

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL**



**PRODUCCIÓN DE ENZIMAS POR CULTIVO EN MEDIO SÓLIDO USANDO
SUBPRODUCTOS AGROALIMENTARIOS.**

TESIS

Que presenta:

IGNACIO CRISTÓBAL COLÓN ALARCÓN

Como requisito parcial para obtener el grado de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Saltillo, Coahuila, México. Noviembre del 2016

PRODUCCIÓN DE ENZIMAS POR CULTIVO EN MEDIO SÓLIDO USANDO
SUBPRODUCTOS AGROALIMENTARIOS

Tesis

Elaborada por IGNACIO CRISTÓBAL COLÓN ALARCÓN como requisito parcial
para obtener el grado de Ingeniero en Ciencia y Tecnología de Alimentos con la
supervisión y aprobación del Comité de Asesoría

Dr. Antonio Francisco Aguilera Carbó
Asesor Principal

Mc. Carlos Alberto García Agustince
Asesor

QFB. María del Carmen Julia García
Asesor

Dr. José Dueñez Alanís
Coordinador de la División de Ciencia Animal
UAAAN

*“Tener éxito en la vida no es llegar a tener fama,
sino a realizar aquello que realmente deseas.”*

Anónimo

Dedicatorias

A mis padres Mario Simón Colón Sandoval y Guadalupe Pascuala Alarcón Álvarez, gracias por su apoyo incondicional, motivación y gracias por darme la mejor de las herencias la vida y una profesión.

A mi tío Ignacio Colón Sandoval, gracias infinitas, sé que las palabras nunca podre pagarle su apoyo incondicional y su motivación de seguir adelante y ser alguien en la vida.

A mi abuela Evodia Sandoval Salinas (+), por ser una gran mujer e inculcarme los valores de una gran familia y que siempre guardare con cariño, y luchaste por el bienestar de tu familia este logro te lo debo también a ti hasta el cielo donde te encuentres bendice mi camino.

A mi abuela Hermelinda Álvarez Valente (+), por ser una mujer de lucha y sacar adelante a tu familia siempre luchaste por el bienestar de tu familia este logro te lo debo también a ti hasta el cielo donde te encuentres bendice mi camino.

A mis tíos, Heladio, Leonardo, Lucila Florencia, Margarita y Martina Colón Sandoval, por sus consejos y apoyo que me brindaron cuando más lo necesite.

A mis tíos, Tomas, Edilberto, Javier, Adelfa, Ana, Oralia y Roció Alarcón Álvarez, por ese apoyo que nos brindaron que sé que con las gracias no se pagan, por todos sus consejos y apoyo.

A mis hermanos, Belia, Carlos y María Magdalena, gracias por su apoyo sé que no soy un hermano ejemplar pero saben que en el fondo de ese corazón de piedra encontraran un cariño.

A mi tío Emilio García Pérez (+), por ser una gran hombre, siempre recordare tus consejos tus risas y ante todo tu cariño

A mi tía Glafira Colón Soriano, por su apoyo incondicional, sus palabras de apoyo si usted no hubiera logrado esta meta.

A la familia Cisneros Sorroza a mi tío Lino, su esposa Valentina e hijos, Luis Enrique, Pedro Pablo, Alelhi y Jocabet, por ser una familia que siempre me apoya incondicionalmente no hay palabras para agradecer.

A la familia Reyna Díaz, a Roberto, Cristina y sus hijas Aurora y Jimena, por el cariño y apoyo brindado gracias infinitas.

A la familia Rivera Reyna, a Rodolfo, Silvia Oralia, Nazaret, Xitlali y Emiliano, por su apoyo y cariño brindado gracias.

A mi sobrino Mario Armando, que fuiste una luz que llevo a brillar en el desierto.

A mi cuñado, Helber Adin Vázquez, por su apoyo para redactar este documento y brindarme una mano.

A mi amigo Alberto Romeo Añorve (Gusano), gracias por esa amistad brinda de años y espero que perdure por muchos años más.

