El sistema de celulasa típico incluye tres tipos de enzimas: la Endo- β -1,4-glucanasa o también llamada 1,4- β -D-glucan glucanohidrolasa, que hidroliza aleatoriamente los enlaces β -glucosídicos en el interior de la molécula de la celulosa, con una rápida disminución del largo de las cadenas y un lento incremento en los grupos reductores; la exo- β -1,4-glucanasa o también conocida como 1,4- β -D-glucan celobiohidrolasa atacan los extremos terminales no reductores de la celulosa previamente fragmentada, así liberando subunidades de celobiosa y por último la β -1,4-glucosidasa o conocido como celobiosa para hidrolizar las unidades ya antes liberadas de celobiosa convirtiéndola en

dos moléculas de glucosa libre (Ladisich et al., 1983; Bataille & Toussaint, 1985; Marsden & Gray, 1986; Lee, 1997; Hahn-Hägerdal & Palmqvist, 2000).

5.6. Xilanasas.

Las xilanasas hidrolizan el enlace glucosídico presente en la cadena principal del polímero con lo que facilitan el acceso a otras enzimas para la hidrólisis de la celulosa y hemicelulosa presentes en la lignocelulosa. Cabe destacar que la actividad de las xilanasas puede ser clasificada como ayudante en la hidrólisis de celulosa y hemicelulosa, pero también cumplen un rol principal en la degradación de la hemicelulosa. La acción de β -D-xilosidasas resulta importante para la degradación de los extremos del polímero, además de moléculas constituidas por pocas unidades de xilosa. A través de su actividad se logra obtener moléculas simples de xilosa. El resto de las enzimas presentes en la degradación del xilano son útiles para degradar las uniones que existen entre la cadena principal de la molécula y las distintas ramificaciones que presenta. A través de ellas se logra liberar otras moléculas de azúcar como arabinosa o glucosa (Devia, 2014).

5.7. Lacasa.

Las lacasas son enzimas con aplicaciones biotecnológicas prometedoras, debido a su habilidad de catalizar la oxidación de compuestos aromáticos, se consideran para aplicaciones como delignificación, modificación de fibras, blanqueo, síntesis de químicos y medicamentos y para remediación de suelos y aguas (Lucas et al., 2002; Kenealy y Jeffries, 2003; Xu et al., 2000). Éstas han sido estudiadas intensamente en hongos (Maheshwari et al 2000), y también están distribuidas ampliamente en plantas, sin embargo han sido reportadas raramente en procariontas, tales como *Azospirillum lipoferum*, *Marinomonas mediterranea*, *Streptomyces griseus*, y *Bacillus subtilis* (Chundakkadu, 1999; Hullo et al., 2001; Xu et al., 2001), *Streptomyces cyaneus* (Arias et al., 2003), y *Microbulbifer degradans*. El campo de investigación para lacasas

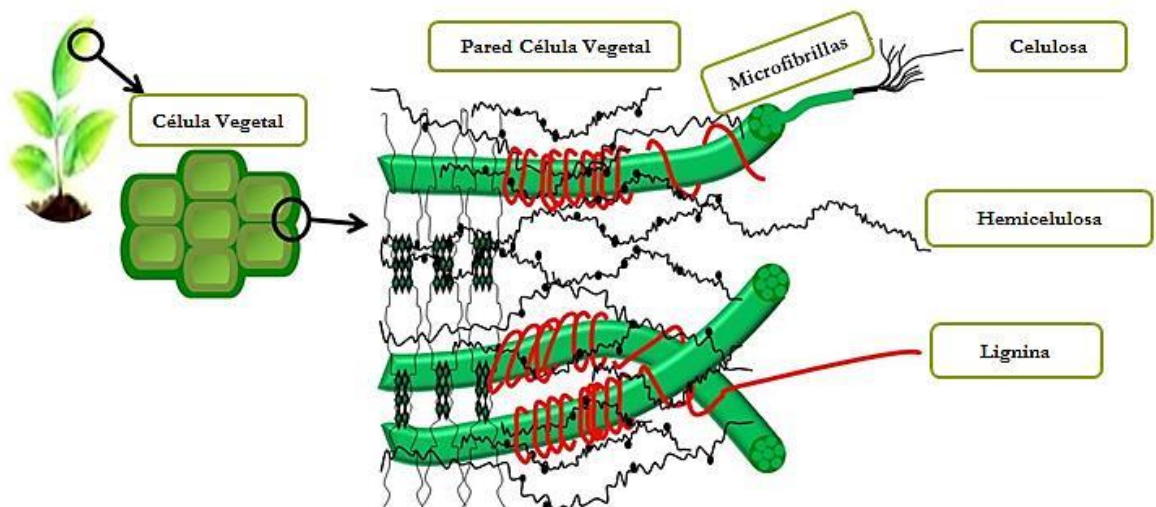
provenientes de bacterias es amplio y el uso de bagazo de agave para producirlas no ha sido explorado anteriormente (García et al., 2005).

La lacasa tiene además potencial para la bioremedación de contaminantes ambientales (clorofenoles e hidrocarburos aromáticos de la industria petroquímica), tratamiento de aguas residuales, deslignificación de papel (Fernández et al., 2012) decoloración de colorantes en la industria textil (Gutiérrez et al, 2012) y como pretratamiento de biomasa lignocelulósica para la producción de bioetanol (Moilanen et al., 2011).

5.8. Azúcares Fermentables.

El proceso para la conversión de lignocelulosa a etanol requiere la deslignificación de la biomasa lignocelulósica, para liberar a la celulosa de la hemicelulosa y de la lignina, presentes en el complejo celulosa-hemicelulosa-lignina (Figura 3) y lograr así, la despolimerización de los hidratos de carbono para producir azúcares simples y la fermentación de hexosas y pentosas para producir etanol. Entre los procesos descritos anteriormente, la deslignificación de las materias primas lignocelulósicas es una de las etapas más difícil de resolver a bajo costo (Lin y Tanaka, 2006).

Figura 3. Complejo celulosa-hemicelulosa-lignina de la célula vegetal.



Fuente: (Ugalde,2016).

