

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL



**Efecto de diferentes sustratos de zonas semiáridas de Coahuila
en la producción de enzimas celulolíticas de *Pleurotus ostreatus***

Por:

MARLEN TAPIA SOLÍS

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Buenvista, Saltillo, Coahuila, México.

Mayo, 2021

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA "ANTONIO NARRO"
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos

Efecto de diferentes sustratos de zonas semiáridas de Coahuila en la
producción de enzimas celulolíticas de *Pleurotus ostreatus*

TESIS

Presentada por

MARLEN TAPIA SOLÍS

y que somete a consideración del H. Jurado Examinador como requisito parcial para
obtener el título profesional de

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

APROBADA

Dr. Mario Alberto Cruz Hernández
Presidente

Dra. Ruth Elizabeth Belmares Cerda
Vocal

Dra. Sonia Noemí Ramírez Barrón
Vocal

Dra. María Elena Castelo Mejía
Vocal

Dr. Jose Dueñez Alanís
Coordinador de la División de Ciencia Animal



Buenvista, Saltillo, Coahuila, México

Mayo de 2021

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA "ANTONIO NARRO"
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos

**Efecto de diferentes sustratos de zonas semiáridas de Coahuila en la
producción de enzimas celulolíticas de *Pleurotus ostreatus***

T E S I S

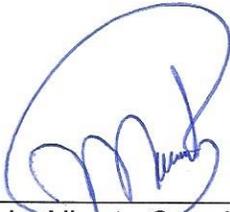
Presentada por

MARLEN TAPIA SOLÍS

Y que somete a consideración del H. Jurado Examinador como requisito parcial para
obtener el título profesional de

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Fue dirigida por el siguiente comité:



Dr. Mario Alberto Cruz Hernández
Asesor principal



Dra. Sonia Noemí Ramírez Barrón
Co-asesor



Dra. Ruth Elizabeth Belmares Cerda
Co-asesor



Dra. María Elena Castelo Mejía
Co-asesor

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Mayo de 2021

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, por darme la oportunidad de ingresar y concluir una etapa más de mi vida, por haberme formado profesionalmente dándome las herramientas necesarias para un entorno laboral y social.

Al personal académico por darme las bases adecuadas para enfrentamientos futuros en mi vida laboral.

Al Dr. Mario Alberto Cruz Hernández por brindarme su apoyo en la elaboración de este trabajo y por su amistad.

A Alexis Jovany Rivera Trujillo por apoyarme en mis dificultades y obstáculos que se me presentaron en el trascurso de mi formación como profesionista.

DEDICATORIAS

A Dios primero que nadie porque siempre está bendiciendo mi vida y guiándome por un buen camino.

A mis padres Nieves Tapia Alvares y Claudia Solís Molina los cuales doy gracias por tenerlo a mi lado y nunca me cansare de agradecerles todo lo que hacen por mi gracias todo el amor, comprensión y por todo el apoyo incondicional que me brindaron a lo largo de mi carrera.

A mis hermanos por todos los buenos consejos que me dieron, y por haberme ayudado a superar los momentos más difíciles.

Tabla de contenido

AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIAS	5
RESUMEN	9
1. INTRODUCCIÓN	11
2. OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo General	14
2.2 Objetivos específicos	14
3. JUSTIFICACIÓN	15
4. ANTECEDENTES	16
4.1 Pleurotus	16
4.2 Plantas de las regiones semiáridas	16
4.3 Maguey	17
4.4 Olote	17
4.5 Yucca filifera	18
4.6 <i>Pleurotus ostreatus</i>	19
4.7 Fermentación sólida	19
4.8 Enzimas	20
4.9 Celulasas	20
4.10 Xilanas	21
4.11 Amilasas	22
4.12 Enzimas de <i>Pleurotus ostreatus</i>	22
5. METODOLOGÍA	24
5.1 Preparación de los sustratos, siembra del micelio y muestreo.	24
5.2 Ensayos enzimáticos	25
5.2.1 Actividad amilasa	25
5.2.2 Actividad celulasa	26
5.2.3 Actividad xilanasa	26
5.3 Análisis estadístico	26
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
6.1 Determinación de la actividad amilasa	27
6.3 Determinación de la actividad xilanasa	34
6.4 Comparación de actividad enzimática máxima de los diferentes sustratos en fermentación en estado sólido.	38

7. CONCLUSIONES.....	42
8. REFERENCIAS	44

ABSTRACT

The edible mushroom *Pleurotus ostreatus* has the capacity to produce enzymatic complexes that degrade cellulose, lignocellulose and starch. These enzymes can be applied in several processes within the food, textile and paper industries as well as in the production of biofuels. The cultivation of these mushrooms can be transformed into an ecological bioconversion process by taking advantage of agro-industrial waste as a substrate; thus, contributing to the environmental balance and in turn, conferring them an added value. The aim of the present study was to evaluate the effect of several substrates on the enzymatic kinetics of the mushroom *P. ostreatus* during its growing period. For this purpose, wheat straw combined with yucca (*Yucca filifera*), maguey (*Agave salmiana*) or corn cob (*Zea mays*) at different proportions (20, 30 and 40%) was used as a substrate for mushroom growth. Amylase, cellulase and xylanase production was measured every 7 days for 35 days. The highest amylase and xylanase activities were obtained in the substrate composed by 50% wheat straw and 50% yucca at 7 and 14 days of mushroom development, respectively. Highest cellulase activity was reached in the substrate with a maguey content of 50%. Mushrooms cultivated in substrates containing corn cob showed the lowest enzymatic yields, however, in the case of amylase production there was no significant statistical difference ($p \geq 0.05$) with the maximum yield obtained in the substrates containing yucca and maguey. It was found that the enzymatic behavior during the growth period of *P. ostreatus* is closely related to the composition of the substrates in which it is grown, that is, to its content and availability of starch, cellulose, hemicellulose and lignin. The results obtained in enzyme production kinetics provide an insight of the dynamics of extracellular enzyme formation during the degradation of agro-industrial residues used for the growth of *P. ostreatus* and allow to establish protocols for the production of hydrolytic enzymes.

Keywords: agroindustrial wastes, bioconversion, edible mushrooms, enzymes, *Pleurotus ostreatus*.

RESUMEN

El hongo comestible *Pleurotus ostreatus* tiene la capacidad de producir complejos enzimáticos que degradan la celulosa, lignocelulosa y almidón, estas enzimas son aplicadas en numerosos procesos dentro de la industria alimenticia, textil, del papel y en la elaboración de biocombustibles. El cultivo de estos hongos puede transformarse en un proceso de bioconversión ecológica al aprovechar residuos agroindustriales como sustrato, además, la revalorización de estos desechos, puede disminuir su impacto al medio ambiente. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de diferentes sustratos sobre la cinética enzimática del hongo *P. ostreatus* durante su periodo de cultivo. Para ello se utilizó paja de trigo combinada con yucca (*Yucca filifera*), maguey (*Agave salmiana*) u olote de maíz (*Zea mays*) a diferentes concentraciones (20, 30 y 40%). La producción enzimática de amilasa, celulasa y xilanasa fue medida cada 7 días durante 35 días. La mayor actividad amilasa y xilanasa se obtuvieron en sustratos compuestos por 50% paja de trigo y 50% yucca, a los 7 y 14 días del desarrollo del hongo, respectivamente. La mayor actividad celulasa fue alcanzada en el sustrato con un contenido de maguey del 50%. Los hongos cultivados utilizando sustratos que contenían olote presentaron los menores rendimientos enzimáticos, sin embargo, en el caso de la amilasa no hubo diferencia estadística significativa ($p \geq 0.05$) con el rendimiento máximo obtenido en los sustratos que contenían yucca y maguey. Los resultados muestran que el comportamiento enzimático durante el periodo de crecimiento de *P. ostreatus* está estrechamente relacionado con la composición de los sustratos en los que es cultivado, lo que se debe al contenido y disponibilidad de almidón, celulosa, hemicelulosa y lignina. Esto demuestra la dinámica de formación de enzimas extracelulares durante la degradación de residuos agroindustriales utilizados

para el crecimiento de *P. ostreatus* y permite establecer protocolos para la producción de enzimas hidrolíticas.

Palabras clave: bioconversión, enzimas, hongos comestibles, *Pleurotus ostreatus*, residuos agroindustriales.

1. INTRODUCCIÓN

Pleurotus ostreatus es el segundo hongo comestible con mayor producción a nivel mundial debido a su gran versatilidad y adaptabilidad a un rango amplio de temperaturas y a su resistencia a plagas y enfermedades; es un hongo apto para la alimentación humana, y posee un gran valor nutricional al tener un alto contenido de proteínas (entre 16.47 y 36.96% del peso seco) de alto valor biológico, ya que contiene todos los aminoácidos esenciales, y una gran cantidad de fibra dietética (entre 24.4 y 46.6% del peso seco) [1], constituida principalmente de β -glucanos ramificados, los cuales han demostrado tener actividad antiproliferativa, antiinflamatoria e inmunomoduladora [2], es rico en vitaminas del complejo B, vitamina D, y minerales como hierro, zinc, cobre y selenio [3] además de poseer una gran cantidad de compuestos bioactivos y antioxidantes, tales como polifenoles (5.5g/100 g), β -caroteno (3.1mg/100g), ácido ascórbico (25 mg/100g) y α -tocopherol (30.3mg/100g) [4]. Además, puede crecer sobre una amplia variedad de sustratos ricos en lignocelulosa ya que posee complejos enzimáticos capaces de degradarla en moléculas más simples [5].

Diversos materiales lignocelulósicos han sido usados como sustrato para el crecimiento de microorganismos por medio de fermentación en estado sólido (FES), el cual es un método de cultivo llevado a cabo sobre un material no soluble que actúa como un soporte físico y como una fuente de nutrientes [5]. Los hongos tienen la capacidad de desarrollarse perfectamente sobre sustratos sólidos por medio de un sistema de crecimiento en hifas, lo cual permite una buena tolerancia a bajas actividades de agua (a_w), y a condiciones de baja presión osmótica. Las hifas también les confieren una mayor eficiencia para colonizar el soporte sólido y un mejor aprovechamiento de los nutrientes disponibles [6].

El cultivo de hongos comestibles es un sistema de bioconversión ecológica, al utilizar desechos agroindustriales que son producidos en grandes cantidades y generalmente poco utilizados [7]. La paja de cereales es un subproducto fibroso altamente disponible, aunque su utilización en alimentación animal está limitada por su bajo valor nutritivo, ya que gran parte de sus componentes se encuentran asociados a la pared celular. Como media, contiene un 72% de fibra dietética distribuída en un 38% de celulosa, un 25% de hemicelulosa, un 8% de lignina y un 0,2 % de cutina. Las dos primeras son potencialmente fermentables por la microbiota digestiva, pero su degradación se ve limitada por la estructura cristalina de la celulosa y por la existencia de enlaces covalentes con la lignina [8], sin embargo, al ser fermentada por hongos lignocelulíticos es posible lograr una mayor digestibilidad de estos compuestos. La yucca es una palma que se encuentra en el desierto, perteneciente a la familia de las agaváceas [9]. Por su morfología tiene un alto contenido de materiales fibrosos ($85 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) que podrían representar una fuente de sustrato el crecimiento de *P. ostreatus* [10]. Por otra parte, el maguey es una planta originaria de México, la producción nacional se encuentra por encima de 1.8 millones de toneladas y es utilizado principalmente para la elaboración de bebidas destiladas, lo cual genera una gran cantidad de residuos sólidos como pencas de desvirado y bagazo, su disposición final es al aire libre, representando un grave problema ambiental [11], [12]. México es también uno de los principales productores de maíz a escala global, en 2017 se alcanzó una producción nacional de 27.8 millones de toneladas, posicionándose como el octavo país con mayor producción en ese año [13]. El olote es un subproducto agrícola que se genera en grandes cantidades en el proceso de separación del grano de la mazorca y se estima que por cada tonelada de maíz se obtienen 170 kg de olote. Este residuo es rico en hemicelulosas, lo cual lo convierte en un sustrato sumamente atractivo para la producción de enzimas celulolíticas [14]. Los hongos, al ser cultivados sobre este tipo de residuos, contribuyen a su manejo mediante un proceso de reciclaje orgánico sencillo y económico. Posterior a la cosecha del hongo, el residuo

presenta mejoras que podrían ser aprovechadas en la alimentación animal [15]. también puede ser utilizado en la biorremediación de suelos, al tener la capacidad de eliminar contaminantes como hidrocarburos, metales pesados, así como algunos compuestos químicos contenidos en los pesticidas [16]–[18].