A mis compañeros de la SAGARPA, Ing. Vladimir, Ing. Miguel Ángel, Ing. Hilario, Antonio, Técnicos: Eddie, Demetrio, José Luis, Jesús Barrios, gracias por su apoyo y amistad.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Antonio Francisco Aguilera Carbó por apoyarme y dirigirme este proyecto, por brindarme su apoyo y estar siempre presente para cada cuestión que se me presenta.

Al TLQ Carlos Alberto Arévalo Sanmiguel por sus aportaciones y sugerencias para la culminación de este trabajo.

Al Mc. Enrique Albelo Hernandez, por apoyarme a realizar este trabajo de tesis que sin ti esto no fuera una realidad.

A mis compañeros de carrera, Candi, Diego, Alfredo, Benja, Yam, Juan, Octavio Moreno, Octavio Regalado, Elvia, Juana, Lorena, Toñita, Anahy, Cintya, Valentina, Miguel Angel, Antonio, Yari, Dalia, Beti, Rafa, Martha, Cristal, Susana, Malu y Lucia.

A mis amigos del CBT´a 102, Juan, Rosendo, Silverio, Marbin, Eduardo, Gusano, Nayeli, Concepcion, Dalila y Yeraldini.

A mis asesores, QFB Maria del Carmen Julia Garcia y Mc Carlos Alberto Garcia Agustince, por su apoyo a culminar este trabajo.

A mi Alma Mater, por abrirme sus puertas y darme ese calor de hogar para culminar una meta más en mi vida.

A mis maestros de formación, la profesora Xochitl Ruelas Chacon, Oscar Noe Reboloso, Laura Fuentes, Maria Hernandez, Francisco Centeno, Yajaira Lopez.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE TABLAS	vii
RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUCCION	1
1.1 OBJETIVOS	3
1.1.1 Objetivo general	3
1.1.2 Objetivo específico:	3
1.2 JUSTIFICACIÓN	4
1.3 HIPOTESIS	5
2. REVISIÓN DE LITERATURA	6
2.1 Enzimas	6
2.2 Principales usos de las enzimas	6
2.2.1 Xilanasas	9
2.2.3 Pectinasa	10
2.2.3 Glucosidasas	11
2.3 SISTEMAS DE PRODUCCIÓN ENZIMÁTICA	12
2.3.1 Fermentación en medio sólido (FMS)	12
2.3.1.1 Ventajas y desventajas de la fermentación en medio sólido (FMS)	14
2.3.1.2 Factores que determinan la fermentación en medio solido (FMS).	15
2.3.1.2.1 pH	15
2.3.1.2.2 Temperatura	16
2.4 MICROORGANISMO	17
2.4.1 Crecimiento microbiano	17
2.4.2 Aspergillus oryzae	18

2.5 Salvado de trigo	19
2.6 Harina de maíz.....	21
2.7 Cáscara de papa.....	23
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
3.1 Caracterización físico química de los residuos industriales (cáscara de papa, harina de maíz y salvado de trigo).....	25
3.1.1 Material Vegetal.....	25
3.1.2 Caracterización físico-química de los residuos industriales (cáscara de papa, harina de maíz y salvado de trigo) mediante un análisis proximal	25
3.1.2.1 Materia seca total	26
3.1.2.2 Cenizas.....	27
3.1.2.3 Extracto etéreo (Método Soxhlet).....	28
3.1.2.4 Nitrógeno y proteína cruda o bruta (Método Kjeldhal)	30
3.1.2.5 Fibra cruda.....	32
3.1.2.6 Extracto libre de nitrógeno (ELN).....	33
3.1.3 Determinación de minerales (Método húmedo por absorción atómica; Fick y col., 1976).....	34
3.2 Obtención del inóculo, condiciones de crecimiento e inoculación.....	35
3.2.1 Evaluación de la velocidad de crecimiento microbiano.	35
3.3 Determinación de actividad xilanasa (Miller; 1959)	36
3.4 Determinación de actividad pectinasa (Miller; 1959).....	36
3.5 Determinación de actividad endoglucanasa (Miller, 1959).....	37
3.6 Diseño experimental	38
4. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	40
4.1 Caracterización fisicoquímica de los residuos industriales (cáscara de papa, harina de maíz y salvado de trigo).....	40
4.3 Velocidad de crecimiento del hongo <i>Aspergillus oryzae</i>.....	43
4.4 Producción de xilanasa en fermentación en medio sólido (FMS).....	47