Un pretratamiento efectivo debería lograr una buena recuperación de todos los carbohidratos, aumentar la digestibilidad de la celulosa en la subsecuente hidrólisis enzimática, minimizar la generación de productos derivados de la degradación de azúcares y de lignina, ser de bajo costo y fácilmente operable. Un gran número de pretratamientos diferentes han sido sugeridos en las últimas décadas y pueden ser divididos en distintas categorías: físicos, químicos, biológicos o una combinación de éstos (Brodeur et al., 2011).

6. METODOLOGÍA

6.1. Obtención de *Agave Salmiana*.

Se cortaron al azar dos pencas de *agave Salmiana*, las cuales se obtuvieron de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Posteriormente se cortaron en cubos de 1 cm², se extendieron en charolas para secarlas a 60°C por 46 h y luego se almacenaron en un recipiente hermético hasta su utilización.

6.2. Microorganismo utilizado.

Se empleó la cepa *Aspergillus niger* (M4) de la colección del DCTA. Se preparó agar papa dextrosa (PDA) para la siembra por estriado y se incubó a una temperatura de 30°C durante 96 h.

6.3. Conteo de esporas.

Las esporas que produjo la cepa M4 se extrajeron con una solución estéril de Tween 80 al 0.1%. Se tomaron 0.1 ml de la solución de esporas y posteriormente se diluyó en 20 ml de agua destilada. Después la dilución se empleó para llenar la cámara Neubauer y se cubrió con un portaobjetos. Con un microscopio (Wesco) se observó con un objetivo de 40X. Las esporas presentes se contaron eligiendo la figura "Z" que son 13 cuadros representativos (cinco cuadros de arriba, cinco cuadros de abajo y tres cuadros en medio que forman una diagonal entre las dos primeras). El número de esporas se determinó por la fórmula:

$$\frac{\text{esporas}}{\text{ml}} = (\bar{X})(250,000)(200)$$

6.4. Preservación del microorganismo.

Para la preservación de la cepa M4 se preparó una solución estéril de 5% de leche descremada y con 10% glicerol, de la cual se tomaron 10 ml y se añadió al medio que contiene la cepa. Después se empleó un barrido con un asa metálica estéril, posteriormente con la solución con esporas, se llenaron tubos eppendorf etiquetados y estériles, que más tarde se almacenaron en el congelador.

6.5. Fermentación de *Agave Salmiana*.

Se utilizó un medio de cultivo mínimo en sales Czapek-Dox, para su realización se pesaron los siguientes reactivos: Nitrato de sodio JalmeK® (7.63 g/L); fosfato de potasio J.T. Baker® (3.04 g/L); Sulfato de magnesio J.T. Baker® (1.52 g/L); cloruro de potasio JalmeK® (1.52 g/L).

Se pesaron 5 g de *agave Salmiana* deshidratada y se colocaron en una caja Petri estéril. Después se le añadieron 7 ml de medio Czapek-Dox que se dispersó desde el centro de la caja Petri. Se colocó una concentración de 5×10^7 esporas por mililitro de medio de cultivo. Consecutivamente las cajas Petri fueron tapadas y selladas con plástico de fleje y se metieron a una incubadora INO 650V-7® a 30°C por 192 h.

Para la fermentación en solido se realizaron tres repeticiones, las cuales se tomaron cada 24 horas hasta la culminación de 192 horas.

Las muestras solidas de la fermentación se dejaron en estufa de secado RIOSSA® por 72 horas y posteriormente se molieron las muestras.

6.6. Obtención del extracto enzimático.

La extracción se realizó con una solución de Tween al 0.1% con Cloruro de sodio al 0.9%. En un vaso de precipitado se colocó el material fermentado, donde se le vertieron 50 ml de la solución extractora por cada 5 g de *agave Salmiana*. La mezcla fue agitada durante 10 min. La mezcla homogenizada fue filtrada con lino para la obtención del extracto enzimático. Después se colocaron en tubos falcón y se centrifugaron a 4600 rpm por 10

min. Posteriormente se tomó con una jeringa el extracto enzimático con filtros pirinola CELLTREAT® PTFE 0.45µm 13mm de diámetro, se realizó la filtración y se congelaron para hacer posteriormente las determinaciones correspondientes.

6.7. Tratamiento de muestra en seco.

La muestra de agave se molió en un procesador de alimentos Oster® para la obtención de un polvo fino, luego en una balanza analítica se pesó 1 gr, después en un vaso de precipitado se agregaron 40 ml de agua destilada, posteriormente se agito por 20 min en una estufa de agitación, luego se filtró con papel filtro recibiendo en vasos con hielo y se tomó la muestra.

6.8. Determinación de azúcares totales por el método de fenol-sulfúrico.

Para la realización de esta determinación se tomaron 0.500 ml de extracto enzimático filtrado y se vació en un tubo de ensaye. Después se añadieron 0.250 ml de Fenol al 5%, se homogenizó y se dejó en un baño de agua con hielo por 5 minutos. Culminado el tiempo se añadió 1 ml de Ácido Sulfúrico Jalmek® concentrado vertiendo por las paredes del tubo de ensaye. Cuidadosamente se agito y se dejó en un baño de ebullición por 5 minutos. A continuación, se dejó enfriar a temperatura ambiente por otros 5 minutos. El espectrofotómetro VELAB™ UV/VIS se ajustó a cero con el blanco-sustrato y se leyó a una absorbancia de 480 nm. La curva de calibración se realizó con glucosa al 0.1%.

6.9. Determinación de azúcares reductores por el método de Miller.

El proceso para la preparación de un litro de DNS se describe detalladamente a continuación; se precaliento agua destilada (100 ml) en un vaso de precipitado a 50 °C con agitación, se adiciono el DNS SIGMA® (10.0 g/L), el Hidróxido de Sodio Jalmek® (10.0 g/L), Tartrato de Sodio y Potasio Jalmek® (200.0 g/L), el Fenol Jalmek®(2.0 g/L) y el Sulfito de Sodio Jalmek®(0.5 g/L), en el orden mencionado se adicionan, en un matraz se afora a un litro con Agua destilada, dicho contenido se forra con papel aluminio y se almacena en refrigeración.