Los hongos son una buena fuente de producción de enzimas al degradar materia orgánica para su nutrición, debido a que utilizan principalmente lignina, celulosa y azúcares que se encuentran disponibles en los sustratos [19]. Las enzimas son proteínas especializadas capaces de acelerar la velocidad de una reacción química, promoviendo así la transformación de diferentes moléculas en productos específicos [20]. Las celulasas y xilanasas son enzimas hidrolíticas que participan en el rompimiento de los enlaces glicosídicos β -1,4 presentes en los polisacáridos de la celulosa y hemicelulosa, respectivamente [21]. Por su parte, las amilasas hidrolizan los enlaces glucosídicos en el almidón para convertirla en glucosa, maltosa, maltotriosa y dextrina [22]. Cualquier proceso que pueda convertir material celulósico en glucosa de manera eficiente y económica tendría gran impacto a nivel industrial. Las enzimas hidrolíticas son aplicadas en numerosos procesos dentro de la industria alimenticia, por ejemplo: en la clarificación de jugos y en la mejora de las propiedades reológicas de diversos alimentos [23], [24]. También son aplicadas en la industria textil y del papel como bio-decolorantes [25], [26] y en la industria biotecnológica son empleadas para la elaboración de biocombustibles [27], [28].

En el presente estudio se evaluó el efecto de la diversos sustratos subproductos de la industria alimenticia en la cinética de producción de las enzimas hidrolíticas (celulasa, xilanasas y amilasa) por fermentación en estado sólido del hongo *P. ostreatus*, con el fin de promover los procesos de bioconversión ecológica al aprovechar residuos agrícolas y al mismo tiempo generar un alimento de alto valor nutritivo y enzimas de interés industrial.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Evaluar el efecto de los diversos sustratos obtenidos de residuos de plantas de zonas semiáridas del estado de Coahuila y subproductos de la industria alimenticia como Olote de maíz, *Yucca filifera*, pencas de maguey y paja de trigo en la producción de las enzimas hidrolíticas (celulasa, xilanasas y amilasa) por fermentación en estado sólido del hongo *P. ostreatus*.

2.2 Objetivos específicos

- Establecer las condiciones óptimas del cultivo en el laboratorio para la producción del hongo *Pleurotus ostreatus*.
- Determinar la cinética de la producción de enzimas celulolíticas en diferentes concentraciones de sustratos.
- Determinar la actividad enzimática de los extractos obtenidos de la fermentación.
- Seleccionar los extractos con mayor actividad enzimática.

3. JUSTIFICACIÓN

El principal motivo de realizar este proyecto es determinar cuál es el sustrato óptimo para obtener mayor capacidad para producir las enzimas ligninolíticas en cuatro materiales diferentes fibra de maguey (*Agave Salmiana*), Yucca (*Yucca Filifera*) olote de maíz (*Zea Maíz*) y paja de trigo, estos materiales se mostraron adecuados para favorecer la producción de enzimas ligninolíticas y para ser empleados como soportes en la inoculación de hongos sobre suelos contaminados.

Se realizó este trabajo utilizando sustratos del desierto como maguey (*Agave Salmiana*), Yucca (*Yucca Filifera*) para ver qué tan efectivos son y tener un conocimiento de que sustratos a utilizar para tener un mejor rendimiento en la obtención de enzimas ligninolíticas, ya que son catalizadores, porque cada reacción química necesita una enzima para que se realice, es decir, todo lo que se transforma lo hace gracias a una enzima.

Teniendo en cuenta lo anterior, esta propuesta plantea la evaluación de la actividad enzimática producida mediante el cultivo *Pleurotus ostreatus* sobre sustratos maguey (*Agave Salmiana*), yucca (*Yucca Salmiana*), olote de maíz (*Zea Maíz*) y paja de trigo).

4. ANTECEDENTES

4.1 *Pleurotus*

El género *Pleurotus* está constituido por diversas especies comestibles que son cultivadas experimental y comercialmente en diferentes regiones del mundo. La definición taxonómica de las especies y la validez de los nombres asignados es un tema muy discutido, que se ha abordado morfológica, genética y molecularmente, sin que se hayan logrado aún conclusiones completamente consensuadas. De las aproximadamente 50 especies válidas taxonómicamente para el género, al menos 12 han sido cultivadas, entre las que *P. ostreatus*, *P. pulmonarius*, *P. eryngii* y *P. djamor* son las de mayor importancia comercial. Las especies de *Pleurotus* presentan un patrón genético heterotálico tetrapolar, con alelos múltiples, que permiten gran variabilidad fenotípica y genotípica entre las poblaciones de diferentes regiones geográficas, por lo que el uso de diversos métodos de apareamiento, tanto genéticos, bioquímicos y moleculares, han impulsado la obtención de nuevas cepas con características de interés biotecnológico, así como la experimentación de diversas técnicas de conservación para lograr un adecuado mantenimiento del material genético in situ.[49]

4.2 Plantas de las regiones semiáridas

El suelo de zonas áridas y semiáridas es típicamente bajo en materia orgánica por la escasa cubierta vegetal y limitada productividad. El escaso nitrógeno contenido en la materia orgánica de zonas áridas y semiáridas se transforma a compuestos inorgánicos vía los procesos de mineralización, que lo vuelven disponible para las plantas, por lo que se reconoce al nitrógeno como limitante para la productividad de las plantas en esos ecosistemas. La transformación de nitrógeno ocurre por la descomposición y mineralización llevada a cabo por los microorganismos del suelo, sin embargo en los ambientes áridos, no tienen siempre condiciones ideales para su actividad en cuanto a temperatura y humedad. No es fácil conocer

la disponibilidad real de nitrógeno por las dificultades que ocurren con los diferentes métodos para medir la mineralización, como son perturbar el suelo, eliminar raíces, limitar la aireación y el flujo del agua. [50]

4.3 Maguey

Agave salmiana (maguey pulquero) es una especie abundante que se cultiva en el centro de México y produce una inflorescencia que genera muchos recursos, los cuales son aprovechados por diversos grupos biológicos. En ambientes naturales, forma su inflorescencia después de 10 años de crecimiento basal. El escapo puede medir de 6 a 8 metros de altura y puede tener de 15 a 25 panículas, cada una conumbelas que tienen aproximadamente 150 flores. Cada flor produce una cantidad de néctar elevada (en promedio 101.6 μ l de néctar cada 2 horas las 24 horas del día) que varía de acuerdo a la hora y la etapa fenológica en la que se encuentre [51]

4.4 Olole

El olole del maíz (*Zea mays*) se encuentra entre las fuentes de recursos no maderables con un alto contenido de xilanas, por lo que ha sido considerado de interés como fuente alternativa de diferentes compuestos químicos de interés comercial o industrial, entre otras fuentes de biomasa. El olole es un residuo o subproducto agrícola que se genera en grandes cantidades en el proceso de separación del grano de la mazorca y se estima que por cada tonelada de maíz se obtienen 170 kg de olole. Entre los usos del olole que han sido reportados en la literatura se encuentran la aplicación como forraje para rumiantes, soporte para disminuir la erosión en la tierra y también como sustratos para la producción de la enzima xilanasa. Sin embargo, hay pocos reportes en la literatura sobre su potencial para la obtención de compuestos orgánicos u otros productos de uso industrial. [52]

4.5 *Yucca filifera*

Yucca filifera es una especie representativa de la flora de las zonas áridas de México se utiliza como planta de ornato y para reforestar algunas avenidas. En algunas zonas, la planta se usa para construir corrales en pequeños poblados o como cercos vivos en las zonas áridas. Destilando los tallos tiernos se obtiene alcohol. También se usa como leña para uso doméstico y alimento para ganado, conejos y aves; el fruto se ha probado como alimento para conejo de la raza Nueva Zelanda, combinando en 50% de alimento balanceado comercial y 50% de fruto. También se obtienen productos que se usan como materia prima en la industria farmacéutica para la fabricación de hormonas, donde destaca por su cantidad de zarzapogenina empleada para elaboración de anticonceptivos. Las hojas son materia prima para la obtención de fibras de buena calidad en la industria textil. Son muchos los factores que inciden en la producción de yuca como en cualquier otro cultivo, pero entre ellos destacan las enfermedades como uno de los actores que más la limitan, así como las de tipo cuarentenario a otro país o región que limitan el comercio internacional.

La yuca puede ser atacada por más de 30 agentes bacterianos, fungos, virales y fitoplasmas. Las enfermedades pueden ocasionar pérdidas en el establecimiento del cultivo, disminuir el vigor de las plantas, reducir su capacidad fotosintética o causar pudriciones de la raíz, ya sea anterior o posterior a la cosecha. Algunos patógenos atacan sólo el tallo, que es el material y propagación. [53]

4.6 *Pleurotus ostreatus*

Pleurotus ostreatus es el segundo hongo comestible más cultivado en todo el mundo después del *Agaricus bisporus*. Tiene valores económicos y ecológicos y propiedades medicinales. El cultivo de hongos ha avanzado hacia la diversificación con la producción de otros hongos. Los hongos comestibles pueden colonizar y degradar una gran variedad de sustratos lignocelulósicos y otros desechos que se producen principalmente a través de las actividades de las industrias agrícola, forestal y de procesamiento de alimentos. El cultivo de hongos ostra convierte un alto porcentaje del sustrato en cuerpos fructíferos, aumentando la rentabilidad. *P. ostreatus* exige pocos controles ambientales, y sus cuerpos fructíferos no suelen ser atacados por enfermedades y plagas, y pueden cultivarse de forma sencilla y económica. Todo esto hace que el cultivo de *P. ostreatus* sea una excelente alternativa para la producción de hongos en comparación con otros hongos. [54]

4.7 Fermentación sólida

La fermentación en medio sólido es una tecnología que tuvo sus orígenes como un arte ancestral. Originalmente, estos procesos fueron aquellos en los que hongos filamentosos invadían ciertos materiales sólidos que luego eran consumidos por las personas, por ejemplo el Koji y el Tempeh que son alimentos tradicionales asiáticos, los quesos camembert y roquefort en Europa. La característica esencial de la fermentación sólida es el crecimiento del microorganismo sobre un sustrato insoluble sin una fase libre, variando el nivel de humedad del 30 a 80%. [55]

4.8 Enzimas

Las enzimas son proteínas que cuentan con un sitio catalítico en su estructura, lo cual les confiere actividad enzimática atribuida a su capacidad de disminuir la energía de activación en una reacción. Esta acción enzimática ocurre por la formación por el complejo enzima-sustrato. Una característica propia de las enzimas en su especificidad, de la cual existen diferentes grados desde la absoluta que son específicas para un solo sustrato o relativas las cuales conocen un grupo diferencial como sustrato.

El sustrato es la sustancia sobre la cual actúan las enzimas y tienen mucha relación con la especificidad. Cuando las enzimas son multisustratos la especificidad es relativa hacia ellos, como en el caso de las hidrogenasas algunas peroxidases o kinasas. Algunas enzimas de la misma fuente llevan a cabo la catálisis de las mismas reacciones a pesar de que sus estructuras son diferentes, estas enzimas a estas enzimas se les denomina isoenzimas. Para unas enzimas es necesario un componente adicional para llevar a cabo la reacción al cual se le denomina coenzima, teniendo alguna de ellas la capacidad de regresar a su estado natural una vez terminada la reacción. [56]

4.9 Celulasas

La celulasa es una enzima hidrolasa que realiza la hidrólisis de la celulosa en moléculas de glucosa libre. La celulosa es un componente de la pared celular vegetal muy resistente a la hidrólisis, y por tanto a la digestión. La celulosa está formada por un polímero de unidades de glucosa unidas mediante enlaces glucosídicos tipo β -1,4. Las plantas contienen entre un 35 y un 50% de celulosa. La celulasa actúa rompiendo estos enlaces β -1,4glicosídicos de la celulosa transformándola en glucosa libre. La celulasa es una hidrolasa que puede 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 los alientos. Ingerir enzimas celulasas ayuda a romper las paredes celulares de las plantas, esto permite obtener una mayor cantidad de energía, al convertir la celulosa en unidades de glucosa. La glucosa es la principal fuente de energía para el cuerpo humano, por lo tanto la celulosa nos ayuda a obtener mayor energía de las plantas. Además, la glucosa que proporciona la celulosa se libera lentamente del cuerpo y nos permite mantener unos niveles óptimos de glucemia durante más tiempo. [57]

4.10 Xilanasa

Xilanasa es una enzima derivada de una fuente fúngica. Esta enzima es útil en la hidrólisis de D-xilano y D-xilosa. Hemicelulosa, hecho de xilanos, es un componente principal de la mayoría de las paredes celulares de las plantas. Xilanasa hidroliza este componente y es por eso útil para una variedad de aplicaciones, incluyendo la reducción de la viscosidad de trigo, cebada, mazorcas de maíz y otros tobas y alimentos difíciles de digerir. Xilanasa está disponible en un polvo granular o una preparación de enzimas líquidas diseñado para una variedad de aplicaciones para la solubilización de fibras. Este producto tiene un gran rango de pH actividad y no requiere cambio del pH a un pH ácido para actividad óptima. Xilanasa polvo es no-OMG, no peligroso, enzima de grado industrial y grado para alimento animal. [58]

4.11 Amilasas

La amilasa es una enzima que degrada el almidón. También recibe los nombres de sacarasa y ptialina. Fue la primera enzima identificada y aislada por Anselme Payen en 1833, quien la bautizó con el nombre de diastasa.

En el cuerpo humano la amilasa se produce principalmente en las glándulas salivales, glándulas parótidas y en el páncreas, y presenta su actividad enzimática máxima a pH 7. También puede encontrarse en alimentos vegetales. La función de la amilasa es catalizar la digestión de los hidratos de carbono, es decir, es una reacción de hidrólisis para digerir el almidón o el glucógeno, y formar azúcares simples más sencillos. [57]

4.12 Enzimas de *Pleurotus ostreatus*

Las enzimas ligninolíticas, tienen potencial aplicación en la industria del papel, principalmente en el proceso de deslignificación durante el blanqueo, y en biorremediación de suelos y aguas contaminadas, porque la baja especificidad de estas enzimas les permite oxidar, además de la lignina, una amplia variedad de compuestos orgánicos contaminantes como tintes.

En la industria alimentaria, las enzimas (tanto libres como inmovilizadas) se utilizan para recuperar subproductos, facilitar la fabricación, mejorar el aroma y estabilizar la calidad de los alimentos.

Las enzimas industriales más utilizadas son carbohidrasas, proteasas, y lipasas, aunque también se emplean oxidorreductasas e isomerasas. La mayoría de estas enzimas son de origen microbiano y solo muy pocas proceden de animales o vegetales superiores.

Consumimos enzimas como la brómelia que proviene de la piña y te ayuda en la digestión.

La importancia biotecnológica de la enzima lacasa radica en su habilidad para oxidar los compuestos fenólicos y los relacionados con la lignina, como también degrada ciertos contaminantes ambientales. La lacasa se ha utilizado como agente blanqueador en la pulpa de madera y la industria de papel, en la desinfección con cloro y en la eliminación de compuestos fenólicos de las aguas residuales. En lo referente al sector alimenticio esta enzima hace parte indispensable de los análisis de fenoles en los jugos naturales; además tiene aplicaciones como biosensor para la determinación de los catecoles de los polifenoles en el té. La lacasa inmovilizada se ha utilizado para eliminar fenoles del zumo de manzana y del vino. [56]

5. METODOLOGÍA

5.1 Preparación de los sustratos, siembra del micelio y muestreo.

Los sustratos (paja de trigo, yucca, maguey y olote) fueron sometidos a un proceso de esterilización a 120 °C durante 1 hora en una autoclave. Se colocaron 50 g de las diferentes mezclas de sustrato (Tabla 1) en bolsas de polietileno, en seguida fueron mezcladas con 15 % (p/p) de semilla de sorgo, la cual, fue previamente inoculada con micelio del hongo *P. ostreatus*, después las bolsas fueron cerradas y perforadas para permitir la salida de los cuerpos fructíferos al crecer el hongo. Se sembraron 7 bolsas para cada tratamiento y se tomaron tres muestras cada 7 días, se establecieron controles positivos para cada uno de los tratamientos (paja de trigo, yuca, maguey y olote) en base a un trabajo previo, desarrollado por el Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), donde se evaluó la producción de enzimas hidrolíticas (amilasas, celulasas y xilanasas) utilizando el hongo *Pleorutus Ostreatus* [29]. El proceso fue llevado a cabo durante 35 días en un cuarto de cultivo a una temperatura de 23 – 25 °C y con una humedad relativa de 80 – 90 %. Se utilizó un diseño experimental de bloques al azar, el cual se muestra en la Tabla 1. Se realizaron 3 repeticiones para cada tratamiento.

Tabla 1. Diseño de la matriz experimental utilizada para evaluar el efecto de los sustratos sobre la producción enzimática

Tratamiento	Paja de trigo	Yucca	Maguey	Olote
T1	70 %	30 %	-	-
T2	60 %	40 %	-	-
T3	50 %	50 %	-	-
T4	70 %	-	30 %	-
T5	60 %	-	40 %	-
T6	50 %	-	50 %	-
T7	70 %	-	-	30 %
T8	60 %	-	-	40 %
T9	50 %	-	-	50 %

Obtención del extracto enzimático

Para la obtención del extracto enzimático se agregaron 50 ml de buffer de citratos (0.1 M) pH 5.5 (ácido cítrico 0.1 M / citrato de sodio 0.1 M) a cada tratamiento (bolsa de polietileno inoculada), estas fueron agitadas y su contenido fue filtrado con papel Whatman[®] No. 1 usando una bomba de vacío. El filtrado fue recolectado y se mantuvo en congelación hasta su uso. Es importante señalar que la actividad enzimática inicial en las semillas de sorgo, (previamente inoculadas con micelio de *P. ostreatus*) fue inactivada

5.2 Ensayos enzimáticos

5.2.1 Actividad amilasa

Para determinar la actividad amilasa se utilizó el método descrito por Miller (1959), el cual hace uso del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) que permite detectar de manera colorimétrica los azúcares reductores (equivalentes de glucosa) liberados durante la reacción enzimática [30]. Para esto se mezclaron 10 de μL de extracto enzimático crudo con 90 μL de almidón al 10 % (p/v) en agua destilada, la solución fue incubada a 50 °C durante 60 min, en seguida se adicionaron 100 μL de DNS para detener la reacción. La solución se mantuvo en ebullición durante 10 min, se colocó en baño de hielo por 5 min y se midió la absorbancia a 546 nm. La cantidad de azúcares reductores se determinó utilizando una curva de maltosa como estándar ($0.0257x + 0.0489$). Una unidad enzimática (UE) de amilasa se definió como la cantidad de enzima requerida para la liberación de 1 μmol de azúcar reductor en equivalentes de maltosa por minuto se realizó en microplaca.

5.2.2 Actividad celulasa

Para medir la actividad celulasa se siguió el método reportado por Bansal et al. (2012). Para lo cual se mezclaron 10 μL de solución del extracto enzimático crudo con 90 μL de solución de carboximetilcelulasa (CMC) al 1 % (p/v) y se dejó que la solución reaccionara durante 60 min a 50 °C, en seguida se determinó la cantidad de azúcares reductores usando el ensayo de DNS a 546 nm y utilizando una curva de glucosa como estándar ($0.0252x - 0.0554$). Se expresó una UE de celulasa como la cantidad de enzima requerida para la liberación de 1 μmol de azúcar reductor en equivalentes de glucosa por minuto [31].

5.2.3 Actividad xilanasa

La actividad de la xilanasa se estimó siguiendo la metodología reportada por Suvarna et al. (2009), utilizando una suspensión del 1 % (p/v) de xilano de madera de haya como sustrato. Se mezclaron 90 μL de xilano al 3 % con 10 μL de extracto enzimático crudo se dejó reaccionar durante 30 min a 40 °C. La cantidad de azúcares reductores fue determinada utilizando el ensayo DNS a 546 nm con una curva de D-xilosa como estándar ($0.0224x + 0.0325$). Se definió una UE como la cantidad de enzima requerida para la producción de 1 μmol de D-xilosa por minuto [32].

5.3 Análisis estadístico

Todas las mediciones fueron realizadas por triplicado y los datos fueron expresados como el promedio \pm la desviación estándar. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de un solo factor, y las medias fueron comparadas mediante la prueba de Tukey con un nivel de significancia de 5% ($p \leq 0.05$), los datos fueron procesados utilizando el software Minitab®.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Determinación de la actividad amilasa

En la Figura 1 se presenta la cinética de actividad amilasa durante el desarrollo del hongo *P. ostreatus* en las diferentes mezclas de sustrato de paja de trigo y yuca. El pico máximo de actividad amilasa se detectó a los 7 días del cultivo del hongo en los sustratos compuestos por 40 y 50% de yuca. Esto coincide con los resultados obtenidos por Ergun y Urek (2017), quienes reportaron que la mayor actividad amilasa de hongos *P. ostreatus* cultivados utilizando cáscaras de papa generalmente se dio a los 7 días [33]. Posteriormente, la actividad disminuyó notablemente, sin embargo, se presentó un ligero incremento en el día 28 y posterior reducción al día 35. En un estudio previo, se reportó que, la máxima actividad amilasa se produjo a los 14 días de la cinética de fermentación, manteniéndose constante hasta los 21 días [29]. Se ha reportado que en los primeros días de la cinética de fermentación, los microorganismos fúngicos desarrollan sistemas enzimáticos rápidamente con el objetivo de degradar los azúcares disponibles en el medio, sin embargo, en seguida la actividad enzimática comienza a decrecer debido a la presencia de otras moléculas (como azúcares reductores o aminoácidos) que inhiben la producción enzimática y pueden retardar su crecimiento [6]. La mayor actividad enzimática fue de $3896 \text{ UE} \cdot \text{L}^{-1}$ y se presentó en la mezcla con 50% de yuca, de acuerdo al ANOVA se obtuvo diferencia significativa entre los tratamientos 1, 2 y 3 ($p < 0.05$). La enzima amilasa ha sido clasificada como una enzima inducible, ya que la presencia de almidón en los sustratos de fermentación promueve su actividad.[34].