Posteriormente con una micropipeta se tomó 1 ml de extracto enzimático filtrado colocándolo en un tubo de ensaye. Después se le añadió 1 ml del reactivo preparado (DNS), sometiéndolo en un baño María de ebullición durante unos 5 min, posteriormente la reacción se detuvo en un baño de hielo por otros 5 min, al terminar ese tiempo se le adiciono 5 ml de agua destilada, luego se dejó reposar por 5 min a temperatura ambiente, luego con el espectrofotómetro VELAB™ UV/VIS se ajustó a cero con el blanco-sustrato y se procedió a leer a 540 nm de longitud de onda. La curva de calibración se realizó con glucosa al 0.1%.

6.10. Preparación de solución amortiguadora Acetato sódico 50 mM (pH 6.0).

Se preparó las soluciones de (a) Ácido acético glacial al 0.1 M y (b) Acetato de sodio al 0.1 M, luego en un vaso de precipitado se mezclaron 4.8 ml de solución a y 45.2 ml de solución b, posteriormente en un matraz Erlenmeyer se adiciono 50 ml de Agua Destilada para que se completara 100 ml de solución, después con un agitador magnético se mezcló por 10 minutos.

6.11. Determinación de actividad xilanasa.

Para esta determinación es necesario elaborar un blanco de enzima, blanco de sustrato y una mezcla de reacción estas se describen a continuación:

- ✓ *Blanco de enzima (BE)*: Se inició tomando con una micropipeta 0.700 ml de buffer Ácido acético/Acetato de sodio 0.05 M a pH 5.6 más 0.300 ml de extracto enzimático filtrado y se fueron colocando en un tubo de ensaye.
- ✓ *Blanco de sustrato (BS)*: Posteriormente con la micropipeta se fue poniendo 0.700 ml de xilano de abedul (birch Wood) a 10,000 ppm más 0.300 ml de buffer Ácido acético/Acetato de sodio 0.05 M a pH 5.6 en un tubo de ensaye.
- ✓ *Mezcla de reacción (MR)*: Después en este paso con una micropipeta se añadió 0.700 ml de xilano de abedul (birch Wood) a 10,000 ppm más 0.300 ml de extracto enzimático en un tubo de ensaye.

Posteriormente cada tubo se colocó en baño maría a 50 °C durante 5 minutos, después se detuvo la reacción mediante baño de hielo durante 5 minutos, a cada tubo se le midieron azúcares reductores y cada una de las determinaciones se le realizó por triplicado.

Una unidad enzimática se define como los μmol de xilosa liberados por ml de extracto por minuto, bajo condiciones del ensayo.

6.12. Preparación de solución amortiguadora citrato-fosfato (pH 5.0).

Se prepararon dos soluciones madres en forma separada: a) Ácido cítrico al 0.1M y b) fosfato sódico al 0.2 M, posteriormente se tomó con una probeta 24.3 ml de la solución a, vaciándolo en un matraz Erlenmeyer, luego se tomó con la probeta 25.7 ml de la solución b, después se agregaron 50 ml de agua destilada y se homogenizó la solución en una estufa de agitación.

6.13. Determinación de actividad Endo-glucanasa.

Para esta determinación es necesario la elaboración de un blanco de enzima, blanco de sustrato y una mezcla de reacción, las cuales se describen a continuación:

- ✓ *Blanco de enzima (BE)*: Se inició tomando con una micropipeta con 0.200 ml de buffer Ácido Cítrico/Citrato de sodio 0.1 M a pH 5.0 más 0.100 ml de extracto enzimático, vertiéndolos en un tubo de ensaye.
- ✓ *Blanco de sustrato (BS)*: Después con la micropipeta se tomó 0.200 ml de Carboximetil celulosa a 1000 ppm más 0.100 ml de buffer Ácido Cítrico/Citrato de sodio 0.1 M a pH 5.0, colocándolos en un tubo de ensaye.
- ✓ *Mezcla de reacción (MR)*: Posteriormente se añadió con la micropipeta 0.200 ml de Carboximetil celulosa a 1000 ppm más 0.100 ml de extracto enzimático, que se añadieron en un tubo de ensaye.

Luego se colocó en baño maría a 50 °C durante 10 minutos, después se detuvo la reacción mediante ebullición en baño maría durante 5 minutos, a cada tubo se le midieron azúcares reductores; cada una de las determinaciones se les realizó por triplicado. Los tubos fueron incubados simultáneamente.

Una unidad enzimática se define como los μmol de glucosa liberados por ml de extracto por minuto, bajo condiciones del ensayo.

6.14. Tratamiento del sólido fermentado.

Cada repetición del sólido fermentado se molió en un procesador de alimentos Oster® obteniendo un polvo fino, luego a cada sólido fermentado en un vaso de precipitado se vertió acetona dejando por 20 min y se dejó secar a medio ambiente, como último en una balanza analítica se pesó 1 gr de cada repetición para proceder al análisis con ANKOM₂₀₀ FIBER ANALIZER.

6.15. Determinación de fibra cruda, detergente neutro y detergente ácido.

Estas determinaciones se realizaron mediante el analizador de fibra ANKOM₂₀₀ FIBER ANALIZER, con lo que se aplicó esa metodología para la determinación de fibra cruda (FC), fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácido (FDA). Se utilizó la solución de ácido sulfúrico al $0,255 \pm 0.005\text{N}$ y la Solución de hidróxido de sodio $0.3130 \pm 0.005\text{N}$ para el análisis de fibra cruda. Los reactivos empleados para la fibra neutra fueron: solución detergente neutro-premezclada de ANKOM Technology, Alpha-amilasa de ANKOM Technology y sulfito de sodio anhidro Jalmek®. Por último, el reactivo empleado fue una solución detergente acida premezclada de ANKOM Technology.

7. RESULTADOS

7.1. Obtención y caracterización de los residuos de *Agave Salmiana*

Se utilizaron muestras de *Agave Salmiana* que se colectaron en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro las cuales se lavaron y se sacaron, las muestras en fresco son de color verde claro y en seco se toman de color verde oscuro.

El resultado de contenido de carbohidratos se presenta en la Tabla 1. Se trabajó con muestras en seco para las pruebas aplicadas.

Tabla 1. Contenido de carbohidratos en el *Agave Salmiana* en seco.