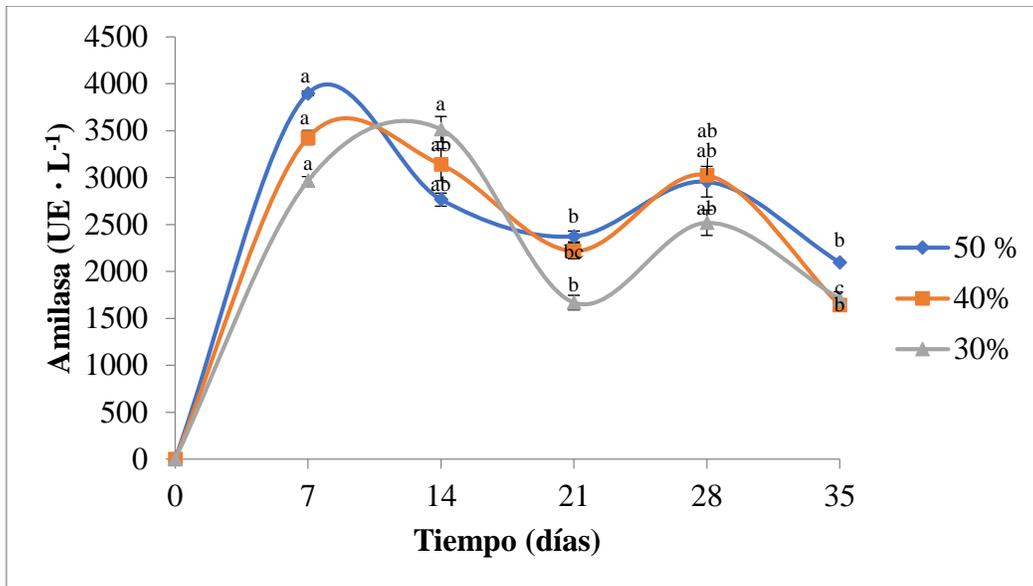


Figura 1. Cinética de actividad amilasa utilizando paja de trigo y yuca como soporte (media \pm desviación estándar representada por las barras de error; las medias dentro de la cinética del mismo tratamiento que no comparten una letra son significativamente diferentes a $p \leq 0.05$).

En los sustratos compuestos por paja de trigo combinada con maguey (Figura 2) la mayor actividad amilasa fue detectada a los 28 días del cultivo del hongo, de acuerdo al ANOVA se obtuvo diferencia significativa entre los tratamientos a los 28 días ($p < 0.05$). El hecho de que la mayor producción de amilasas se diera casi al final del periodo de cultivo del hongo puede deberse a que los azúcares solubles son los principales consumidos durante el desarrollo del micelio [35]. El bagazo de maguey es un sustrato con una alta concentración de azúcares reductores ($5559.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) [36], cuando disminuye la concentración de azúcares en el medio, aumenta la producción de otras enzimas hidrolíticas. La mayor actividad alcanzada fue de $3889 \text{ UE} \cdot \text{L}^{-1}$ en el sustrato compuesto de paja de trigo combinada con maguey al 50%. Se han reportado niveles de producción de enzima amilasa alrededor de $495 \text{ UE} \cdot \text{L}^{-1}$ a los 21 días de la cinética de fermentación, sin embargo, en el presente estudio se obtuvieron mayores niveles ($3889 \text{ UE} \cdot \text{L}^{-1}$), debido a efectos sinérgicos que pueden presentar los microorganismos en sistemas de fermentación sólida [29].

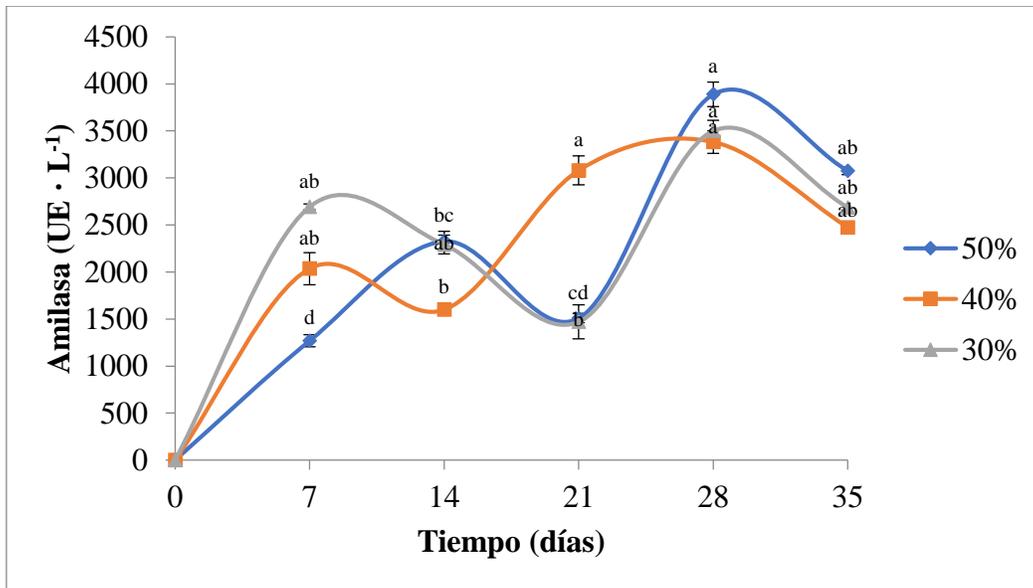


Figura 2. Cinética de actividad amilasa utilizando paja de trigo y maguey como soporte (media \pm desviación estándar representada por las barras de error; las medias dentro de la cinética del mismo tratamiento que no comparten una letra son significativamente diferentes a $p \leq 0.05$).

En los sustratos compuestos por paja de trigo y olote de maíz (Figura 3) se presentó un crecimiento exponencial de los 0 a los 28 días, alcanzando su pico máximo al final de este periodo en los sustratos que contenían olote al 30 y 50%, de acuerdo al análisis de varianza ANOVA se obtuvo diferencia significativa entre los 3 tratamientos ($p < 0.05$). Los sistemas heterogéneos, compuestos por uno o más sustratos, favorecen el efecto sinérgico, alcanzando su mayor actividad entre los 20 y 30 días de la fermentación, debido a que el microorganismo induce la activación de diversas rutas metabólicas, (ej. glucólisis, gluconeogénesis), en consecuencia, se acelera el aprovechamiento de cada una de las fuentes de carbono presentes [34]. En el sustrato con olote al 40%, se presentó un pico de actividad amilasa a los 14 días, posteriormente descendió a los 21 días, mostrando después un crecimiento exponencial y alcanzando la mayor actividad enzimática a los 35 días del experimento. El olote de maíz está compuesto en su mayoría por celulosa, hemicelulosa y lignina [14], lo cual puede inhibir la actividad amilasa durante los primeros días de la cinética de

fermentación, sin embargo, la acción de otros complejos enzimáticos puede liberar azúcares más simples que pueden inducir la actividad amilasa durante los últimos días de la cinética de fermentación [37]. La actividad enzimática máxima en cada uno de los sustratos que contenían olote fue muy similar, presentándose una actividad de $3572 \text{ UE} \cdot \text{L}^{-1}$ en el sustrato con 50% de olote y $3650 \text{ UE} \cdot \text{L}^{-1}$ en los sustratos que lo contenían en un 30 y 40%.

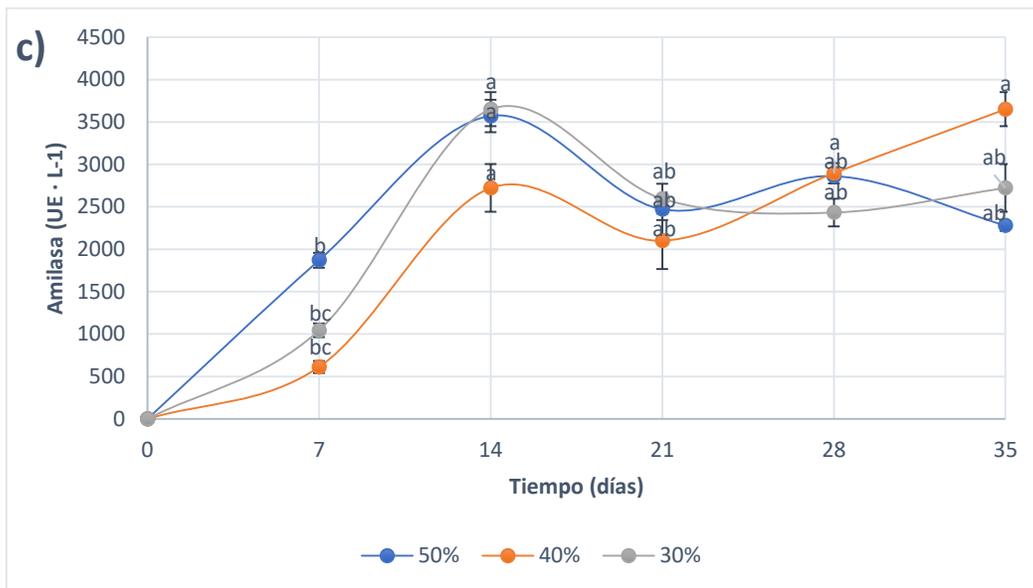


Figura 3. Cinética de actividad amilasa utilizando paja de trigo y olote como soporte (media \pm desviación estándar representada por las barras de error; las medias dentro de la cinética del mismo tratamiento que no comparten una letra son significativamente diferentes a $p \leq 0.05$).

6.2 Determinación de la actividad celulasa

En la Figura 4 se puede observar el comportamiento cinético de la celulasa en los sustratos que contenían paja de trigo y yucca, el cual fue muy variado dependiendo de la proporción utilizada. Los mecanismos de producción de la enzima celulasa, varían ampliamente dependiendo de la constitución de los materiales, mostrando mayores rendimientos en algunos sistemas [37]. En el sustrato que contenía yucca en un 30%, la mayor actividad celulasa ($6514 \text{ UE} \cdot \text{L}^{-1}$) fue alcanzada a los 14 días de cultivo, sin embargo, después se presentó un descenso de actividad hacia los 28 días y nuevamente un crecimiento exponencial que se mantuvo hasta el final del periodo de

fermentación. En el tratamiento con yucca al 40% se presentaron dos picos de actividad enzimática, el primero a los 7 días ($5618 \text{ UE} \cdot \text{L}^{-1}$) seguido por una disminución de la actividad a los 14 días, posteriormente volvió a aumentar hasta alcanzar su actividad máxima a los 28 días ($5750 \text{ UE} \cdot \text{L}^{-1}$). Finalmente, el sustrato con 50% de yucca fue el que presentó mayor actividad celulasa, esto puede deberse a su importante contenido de fibra ($85 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) [10]. En el sustrato con mayor proporción de yucca, se exhibió un crecimiento exponencial a partir del inicio de la fermentación hasta los 21 días, y después se presentó un descenso notable de la actividad enzimática a los 28 días y creciendo nuevamente hasta alcanzar un máximo de actividad enzimática ($7360 \text{ UE} \cdot \text{L}^{-1}$) a los 35 días. En un estudio desarrollado para obtener enzima celulasa, utilizando paja de sorgo como soporte por fermentación sólida utilizando *P. ostreatus* se reportó un comportamiento similar, presentándose un crecimiento exponencial hasta los 21 días, sin embargo no se evaluó la producción enzimática en los días posteriores de la fermentación [29].

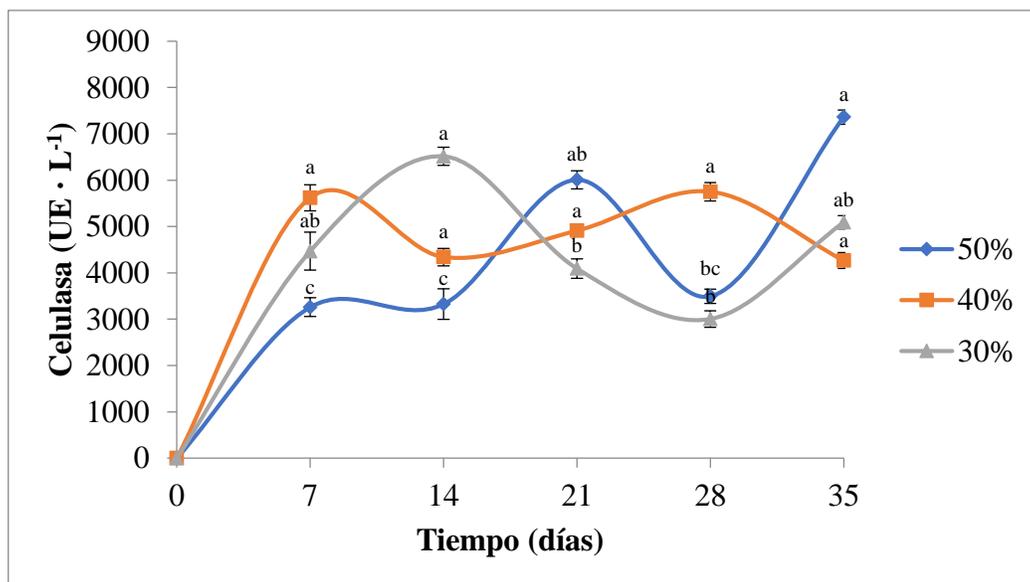


Figura 4. Cinética de actividad celulasa utilizando paja de trigo y yucca como soporte (media \pm desviación estándar representada por barras de error; las medias dentro de la cinética del mismo tratamiento que no comparten una letra son significativamente diferentes a $p \leq 0.05$)

En los sustratos que contenían maguey en diferentes proporciones (Figura 5), se observó un comportamiento similar entre sí caracterizado por un crecimiento exponencial a partir del inicio de la fermentación hasta los 7 días en los sustratos que contenían maguey en un 40 y 50%, y hasta los 14 días en el tratamiento con 30% de maguey, seguido por una disminución de la actividad celulasa, que se prolongó hasta los 14 días en el sustrato con maguey al 40% y hasta los 21 días de fermentación en los otros dos tratamientos. Dentro de los residuos utilizados en esta investigación, el bagazo de maguey, es el que presenta un mayor contenido de celulosa, pues se han reportado valores entre 42 y 46% [38], esto permite explicar el hecho que se obtuvieran altos rendimientos de producción de actividad celulasa en mezclas compuestas con bagazo de maguey, en comparación con los sustratos que contenían yucca y olote. Posteriormente, se observó un crecimiento exponencial de actividad enzimática presentando un pico máximo a los 28 días en los 3 tratamientos. La mayor actividad celulasa ($7918 \text{ UE} \cdot \text{L}^{-1}$) se determinó en el sustrato compuesto en un 50% de maguey, de acuerdo al análisis de varianza ANOVA se obtuvo diferencia significativa entre los 3 tratamientos ($p < 0.05$). En un estudio en el que se utilizó bagazo de maguey para analizar la eficiencia biológica y crecimiento del hongo *P. ostreatus*, se obtuvo una alta producción de enzimas celulasas después de los 28 días de la cinética de fermentación, los autores reportan que los hongos aprovechan totalmente la pared celular de los residuos de bagazo de maguey, la cual es rica en lignina y celulosa [38].

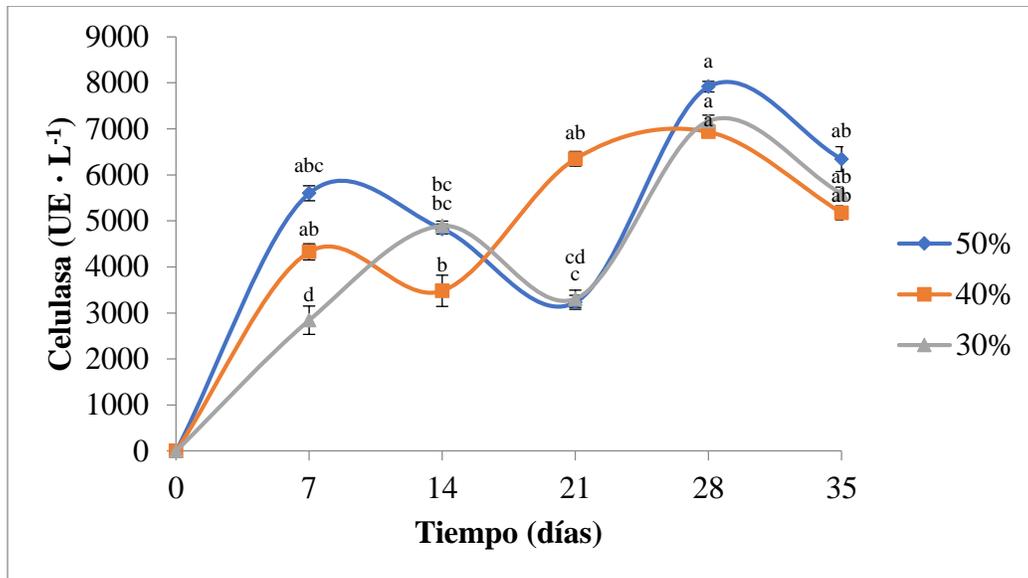


Figura 5. Cinética de actividad celulasa utilizando paja de trigo y maguey como soporte (media \pm desviación estándar representada por barras de error; las medias dentro de la cinética del mismo tratamiento que no comparten una letra son significativamente diferentes a $p \leq 0.05$)

El comportamiento de la actividad celulasa en los sustratos que contenían paja de trigo y olote de maíz (Figura 6) fue variado según la proporción presente en cada tratamiento. En el sustrato que contenía olote en un 30%, se detectó un crecimiento exponencial del inicio de la fermentación a los 14 días, alcanzando su máxima actividad enzimática ($3503 \text{ UE} \cdot \text{L}^{-1}$) al término de ese periodo, seguido de un descenso de la actividad celulasa y nuevamente un crecimiento hacia el final del periodo de fermentación. El contenido de celulosa en el olote es de aproximadamente del 30 al 32% [39], lo cual se relaciona directamente con los altos índices de actividad celulasa obtenidos en la mezcla que contenía olote al 50%. En los tratamientos con olote al 40 y 50%, se presentaron dos picos de actividad enzimática. En el sustrato con olote al 40%, la magnitud de ambos picos fue similar, el primero a los 14 días ($3958 \text{ UE} \cdot \text{L}^{-1}$) y el segundo a los 28 días ($4001 \text{ UE} \cdot \text{L}^{-1}$). En el sustrato con olote al 50%, el primer pico se presentó a los 7 días de fermentación, seguido por una reducción de la actividad enzimática hacia los 14 días y un crecimiento exponencial que alcanzó un máximo de actividad ($6178 \text{ UE} \cdot \text{L}^{-1}$) a los 28 días, la cual fue notablemente mayor que en los

tratamientos con una proporción más baja de olote. Se ha reportado que las poblaciones microbianas en dichos sistemas consumen primero las fuentes de fácil fermentación y se desarrollan a gran velocidad. Sin embargo, van quedando otros azúcares más complejos, como la celulosa, que necesitan de la acción previa de sistemas enzimáticos que degraden dichas macromoléculas en sus azúcares simples, para ser utilizados posteriormente por los microorganismos [34].

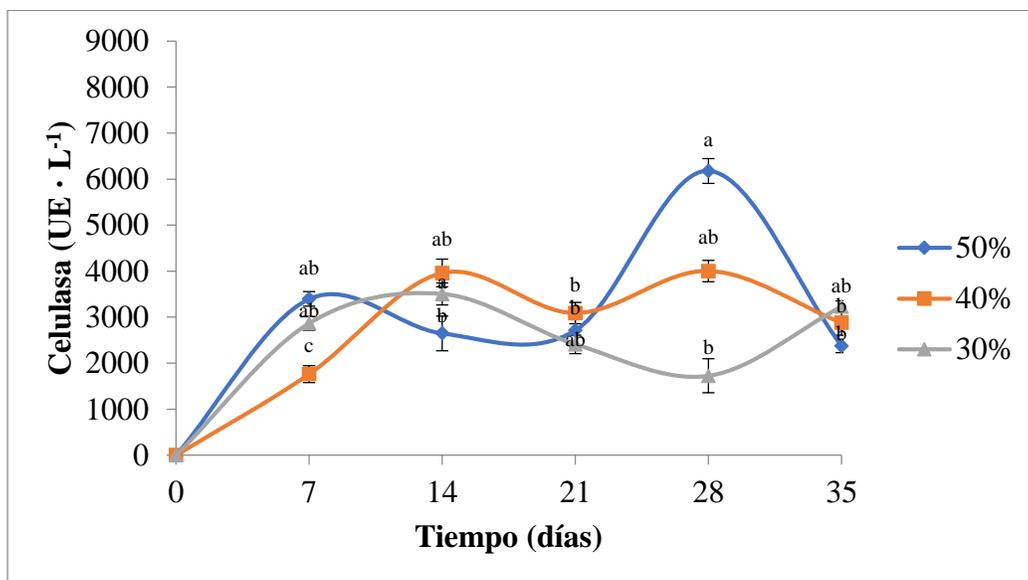


Figura 6. Cinética de actividad celulasa utilizando paja de trigo y olote como soporte (media \pm desviación estándar representada por barras de error; las medias dentro de la cinética del mismo tratamiento que no comparten una letra son significativamente diferentes a $p \leq 0.05$)

6.3 Determinación de la actividad xilanasa

En la Figura 7 se puede observar la cinética de la actividad xilanasa en las diferentes mezclas de paja de trigo y yucca. Se observó un crecimiento exponencial en los tres tratamientos a partir del inicio de la fermentación hasta los 7 días en los tratamientos con yucca al 30 y 40%. De la misma manera, en un estudio realizado utilizando cáscara de sandía, se reportó un incremento gradual de la actividad xilanasa hasta los siete días de la fermentación, sin embargo, después de este tiempo

se observó una reducción en su rendimiento de producción [40]. En el sustrato con yucca al 50%, el crecimiento exponencial se prolongó hasta los 14 días, al final de los cuales se observó el pico máximo de actividad. En un trabajo previo desarrollado utilizando *P. ostreatus*, se obtuvo la actividad máxima de enzima xilanasa a los 21 días de la cinética de fermentación, debido a que la cinética de producción enzimática puede variar dependiendo de la composición de los sustratos [29]. En el sustrato con yucca al 30%, la mayor actividad enzimática no se presentó en el primer pico como en los otros tratamientos, a éste le siguió una disminución de la actividad enzimática y posteriormente un incremento, alcanzando su mayor actividad a los 28 días de la fermentación. El sustrato con mayor proporción de yucca fue en el que se presentó la mayor actividad xilanasa ($17636 \text{ UE} \cdot \text{L}^{-1}$). En otro estudio, realizado en *Aspergillus niger*, en el cual utilizaron, sustratos con alto contenido de materiales lignocelulósicos, tales como, cáscara de arroz y salvado de trigo, en una relación del 50%, se reportaron niveles altos de producción de enzima xilanasa [6].