VARIABLE	VALOR SECO	UNIDADES
Azucares Totales	4.47	mg/ml
Azucares Reductores	4.34	mg/ml
Fibra cruda (FC)	40.25	%
Fibra detergente ácido (FDA)	17.17	%
Fibra detergente neutro (FDN)	17.94	%

Los resultados arrojan que el *Agave Salmiana* contiene 4.47 y 4.34 mg/ml de azúcares totales y azúcares reductores respectivamente, valores por debajo a los que menciona Baraza y et al., (2008) para azúcares totales en *Agave Salmiana* silvestre (26 mg/ml) y cultivado (25 mg/ml). Ambos datos difieren de los resultados que se reportan para el olote de maíz, en los cuales obtienen valores de 1580.48 y 0.42 mg/ml de dichos azúcares antes mencionados Pérez, (2016). En cuanto a contenido de fibra cruda, el agave contiene el 40.25% lo que es superior a lo reportado por Baraza et al., (2008) para el *Agave Salmiana* silvestre (16.5%) y *Agave Salmiana* cultivado (32.1%). Datos similares a los valores que se obtienen en el trigo con 36% pero difiere ligeramente al 31% que se obtiene en avena (FAO, 1993). En cuanto al análisis de contenido de fibra detergente

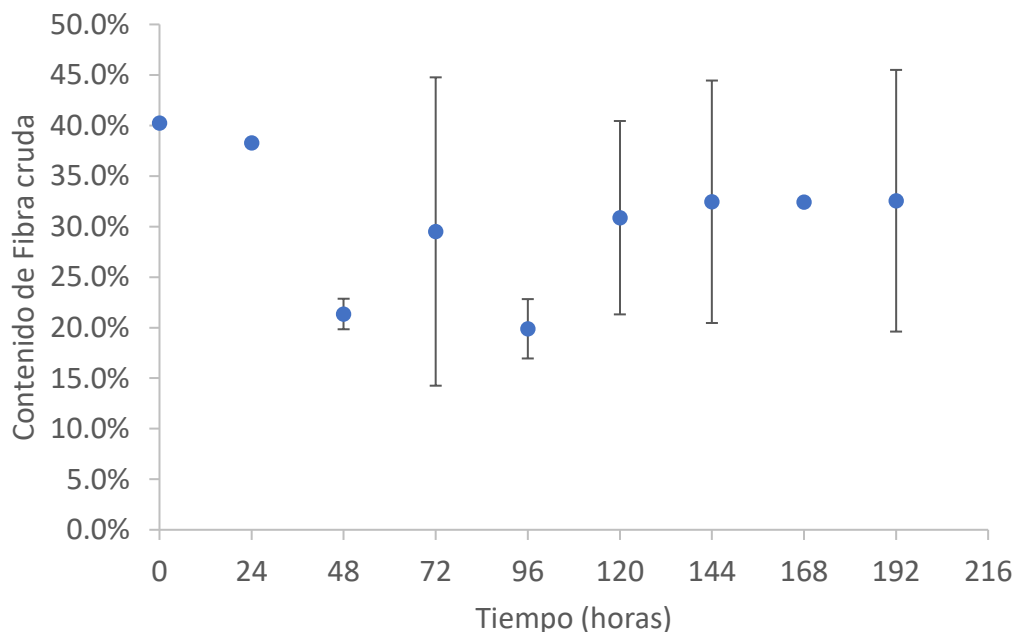
ácido y neutro 17.17 y 17.94% respectivamente, lo que resultó ser menor a los que se obtienen en paja de sorgo con 50.47 y 75.67% de dichas fibras detergentes (Pérez, 2015).

7.2. Evaluación de la degradación de compuestos lignocelulósicos de los residuos de *Agave Salmiana* por el efecto de fermentación fúngica.

La tabla anterior nos indicó la presencia de material fibroso como componente principal (40%) dentro de los residuos de agave. Este contenido de fibra logró ser aprovechado por la cepa de *Aspergillus niger* para realizar su crecimiento y desarrollo micelial.

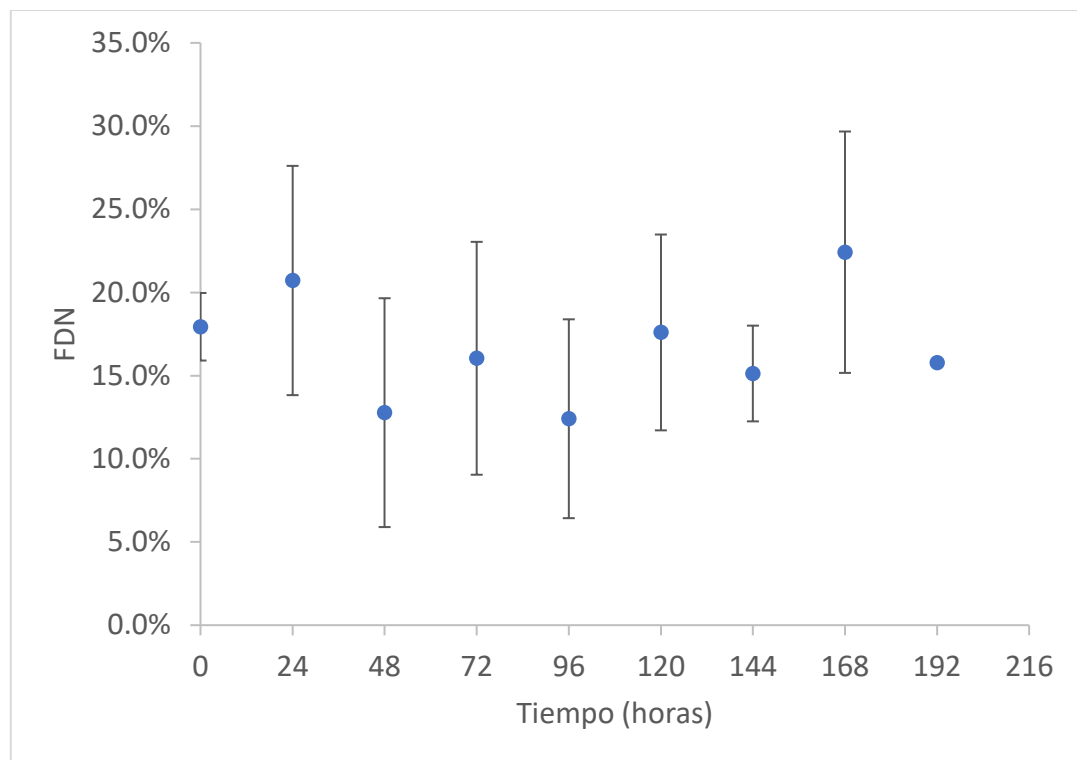
Para el caso de la fibra cruda (figura 4), se presenta un comportamiento de degradación, comparado con el residuo de agave sin fermentar. Aunque la disminución del contenido de FC comienza a las 24 horas, es a las 96 horas cuando se observa la mayor disminución en el contenido de FC (19.89%). A partir de las 120 horas, el contenido de FC permanece sin modificaciones. La variación en los resultados se pudo deber a la diferencia en los contenidos de muestra y los tamaños de partícula dentro de las bolsas de análisis.

Figura 4. Contenido de fibra cruda en el sólido fermentado.



Para el caso de fibra detergente neutra (FDN) que representa la fibra y agrupa la celulosa, hemicelulosa, las ceras las cutinas, los minerales insolubles, los compuestos de nitrógeno lignificado y la lignocelulosa.

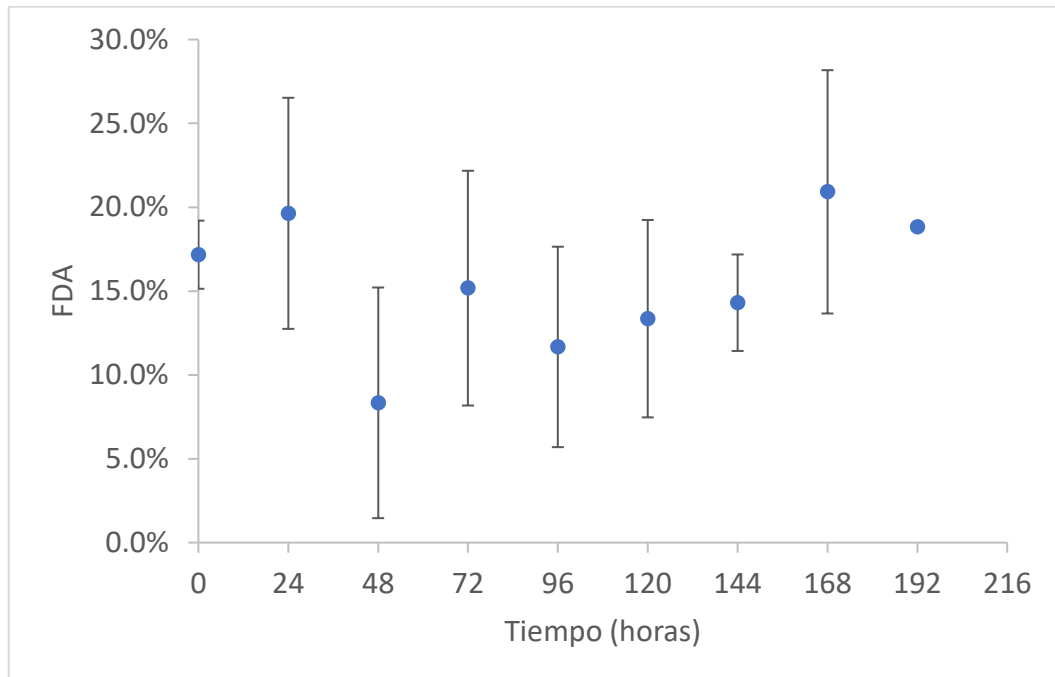
Figura 5. Contenido de fibra detergente neutro (FDN) en el sólido fermentado.



El contenido de FDN encontrado en el material sólido fermentado fue variable y se comportó incrementando y disminuyendo a través del tiempo, tal como se observa en la figura 5. Sin embargo, si comparamos la FDN inicial con la expresada en el tiempo de 168 h encontramos un incremento de 25%, lo que se debe a que se hidrolizan y se acumulan los compuestos de la pared celular tales como celulosa, hemicelulosa, las ceras las cutinas, los minerales insolubles, los compuestos de nitrógeno lignificado y la lignocelulosa. Los resultados promedios de FDN obtenidos de *Agave Salmiana* silvestre, son de 16.76 % lo que es bajo comparado con el 33% reportado por (Baraza et al., 2008), y aún más bajo comparado con el 45-50% en *Agave Salmiana* cultivado.

En la figura 6 representa la fibra detergente ácido (FDA) que agrupa los compuestos de celulosa, lignina y las cutinas en el sólido fermentado.

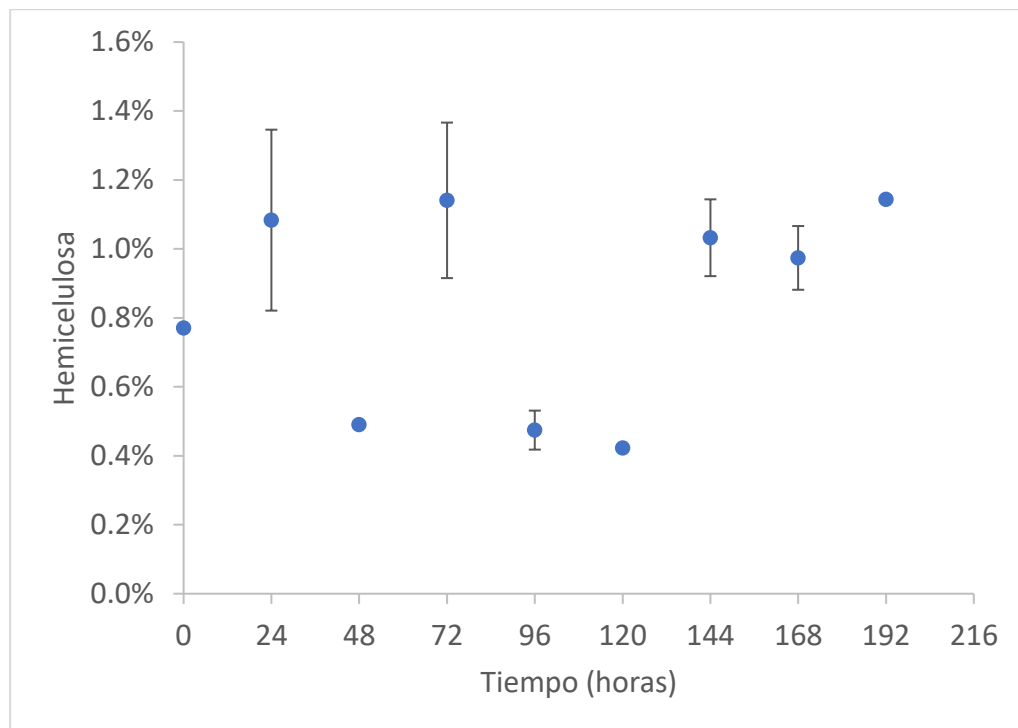
Figura 6. Contenido de fibra detergente ácido (FDA) en el sólido fermentado.