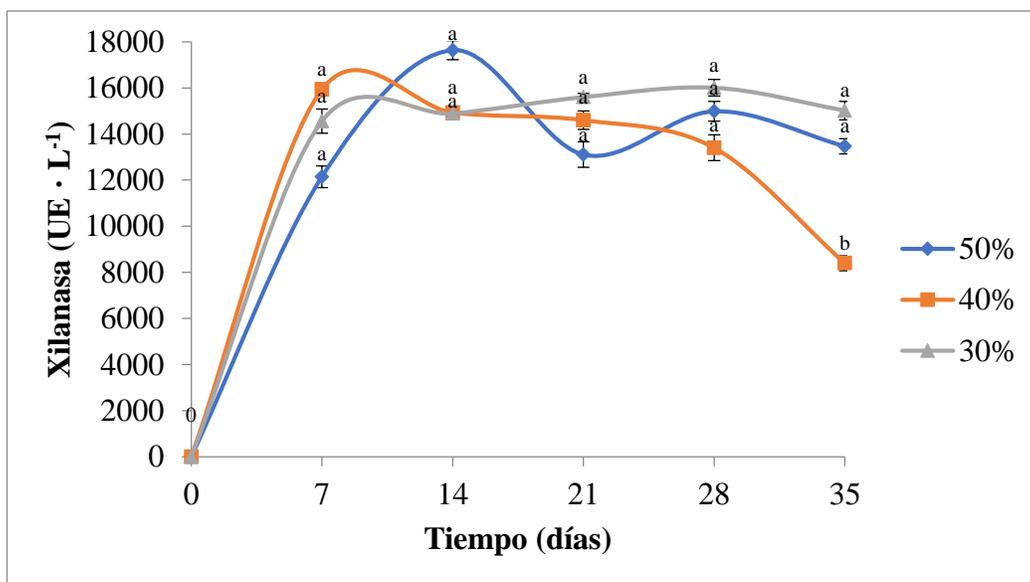


Figura 7. Cinética de actividad xilanasa utilizando paja de trigo y yucca como soporte (media \pm desviación estándar representada por barras de error; las medias dentro de la cinética del mismo tratamiento que no comparten una letra son significativamente diferentes a $p \leq 0.05$).

Los sustratos compuestos por paja de trigo en combinación con maguey (Figura 8) tuvieron comportamientos distintos en función de su proporción. En el sustrato compuesto por maguey en un 30% se observaron dos picos de magnitud similar, el primero presentado a los 14 días ($14911 \text{ UE} \cdot \text{L}^{-1}$) y el segundo a los 28 ($15159 \text{ UE} \cdot \text{L}^{-1}$) seguido de una disminución de la actividad enzimática hacia el final de la fermentación. Se ha reportado que la actividad xilanasa puede ser inhibida durante los primeros días de la cinética de fermentación debido a la presencia de algunos azúcares como maltosa o sacarosa [32]. En el sustrato con un contenido de 40 % de maguey, se observó un comportamiento en forma de parábola, mostrándose un incremento de la actividad enzimática desde el inicio de la fermentación, la mayor actividad xilanasa se presentó a los 21 días ($15812 \text{ UE} \cdot \text{L}^{-1}$), mostrándose una disminución hacia el final del periodo de fermentación. En el sustrato compuesto por maguey en un 50% se observó un crecimiento exponencial a partir del inicio de la fermentación, logrando un pico máximo de actividad enzimática a los 14 días ($15817 \text{ UE} \cdot \text{L}^{-1}$), posteriormente la actividad xilanasa disminuyó hacia los 28 días y se volvió a detectar un incremento hacia el final de la fermentación. Se ha reportado un contenido de lignina del 15 al 19 % en el maguey [38], lo cual puede influir directamente sobre la producción de enzima xilanasa en las mezclas que lo contienen.

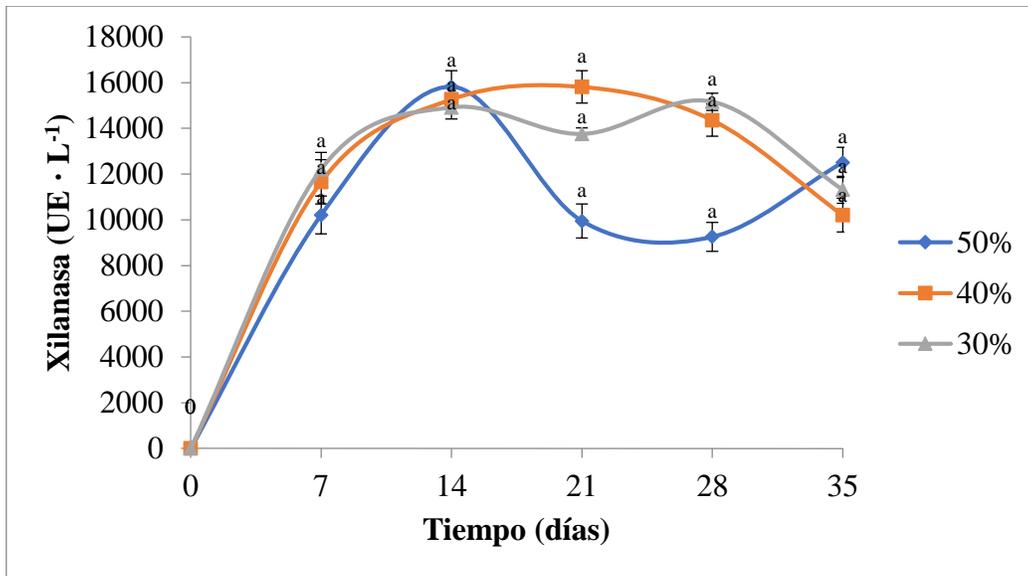


Figura 8. Cinética de actividad xilanasa utilizando paja de trigo y maguey como soporte (media \pm desviación estándar representada por barras de error; las medias dentro de la cinética del mismo tratamiento que no comparten una letra son significativamente diferentes a $p \leq 0.05$).

En los sustratos compuestos por paja de trigo y olote (Figura 9) la actividad xilanasa fue menor que en los sustratos que contenían maguey o yucca. Los rendimientos de obtención de actividad xilanasa varían ampliamente dependiendo de la naturaleza bioquímica, fisiológica y nutricional de los sustratos empleados para la fermentación [40]. El comportamiento de la cinética de fermentación fue similar en los tres tratamientos que contenían olote en diferentes proporciones. Se presentó un crecimiento exponencial a partir del inicio de la fermentación hasta los 7 días en el sustrato con olote al 40%. En un estudio realizado en *Aspergillus niger*, donde se evaluó la producción de la enzima xilanasa, utilizando residuos agroindustriales, se obtuvieron rendimientos de producción hasta los 10 días de la cinética de fermentación [6]. En otro estudio, donde se utilizó una cepa de *Aspergillus ficum*, se obtuvo una producción máxima de xilanasa al cuarto día, utilizando bagazo y salvado de trigo, como soporte [41]. En los otros dos tratamientos la actividad xilanasa aumentó hasta los 14 días, alcanzando la mayor actividad enzimática al final de ese periodo y posteriormente decreciendo y aumentando nuevamente. El sustrato con menor cantidad

de olote presentó una mayor actividad xilanasa ($7296 \text{ UE} \cdot \text{L}^{-1}$) que aquellos con mayor proporción de éste.

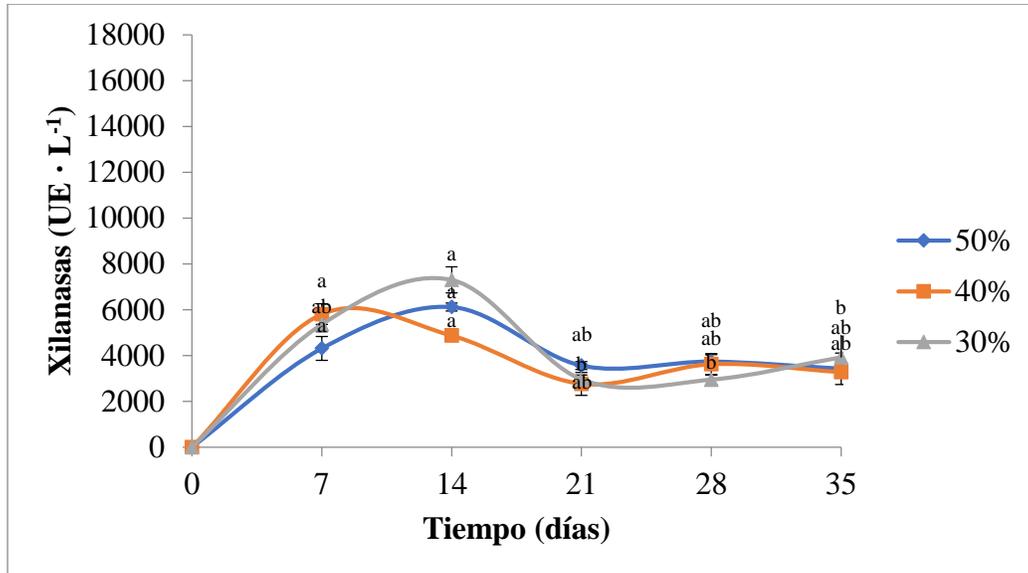


Figura 9. Cinética de actividad xilanasa utilizando paja de trigo y olote como sustrato (media \pm desviación estándar representada por barras de error; las medias dentro de la cinética del mismo tratamiento que no comparten una letra son significativamente diferentes a $p \leq 0.05$).

6.4 Comparación de actividad enzimática máxima de los diferentes sustratos en fermentación en estado sólido.

En la Figura 10 se puede observar que la mayor actividad amilasa y xilanasa fueron obtenidas en sustratos compuestos por paja de trigo y yucca en un 50 % a los 7 y 14 días, respectivamente, del desarrollo del hongo *P. ostreatus*. La mayor actividad celulasa fue alcanzada en el sustrato con un contenido de maguey del 50 %. El olote presentó los menores rendimientos enzimáticos. No se presentó diferencia estadística significativa ($p \geq 0.05$) en la producción enzimática en los tres sustratos utilizados, sin embargo, se obtuvo un mayor rendimiento de producción enzimática en los sustratos que contenían yucca y maguey.

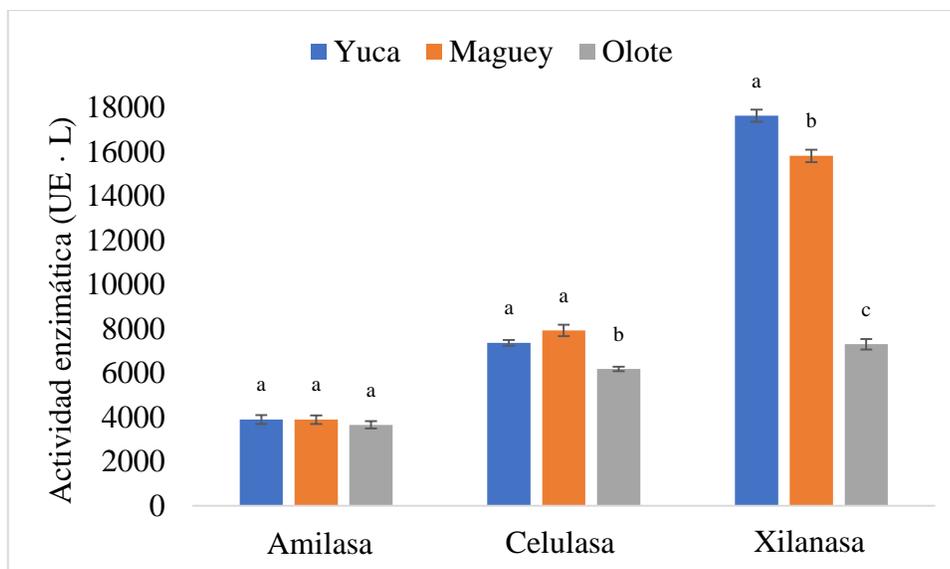


Figura 10. Comparación del máximo rendimiento de actividad enzimática en los distintos sustratos (media \pm desviación estándar representada por las barras de error; las medias dentro de la cinética del mismo tratamiento que no comparten una letra son significativamente diferentes a $p \leq 0.05$).