El contenido porcentual de FDA en el material vegetal sólido fermentado está directamente relacionado con la actividad Endo-celulasa, tal como se observa en la figura 6 y 8 los valores de ambas variables tienden a disminuir a través del tiempo, lo anterior se debe a que la enzima actúa mediante hidrólisis de los enlaces β -1,4 localizados en las regiones internas de la molécula de celulosa y lignina, disminuyendo así el grado de polimerización, y conjuntamente disminuyendo la FDA por acción continua de Endo-celulasa que va rompiendo los enlaces antes mencionados, conforme aumenta el tiempo de la fermentación. El promedio de los resultados obtenidos de FDA en *Agave Salmiana* silvestre, son de 15.49 % lo que es bajo comparado con el 28.2% reportado por (Baraza et al., 2008), y aún más bajo comparado con el 37-40% en *Agave Salmiana* cultivado.

La hemicelulosa se define como la fracción de la pared celular de plantas que queda después de la extracción de la celulosa y pectina. Se encuentra asociada a la celulosa y lignina como se muestra en la figura 7.

Figura 7. Cinética de degradación de la hemicelulosa.

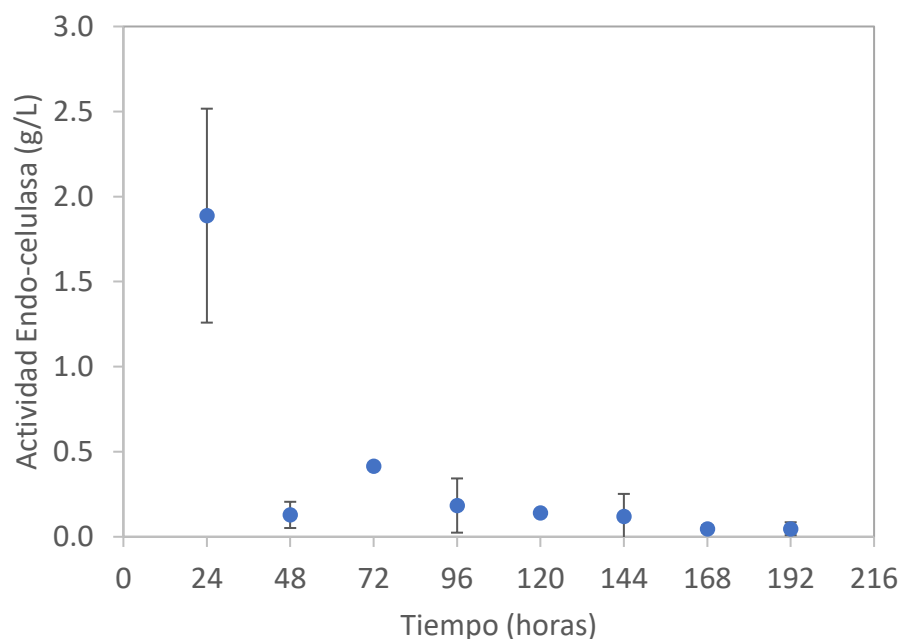


El contenido de hemicelulosa está directamente relacionado con la actividad enzimática xilanasa, tal como se observa en este trabajo de investigación, el contenido de hemicelulosa del *Agave Salmiana* se encuentra alrededor del 1% lo que es relativamente bajo y se refleja en una actividad xilanasa baja de entre 1.5- 2.2 g/L en sus diferentes tiempos de fermentación, con relación hemicelulosa:xilanasa de 1:2, bajos en comparación con el 20% de hemicelulosa, que se expresan en 214 g/L de actividad xilanasa en olote de maíz, con relación 1:10 (López, 2016). Lo anterior se debe a que a mayor contenido de hemicelulosa mayor será la actividad xilanasa que degrade dicho material, y que el material vegetal utilizado también influye en dicha actividad.

7.3. Evaluación cinética de la producción de enzimas hemicelulolíticas derivado de la fermentación en estado sólido de residuos de *Agave Salmiana*.

En la figura 8 podemos ver la actividad Endo-celulasa que produce rupturas secuenciales en la molécula de celulosa, haciendo que disminuya el grado de polimerización.

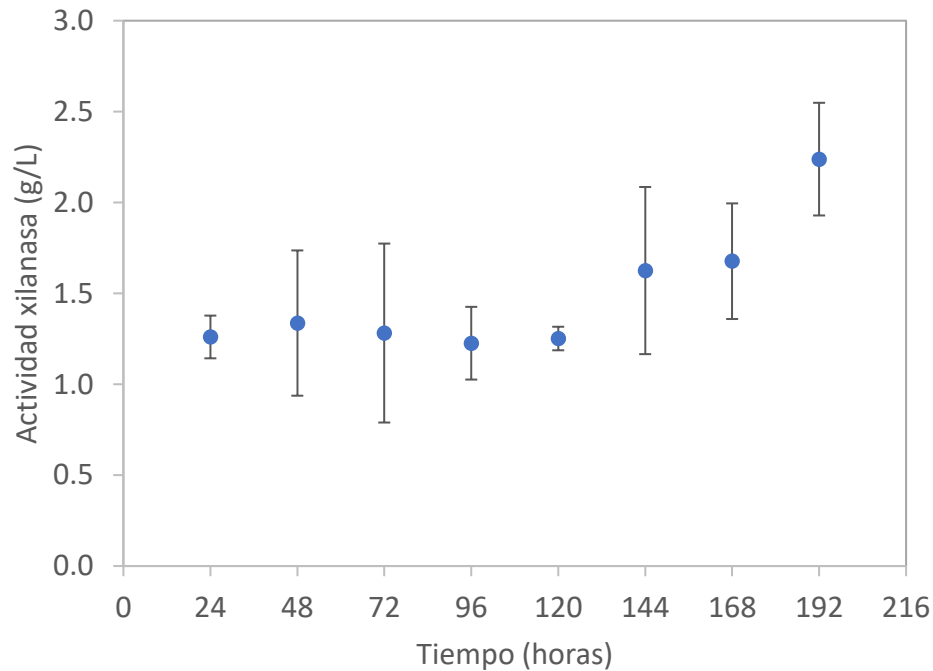
Figura 8. Cinética de la actividad Endo-celulasa en residuos de *Agave Salmiana*.



La actividad Endo-celulasa disminuye gradualmente conforme se aumentaba el tiempo de fermentación, tal como se observa en la figura 8, los resultados de la actividad Endo-celulasa fueron bajos (1.9 g/L) comparados con los obtenidos por Pérez, (2016) quien tuvo actividad de hasta 1200 g/L lo que se debió al contenido de azúcares totales en el olote de maíz que fue de 1580.48 mg/ml, mientras que en el agave utilizado en esta investigación fue de 4.47. Lo anterior señala que a mayor contenido de azúcares totales aumenta la actividad Endo-celulasa.

La actividad xilanasa se expresa al degradar el xilano que se encuentra abundante en la hemicelulosa del material vegetal fermentado, lo que se muestra en la figura 9.

Figura 9. Cinética de la actividad xilanasa en residuos de *Agave Salmiana*.



La actividad xilanasa medida en el experimento tuvo un incremento gradual conforme se aumentaba el tiempo de fermentación, lo que se observa claramente del tiempo 120 a 192 h, más sin embargo la actividad xilanasa máxima obtenida en el tiempo de 192 h fue de 2.24 g/L, lo que resulto ser bajo debido a la carencia de azúcares totales y reductores 4.47 y 4.34 mg/ml respectivamente. Ya que en una investigación realizada con olote de maíz los azúcares totales fueron de 1580.48 mg/ml, lo que reflejó una actividad xilanasa de 214.96 g/L (Pérez, 2016). Lo anterior señala que a mayor contenido de azúcares totales aumenta la actividad xilanasa.

8. CONCLUSIONES

Con metodologías empleadas en este trabajo se caracterizaron los carbohidratos (azúcares totales, azúcares reductores, FC, FDA Y FDN) de los residuos de *Agave Salmiana*, para la iniciación de la fermentación sólida.

La degradación de compuestos lignocelulósicos se produjo por el efecto de fermentación fúngica los cuales al no tener mucha cantidad de estos compuestos se logró tener una cantidad de actividad enzimática.

Se obtuvieron actividades enzimáticas (xilanasas y Endo-celulasas) que fueron buenas en relación con los compuestos de FC, FDA Y FDN del residuo fermentado, aunque menos que otros materiales vegetales como se muestran en los resultados, porque se tuvo una producción de enzimas hemicelulóticas.

Con esto pueden ser utilizados los residuos de *Agave Salmiana* como soporte sustrato en fermentación sólida para la producción fúngica de enzimas hemicelulolíticas.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Almaraz I. (2016). Producción de enzimas lignocelulósicas a partir del uso de residuos de Agave Salmiana como soporte-sustrato. Tesis de licenciatura. Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos. UAAAN.
- Arias ME, Arenas M, Rodríguez J, Soliveri J, Ball AS, Hernández M. (2003). Kraft Pulp Biobleaching and Mediated Oxidation of a Nonphenolic Substrate by Laccase from *Streptomyces cyaneus*. *Appl Environ Microbiol*. 69(4):1953–1958.
- Baraza E., Ángeles S., Garcia A., Valiente-Benuet A., (2008). Nuevos recursos naturales como complemento de la dieta de caprinos durante la época seca, en el Valle de Tehuacán, México. 33:12 893-894.
- Bataille P. y Toussaint P. (1985) The effect of pretreatment on the enzymic hydrolysis of cellulosic industrial waste. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 35B: 205-215.
- Blandino, A., Botella, C., De Ory, I., Webb, C., Cantero, D. (2005). Hydrolytic enzyme production by *Aspergillus awamori* on grape pomace. *Biochemical Engineering Journal* 26: 100-106.
- Binder J. B. y Raines R. T. (2010). Fermentable sugars by chemical hydrolysis of biomass. *PNAS* 107, 4516-4521.
- Brodeur G., Yau E., Badal K., Collier J., Ramachandran K.B. y Ramakrishnan S. (2011). Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: A review. *Enzyme Research* 2011, 1-17. DOI: 10.4061/2011/787532
- Cohen R., Yarden O. y Hadar Y. (2002) Lignocellulose affects Mn^{2+} regulation of peroxidases transcript level in solid state cultures of *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Microbiol Biotechnol* pp 3156-3158.

- Colunga-García P., Larque A., Eguiarte L., Zizumbo-Villareal D. (2007) En la ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves. CONABIO, México, pp 304. ISBN: 978-968-6532-18-0.
- Chundakkadu K. (1999). Production of bacterial cellulases by solid state bioprocessing of banana wastes. *Bioresour Technol.* 69 :231-239.
- De Ory, I., Caro, I., Díaz, A. B., Blandino, A. (2007). Evaluation of the conditions for the extraction of hydrolytic enzymes obtained by solid state fermentation from grape pomace. *Enzyme and Microbial Technology*,, 41: 302-306.
- Devia J. E. (2014). Estudio del efecto de xilanasas fúngicas en la degradación de sustratos lignocelulósicos. Tesis licenciatura. Departamento de ingeniería química y biotecnología. Universidad de Chile. pp 10.
- FAO. (1993). Tropical feeds: feed information and nutritive values. Prepared by B. Göhl. (FAO Animal Production and Health Series, No. 12.) Rome: FAO
- Fernández-Fernández M., Sanromán M., Moldes D., *Biotechnol.Adv.* 2012,
- García Y., Gonzalez O., Nungaray J. (2005) Potencial del bagazo de agave tequilero para la producción de biopolímeros y carbohidrasas por bacterias celulolíticas y para la obtención de compuestos fenólicos. 3(14):11.
- Gentry, H. S. 1972. The Agave Family in Sonora. *Agriculture Handbook No. 399* United States Department of Agriculture. Washington, D.C. pp 195 .
- Gutiérrez A., Rencoret J., Cadena E., Rico A., Barth D., DelRío J., Martínez Á. (2012). *Bioresour. Technol.* Pp 119, 114.