El comportamiento de la producción enzimática varía en cada sustrato, debido, a la composición química de éstos [42]. La lignocelulosa es el componente principal de la biomasa vegetal y es el más abundante de los recursos renovables. Se compone de tres tipos de polímeros: celulosa, hemicelulosa y lignina. La celulosa y la hemicelulosa son macromoléculas construidas a partir de diferentes azúcares. La lignina es un heteropolímero amorfo, insoluble en agua y ópticamente inactivo, se forma a partir de subunidades de fenilpropano interconectadas mediante enlaces no hidrolizables carbono-carbono y carbono-oxígeno-carbono. La composición y las proporciones de estos tres compuestos varían entre cada sustrato [43]. Por su parte, el almidón es la principal fuente energética de reserva en la mayoría de los vegetales y se puede encontrar en forma de amilosa o amilopectina, la yuca es una fuente importante de almidón [44]. En la Tabla 2 se muestra la proporción de cada uno de estos polisacáridos presentes en los distintos materiales utilizados como soporte en el presente estudio.

Se ha reportado que, *P. ostreatus* tiene la capacidad de producir enzimas hidrolíticas (como la amilasa, celulasa y xilanas) que degradan polisacáridos y ligninolíticas (como la lacasa o las oxidasas y peroxidasas de fenol). Durante el crecimiento y el desarrollo *P. ostreatus* se presenta una producción de enzimas que degradan los componentes insolubles y gran cantidad de material lignocelulósico en compuestos solubles de bajo peso molecular que el hongo aprovecha para su nutrición [45].

La yuca fue el material utilizado con mayor contenido de almidón, es por esto que el pico máximo de actividad amilasa se presentó al inicio de la fermentación en los sustratos que la contenían, a comparación de los sustratos que contenían maguey, los cuales presentaron la mayor actividad amilasa a los 28 días, y los que contenían olote a los 14 y 35 días de fermentación. Los microorganismos suelen utilizar durante los primeros días de cultivo los polisacáridos más simples como los azúcares reductores y el almidón, mientras se encuentren disponibles en el sustrato, posteriormente comienzan a degradar moléculas más complejas como la celulosa, la hemicelulosa y la lignina convirtiéndolas a moléculas simples que puedan utilizar para su nutrición [34], [40], [46].

El maguey es el sustrato que tiene mayor contenido de celulosa, y también en el que se presentó una mayor actividad celulasa, teniendo dos grandes picos de actividad enzimática durante el periodo de fermentación. En la yuca también se mostró una actividad amilasa importante, estadísticamente similar a la del maguey, en ambos sustratos la mayor actividad se dio con la mayor proporción de yuca o maguey (50 %) en relación a la paja de trigo, lo cual denota que dichos materiales promueven una mayor producción de celulasas que la paja de trigo.

A pesar de que el olote de maíz posee una gran cantidad de hemicelulosa, la actividad xilanasa fue menor que en los otros sustratos, esto puede ser debido a su alto contenido de lignina que dificulta el acceso a las hemicelulosas, por lo que es necesario que el hongo utilice primeramente su complejo enzimático ligninolítico para poder acceder a este sustrato [47].

Hay diferentes factores que deben ser considerados para cultivar y producir comercialmente el hongo *P. ostreatus*, por ejemplo, el rendimiento de producción de cuerpos fructíferos en relación al sustrato utilizado y la producción enzimática. En un estudio previo se reportó una eficiencia biológica de hasta 69.4 % en el cultivo de *P. ostreatus* sobre bagazo de yucca combinado con paja de trigo [48] y de hasta un 141.29 % al ser cultivado en paja de trigo con maguey [47].

7. CONCLUSIONES

Los resultados que se obtuvieron de la cinética de producción enzimática explican el efecto de la dinámica de formación de enzimas extracelulares durante la degradación de residuos agroindustriales utilizados para el crecimiento de *P. ostreatus* y permiten establecer protocolos para la producción de enzimas hidrolíticas, ya que al observar el comportamiento de la cinética enzimática se puede conocer el momento en el cual el hongo está más activo metabólicamente, y estimar el tiempo de mayor producción de la enzima.

Se encontró que la composición química cada mezcla de sustrato está estrechamente relacionada con la producción enzimática del hongo *P. ostreatus*. No hubo diferencia significativa en la producción de amilasa en los tres residuos utilizados como sustrato. En el caso de la celulasa, se obtuvo mayor rendimiento de producción de la enzima en los sustratos que contenían maguey y yuca. Mientras que se obtuvieron mejores resultados en la producción de xilanasas en las mezclas de sustrato que contenían yuca.

Hay que recordar que además de la producción de enzimas mediante el cultivo del hongo *P. ostreatus* también se obtiene un alimento con alto valor nutritivo para el ser humano, con un alto aporte de proteína de alta calidad, fibra dietética, vitaminas y minerales, su aporte nutricional va a depender en gran medida del sustrato utilizado, por lo que es conveniente valorar su composición química así como su eficiencia biológica, es decir, el rendimiento de producción con respecto a la cantidad de sustrato utilizado.

Otra gran ventaja de este sistema de bioconversión ecológica es que posterior al cultivo las características del sustrato son mejoradas por las enzimas que produce el hongo durante su

crecimiento, dando como resultado un producto que puede ser reutilizado para el cultivo de mas hongos comestibles, para la alimentación animal al tener una digestibilidad mejorada, o bien para la biorremediación de suelos.

El uso de desechos agroindustriales de bajo valor comercial, como lo son los residuos de yucca, el bagazo de maguey y el olote de maíz, para la producción comercial de hongos *P. ostreatus* permite generar productos con valor económico al mismo tiempo que se contribuye al cuidado del medio ambiente, ya que de otra manera esos residuos representarían una fuente de contaminación.

8. REFERENCIAS

- [1] F. Bach, C. V. Helm, M. B. Bellettini, G. M. Maciel, C. Windson, and I. Haminiuk, “Edible mushrooms: a potential source of essential amino acids, glucans and minerals,” *Int. J. Food Sci. Technol.*, vol. 52, pp. 2382–2392, 2017. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13522>
- [2] F. Zhu, B. Du, Z. Bian, and B. Xu, “Beta-glucans from edible and medicinal mushrooms: Characteristics, physicochemical and biological activities,” *J. Food Compos. Anal.*, vol. 41, pp. 165–173, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2015.01.019>
- [3] V. Lavelli, C. Proserpio, F. Gallotti, M. Laureati, and E. Pagliarini, “Circular reuse of bio-resources: The role of *Pleurotus* spp. in the development of functional foods,” *Food Funct.*, vol. 9, no. 3, pp. 1353–1372, 2018. <https://doi.org/10.1039/C7FO01747B>
- [4] T. Jayakumar, P. A. Thomas, J. R. Sheu, and P. Geraldine, “In-vitro and in-vivo antioxidant effects of the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*,” *FRIN*, vol. 44, no. 4, pp. 851–861, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.015>
- [5] M. T. Varnero, M. S. Quiroz, and C. H. Álvarez, “Utilización de residuos forestales lignocelulósicos para producción del hongo ostra (*Pleurotus ostreatus*),” *Inf. tecnológica*, vol. 21, no. 2, pp. 13–20, 2010. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642010000200003>
- [6] J. H. A. Betini, M. Michelin, S. D. C. Peixoto-Nogueira, J. A. Jorge, H. F. Terenzi, and M. L. T. M. Polizeli, “Xylanases from *Aspergillus niger*, *Aspergillus niveus* and *Aspergillus ochraceus* produced under solid-state fermentation and their application in cellulose pulp bleaching,” *Bioprocess Biosyst. Eng.*, vol. 32, no. 6, pp. 819–824, 2009. <https://doi.org/10.1007/s00449-009-0308-y>
- [7] J. A. Pineda-Insuasti, L. B. Ramos-Sánchez, and C. P. Soto-Arroyave, “Producción de *Pleurotus ostreatus* por fermentación en estado sólido: una revisión,” *ICIDCA. Sobre los*

- Deriv. la Caña Azúcar*, vol. 48, no. 2, pp. 13–23, 2014.
- [8] FEDNA, “Paja de cereales (trigo y cebada),” *Retrieved 5 May 2020*, 2019. [Online]. Available: http://www.fundacionfedna.org/ingredientes_para_piensos/paja-de-cereales-trigo-y-cebada
- [9] O. Kadri *et al.*, “Yucca filifera, a new host of *Diplodia mutila* in Morocco,” *Int. J. Recent Biotechnol.*, vol. 2, no. 4, pp. 13–17, 2014.
- [10] A. Sotelo, S. López-García, and F. Basurto-Peña, “Content of nutrient and antinutrient in edible flowers of wild plants in Mexico,” *Plant Foods Hum. Nutr.*, vol. 62, no. 3, pp. 133–138, 2007. <https://doi.org/10.1007/s11130-007-0053-9>
- [11] F. J. García, “Análisis de la producción de maguey (*Agave spp*) en México,” 2017.
- [12] C. I. Godínez Hernández, “Estudios sobre los subproductos de la elaboración del mezcal y usos alternativos del maguey,” 2017. <http://ninive.uaslp.mx/xmlui/handle/i/4522>
- [13] (ASERCA) Agencia de Servicios a la Comercialización y Desarrollo de Mercados Agropecuarios, “Maíz grano cultivo representativo de México,” *Retrieved 5 May 2020*, 2018. [Online]. Available: <https://www.gob.mx/aserca/articulos/maiz-grano-cultivo-representativo-de-mexico?idiom=es>.
- [14] J. A. Córdoba *et al.*, “Caracterización y valoración química del olote: degradación hidrotérmica bajo condiciones subcríticas,” *Rev. Latinoam. Química*, vol. 41, no. 3, pp. 171–184, 2013.
- [15] J. M. Arrúa Romero, Q. Re, J. Efraín, F. Elango, and P. Tabora, “Producción del hongo ostra (*Pleurotus ostreatus*) a partir de las malezas *Paspalum fasciculatum* y *Rottboellia cochinchinensis*,” 2007.
- [16] T. Eggen and V. Sasek, “Use of edible and medicinal oyster mushroom [*Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm.] spent compost in remediation of chemically polluted soils,” *Int. J. Med.*

- Mushrooms*, vol. 4, no. 3, 2002. <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushr.v4.i3.90>
- [17] X. Li *et al.*, “Mechanisms of Cd and Cr removal and tolerance by macrofungus *Pleurotus ostreatus* HAU-2,” *J. Hazard. Mater.*, vol. 330, pp. 1–8, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.01.047>
- [18] S. Sadiq, M. Mahmoodul-Hassan, K. Ahad, and S. Nazir, “Bioremediation of hexachlorocyclohexane (HCH) in soil using spent mushroom compost of *Pleurotus ostreatus*,” *Bioremediat. J.*, vol. 22, no. 3–4, pp. 126–135, 2018. <https://doi.org/10.1080/10889868.2018.1516615>
- [19] M. M. Santillán Tandapilco and V. E. Morocho Noboa, “Evaluación de sustratos lignocelulósicos para la producción del hongo ostra (*Pleurotus ostreatus*) en la Parroquia Tarqui,” 2018.
- [20] M. E. R. Rosales, E. C., & Alegría, “Enzimas aplicadas en procesos industriales,” *Rev. Digit. Univ.*, vol. 15, no. 12, pp. 1–11, 2017. <http://www.revista.unam.mx/vol.15/num12/art96/>
- [21] H.-T. Song *et al.*, “Synergistic effect of cellulase and xylanase during hydrolysis of natural lignocellulosic substrates,” *Bioresour. Technol.*, vol. 219, pp. 710–715, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.08.035>
- [22] S. Singh, V. Sharma, and M. L. Soni, “Biotechnological applications of industrially important amylase enzyme,” *Int. J. Pharma Bio Sci.*, vol. 2, no. 1, pp. 486–496, 2011.
- [23] P. N. Padma, P. Sravani, P. Mishra, N. Sneha, and K. Anuradha, “Synergistic effect of multiple enzymes on apple juice clarification,” *Indian J. Sci. Technol.*, vol. 10, no. 10, pp. 1–5, 2017. <https://doi.org/10.17485/ijst/2017/v10i10/107716>
- [24] W. Liu, M. A. Brennan, L. Serventi, and C. S. Brennan, “Effect of cellulase, xylanase and α -amylase combinations on the rheological properties of Chinese steamed bread dough enriched in wheat bran,” *Food Chem.*, vol. 234, pp. 93–102, 2017.

- [25] A. Madhu and J. N. Chakraborty, “Developments in application of enzymes for textile processing,” *J. Clean. Prod.*, vol. 145, pp. 114–133, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.160>
- [26] P. Biswas, A. K. Bharti, A. Kadam, and D. Dutt, “Wheat bran as substrate for enzyme production and its application in the bio-deinking of mixed office waste (MOW) paper,” *BioResources*, vol. 14, no. 3, pp. 5788–5806, 2019.
- [27] P. Bajaj and R. Mahajan, “Cellulase and xylanase synergism in industrial biotechnology,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 103, no. 21–22, pp. 8711–8724, 2019.
- [28] A. Singh *et al.*, “The enzyme biorefinery platform for advanced biofuels production,” *Bioresour. Technol. Reports*, vol. 7, p. 100257, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100257>
- [29] M. A. Cruz-Hernández, A. C. Ríos-Sánchez, F. Morales-Luna, M. Flores-Verastegui, M. E. Castelo-Mejia, and R. Belmares-Cerda, “Evaluación de la producción de enzimas celulolíticas utilizando *Pleurotus ostreatus*,” *Av. Investig. En Inocuidad Aliment.*, vol. 2, pp. 5–11, 2019.
- [30] G. L. Miller, “Modified DNS method for reducing sugars,” *Anal. Chem.*, vol. 31, no. 3, pp. 426–428, 1959.
- [31] N. Bansal, R. Tewari, R. Soni, and S. K. Soni, “Production of cellulases from *Aspergillus niger* NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues,” *Waste Manag.*, vol. 32, no. 7, pp. 1341–1346, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2012.03.006>
- [32] G. Suvarna, C. Subba, R. Sreenivas, P. J. Hobbs, and R. Shetty, “Enhanced production of xylanase by a newly isolated *Aspergillus terreus* under solid state fermentation using palm industrial waste: A statistical optimization,” *Biochem. Eng. J.*, vol. 48, no. 1, pp. 51–57, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2009.08.005>

- [33] R. O. Ergun, S. O., & Urek, "Production of ligninolytic enzymes by solid state fermentation using *Pleurotus ostreatus*," *Ann. Agrar. Sci.*, vol. 15, no. 2, pp. 273–277, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.aasci.2017.04.003>
- [34] Z. Rodríguez, R. Boucourt, A. Elías, and M. Madera, "Dinámica de fermentación de mezclas de caña (*Saccharum officinarum*) y boniato (*Ipomea batata*)," *Rev. Cuba. Cienc. Agrícola*, vol. 35, no. 2, pp. 147–151, 2001.
- [35] V.-C. M.A., G. Mata, and J. M. Savoie, "Waste-reducing cultivation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus pulmonarius* on coffee pulp: changes in the production of some lignocellulolytic enzymes," *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 18, no. 3, pp. 201–207, 2002. <https://doi.org/10.1023/A:1014999616381>
- [36] A. Heredia Solis, E. L. Esparza Ibarra, L. Romero Bautista, F. Cabral Arellano, and R. Bañuelo Valenzuela, "Bagazos de *Agave salmiana* y *Agave weberi* utilizados como sustrato para producir *Pleurotus ostreatus*," *Rev. Iberoam. Ciencias*, vol. 1, no. 5, pp. 103–110, 2014. <http://hdl.handle.net/20.500.11845/565>
- [37] J. Pagés-Díaz, I. Pereda-Reyes, M. J. Taherzadeh, I. Sárvári-Horváth, and M. Lundin, "Anaerobic co-digestion of solid slaughterhouse wastes with agro-residues: synergistic and antagonistic interactions determined in batch digestion assays," *Chem. Eng. J.*, vol. 245, pp. 89–98, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.02.008>
- [38] A. Baena González, "Aprovechamiento del bagazo de maguey verde (*Agave Salmiana*) de la agroindustria del mezcal en San Luis Potosí para la producción de hongo ostra (*Pleurotus ostreatus*)," 2005. <http://hdl.handle.net/11627/65>
- [39] J. A. Córdoba *et al.*, "Caracterización y valoración química del olote: degradación hidrotérmica bajo condiciones subcríticas," *Rev. Latinoam. Química*, vol. 41, no. 3, pp. 171–184, 2013.

- [40] S. A. Mohamed, A. L. Al-Malki, J. A. Khan, S. A. Kabli, and S. M. Al-Garni, “Solid state production of polygalacturonase and xylanase by *Trichoderma* species using cantaloupe and watermelon rinds,” *J. Microbiol.*, vol. 51, no. 5, pp. 605–6011, 2013. <https://doi.org/10.1007/s12275-013-3016-x>
- [41] M. Costa, M. Torres, H. Magariños, and A. Reyes, “Producción y purificación parcial de enzimas hidrolíticas de *Aspergillus ficuum* en fermentación sólida sobre residuos agroindustriales,” *Rev. Colomb. Biotecnol.*, vol. 12, no. 2, pp. 163–175, 2010.
- [42] P. Arrillaga and L. Segura, “Determinación rápida de la composición química en residuos agroindustriales por medio de termogravimetría,” *Investig. Científicas y Agrotecnológicas para la Segur. Aliment.*, pp. 402–410, 2019.
- [43] L. Marmolejo, A. Pérez, P. Torres, Á. Cajigas, and C. Cruz, “Aprovechamiento de los residuos sólidos generados en pequeñas industrias de almidón agrio de yuca,” *Livest. Res. Rural Dev.*, vol. 20, no. 7, 2008.
- [44] Y. Monroy, S. Rivero, and M. A. García, “Microstructural and techno-functional properties of cassava starch modified by ultrasound,” *Ultrason. Sonochem.*, vol. 42, pp. 795–804, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.12.048>
- [45] A. B. Piña-Guzmán, D. A. Nieto-Monteros, and F. Robles-Martínez, “Utilización de residuos agrícolas y agroindustriales en el cultivo y producción del hongo comestible seta (*Pleurotus* spp.),” *Rev. Int. Contam. Ambient.*, vol. 32, pp. 141–151, 2017. <http://dx.doi.org/10.20937/RICA.2016.32.05.10>
- [46] M. Kapoor, D. Panwar, and G. S. Kaira, “Bioprocesses for enzyme production using agro-industrial wastes: Technical challenges and commercialization potential,” in *Agro-Industrial Wastes as Feedstock for Enzyme Production*, 2016, pp. 61–93. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802392-1.00003-4>

- [47] H. Espinosa, G. L. Cortés, and J. A. Rivera-Tapia, “Determinación de los parámetros de productividad de cepas de *Pleurotus ostreatus* y *P. opuntiae* cultivadas en paja de trigo y pencas de maguey combinadas con sustratos agrícolas,” *Sci. Fungorum*, vol. 49, no. 1216, pp. 1–9, 2019. <https://doi.org/10.33885/sf.2019.49.1216>
- [48] M. D. Nair, G. Padmaja, and S. N. Moorthy, “Biodegradation of cassava starch factory residue using a combination of cellulases, xylanases and hemicellulases,” *Biomass and Bioenergy*, vol. 35, no. 3, pp. 1211–1218, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2010.12.009>
- [49] Aiza, L. G., & Zuria, I. (2010). aves visitantes de flores de maguey (agave). [https://sora.unm.edu/sites/default/files/ON%2021%20\(1\)%2017-30.pdf](https://sora.unm.edu/sites/default/files/ON%2021%20(1)%2017-30.pdf)
- [50] Escovedo Castillo, V. H., & Snchez Pale, J. r. (23 de 10 de 2019). determinacion del agente casual de la muerte descendente de hojas de yuca (*Yucca filifera*). <http://148.215.1.182/handle/20.500.11799/104943>
- [51] H. A. Ruíz-Leza, R. M.-J. (15 de 03 de 2007). diseño de biorreactores para fermentacion en medio solido. <https://www.redalyc.org/pdf/620/62060105.pdf>
- [52] Hernan Celaya Michel, Alejandro E. Castellanos-Villegas. (09 de 2011). Mineralización de nitrógeno en el suelo de zonas áridas y semiáridas. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-57792011000300343
- [53] Jhon Alexander Córdobaac, E. S. (12 de 2013). Caracterización y valoración química del olote: degradación hidrotérmica bajo condiciones subcríticas. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0370-59432013000300004
- [54] Marquez, I. A. (01 de 2015). <https://www.redalyc.org/pdf/620/62060105.pdf>.

<https://www.redalyc.org/pdf/620/62060105.pdf>

[55] sanchez, C. (03 de 12 de 2009). Cultivo de *Pleurotus ostreatus* y otros hongos comestibles.

<https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-009-2343-7>

[56] Sánchez, J. E. (12 de 2007). La Biología, el cultivo y las propiedades nutricionales y medicinales de las setas *Pleurotus* spp.

[https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/56679183/8Pleurotus2017_buena_informacion.pdf?](https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/56679183/8Pleurotus2017_buena_informacion.pdf?1527570198=&response-content)

[1527570198=&response-content](https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/56679183/8Pleurotus2017_buena_informacion.pdf?1527570198=&response-content)

[disposition=inline%3B+filename%3DPleurotus2017_buena_informacion.pdf&Expires=16](https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/56679183/8Pleurotus2017_buena_informacion.pdf?1527570198=&response-content)

[04509324&Signature=KKmv8HDs2JgWGMc-97c9k5rkCRzEAvglZS-RXict416s](https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/56679183/8Pleurotus2017_buena_informacion.pdf?1527570198=&response-content)

[57] ¿Pará que sirve la Amilasa? Beneficios y propiedades | NutriTienda. (2010).

Aiza, L. G., & Zuria, I. (2010). AVES VISITANTES A LAS FLORES DEL MAGUEY (AGAVE).

[https://sora.unm.edu/sites/default/files/ON%2021%20\(1\)%2017-30.pdf](https://sora.unm.edu/sites/default/files/ON%2021%20(1)%2017-30.pdf)

[58] american biosistem. (s.f.).

<https://www.americanbiosystems.com/productos/enzymes/xilanasas/?lang=es#:~:text=Xilanasas%20es%20una%20enzima%20derivada,paredes%20celulares%20de%20las%20planta>

[nasa%20es%20una%20enzima%20derivada,paredes%20celulares%20de%20las%20planta](https://www.americanbiosystems.com/productos/enzymes/xilanasas/?lang=es#:~:text=Xilanasas%20es%20una%20enzima%20derivada,paredes%20celulares%20de%20las%20planta)