- Hahn-Hägerdal B., Palmqvist E. (2000) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*. 74: 25-33.
- Hullo MF, Moszer I, Danchin A, Martin-Verstraete I.. (2001). Coat Of *Bacillus Subtilis* Is A Copper-Dependent Laccase . *J. Bacteriol.* 183(18):5426–5430.
- Jenna T., Kuttruff S., Gail DeHart y Michael J. O'Brien (1998) 7500 Years of archeological footwear from Arnold research Cave, Missouri. *Science* 281, 72-75.
- Kenealy W., Jeffries T. (2003). *Enzyme Processes for Pulp and Paper: A Review of Recent Developments*, Fuente: *Wood deterioration and preservation: advances in our changing world*. Washington, DC : American Chemical Society : Distributed by Oxford University Press, 2003. ACS symposium series ; 845: Pages 210-239.
- Kirk T. K., Farrell R. L. (1987). Enzymatic “combustion”: the microbial degradation of lignin. *Annu. Rev. Microbiol.* 41:465-505.
- Krishna C. (2005) Solid State Fermentation Systems -- An Overview. *Critical Reviews in Biotechnology*,, 25: 1-30.
- Ladisich M., Lin K., Voloch M., Tsao G. (1983) Process considerations in the enzymatic hydrolysis of biomass. *Enzyme and Microbial Technology*. 5: 82-102.
- Lee J. (1997) Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *Journal of Biotechnology*. 56: 1-24. Lee et al. (2005).
- Lin Y. y Tanaka S. (2006). Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69 (6), 627-642. DOI: 10.1007/s00253-005-0229-x

- Lucas-Elio P, Solano F, Sanchez-Amat A.. (2002), Regulation of polyphenol oxidase activities and melanin synthesis in *Marinomonas mediterranea*: identification of ppoS, a gene encoding a sensor histidine kinase. *Microbiol.* 148:2457–2466.
- Maheshwari R, Bharadwaj G, Bhat MK. (2000). Thermophilic Fungi: Their Physiology And Enzymes. *Microbiol Mol Biol Rev*, 64(3)461–488.
- Marsden W. y Gray P. (1986) Enzymatic hydrolysis of cellulose in lignocellulosic materials. *CRC Critical Reviews in Biotechnology.* 3: 235-274.
- Martínez S., M; L. Beltrán M; R. Valdez C; E. Troyo D; B. Murillo A; J. Jiménez G y A. Ortega R. (2007). Assessment of sustainability performance on the utilization of agave (*Agave salmiana ssp crassispina*) *International Journal of Sustainable Development and World Ecology.* 14 (4): 362-371.
- Martínez M. (2013). Ecología y usos de especies forestales de interés comercial de las zonas áridas de México. 1° ed [ebook]. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. pp.128-134 disponible en:
http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/jspui/bitstream/handle/123456789/4067/CIR_NOC_010106126600053621.pdf?sequence=1
- Moilanen, U., Kellock, M., Galkin, S., Viikari, L. (2011) *Enzyme Microb. Technol.* Pp 49, 492.
- Oulad F., Kaddour S., y Sadoun T. (2009). Adsorption of cellulase *Aspergillus niger* on a commercial activated carbon: Kinetics and equilibrium studies., *Bioresource Technology*, Vol. 75, pp. 93-99.
- Ozcirak S., Ozturk R. (2017) Production of ligninolytic enzymes by solid state fermentation using *Pleurotus ostreatus*. *Annals of Agrarian Science.* 15:2:273.

- Pérez A. (2015). Efecto de la amonificación de la paja de sorgo, sobre su valor nutricional. Tesis de licenciatura. Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos. UAAAN.
- Pérez G. (2016). Producción de extracto enzimático de *Rhizomucor Pusillus* y su aplicación en el desarrollo de un integrador tiempo temperatura enzimático. Tesis de licenciatura. División regional de ciencia animal. UAAAN.
- Radhika R., Jebapriya G.R., Gnanadoss J.J. (2013) Producción de celulasa y lacasa utilizando *Pleurotus* sp. en fermentación sumergida y en estado sólido Int. J. Curr. Sci. , 6E, pp. 7 – 13
- Sánchez. O.J. y Cardona, C.A., Producción biotecnológica de alcohol carburante I. Obtención a partir de diferentes materias Primas. Interciencia, 30, pp. 671-678, 2005.
- Sanchez V. Desarrollan bioetanol con desechos de la industria tequilera. CONACYT agencia informativa. CONACYT prensa. (2015). Web. 21 Nov 17.
- Ugalde R. (2016). Mejoramiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* Y138 por ingeniería evolutiva para la producción de bioetanol de segunda generación. Tesis de licenciatura. Instituto de Investigaciones Biotecnológicas. Universidad Nacional de San Martín.
- Velázquez M. L., Ordorica M. A. (2014). Termodinámica, cinética y enzimas. Bioquímica medica 1. 41:24.
- Xu F, Kulys JJ, Duke K, Li K, Krikstopaitis K, Deussen HJ, Abbate E, Galinyte V, Schneider P.. (2000). Redox Chemistry In Laccase-Catalyzed Oxidation Of N-Hydroxy Compounds. Appl Environ Microbiol. 66(5): 2052–20561.

Xu F, Deussen HJ, Lopez B, Lam L, Li K.. (2001). Enzymatic and electrochemical oxidation of N-hydroxy compounds Redox potential, electron-transfer kinetics, and radical stability. Eur J Biochem. 183(18):5426–5430.

Yu. Morzin, D. y Salmi, t. (2016). CINÉTICA CATALÍTICA. 2nd ed. [ebook] ELSERVIER, p.281. disponible en:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444637536099942>