4.5 Producción de pectinasa en fermentación en medio sólido (FMS)	49
4.4 Producción de endoglucanasa en fermentación en medio sólido (FMS).....	50
5. CONCLUSIONES	52
6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFÍA	53
ANEXOS.....	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Aspergillus oryzae</i>	18
Figura 2. Salvado de Trigo	19
Figura 3. Fécula o Harina de Maíz	21
Figura 4. Cáscara de papa.....	23
Figura 5. Determinación de materia seca total (MST) y humedad.....	27
<i>Figura 6. Mufla, equipo utilizado para la determinación de cenizas.</i>	<i>28</i>
Figura 7. Equipo utilizado para la determinación de extracto etéreo por el método Soxhlet.....	29
Figura 8. Equipo Kjeldhal utilizado para la determinación de nitrógeno (por conversión proteína cruda o bruta), se aprecian los 3 procesos que conlleva el método (digestión, destilación y titulación).	32
Figura 9. Equipo Labconco para la determinación de fibra cruda.	33
Figura 10. Crecimiento de <i>A. oryzae</i> sobre los tratamiento	45
Figura 11. Curvas de velocidad de crecimiento de los T-3, T-4 y T-5.....	46
Figura 12. Comportamiento de la actividad xilanasa.....	49
Figura 13. Comportamiento de la actividad pectinasa	50
Figura 14. Comportamiento de la actividad endoglucanasa.....	51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de algunas enzimas de interés en alimentos.	8
Tabla 2. análisis físico químico de salvado de trigo	20
Tabla 3. Análisis físico-químico de diferentes fuentes de maíz usado en la alimentación animal.....	22
Tabla 4. Análisis físico químico de la papa	24
Tabla 5. Tratamientos del experimento.....	39
Tabla 6. Análisis físico químico de los residuos industriales.....	42
Tabla 7. Crecimiento de <i>A. oryzae</i> (cm) bajo la influencia de diferentes gramos de cáscara de papa y diferentes tiempos de fermentación.....	44

PRODUCCIÓN DE ENZIMAS POR CULTIVO EN MEDIO SÓLIDO USANDO SUBPRODUCTOS AGROALIMENTARIOS.

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se desarrolló bajo condiciones controladas de laboratorio, el objetivo es producir enzimas con residuos Agroindustriales a través de *Aspergillus oryzae* por fermentación en medio sólido. La cepa fue proporcionada por el Centro Universitario de Santic Spiritus, Facultad Agropecuaria de Montaña del Escambray, Trinidad, Cuba. Para el desarrollo del mismo se montó un Diseño Completamente Aleatorizado (DCA), se analizaron previamente la composición físico-química de cada una de las materias primas a utilizar (cáscara de papa, salvado de trigo y harina de Maíz), se mezclaron para formar los medios de fermentación y se inoculó sobre ella una azadilla de esporas del hongo en cuestión dejándolos por 148 horas bajo condiciones ideales de crecimiento y evaluándose cada 24 horas la expansión de la misma sobre la caja de Petri. En todos los casos se compararon con un tratamiento control conformado por Medio de Cultivo Agar Czapek Dox. Una vez obtenidos los resultados se observó altos valores de Proteína Cruda, Cenizas y varios minerales, además se encontró de forma general alta respuesta de crecimiento ante el incremento de harina de cáscara de papa, siendo el tratamiento 4 (6 gramos de harina de cáscara de papa) el de mayor resultado, por su parte los diferentes tiempos evaluados mostraron una dinámica de correlación positiva ante los tratamientos en cuestión. Los resultados evidenciaron la potencialidad biológica que tiene la cáscara de papa combinada con harina de maíz y salvado de trigo, para ser usada en la sustitución de algunos medios de cultivos empleados para el crecimiento de hongos filamentosos.

Palabras claves: Fermentación en Medio Sólido, *Aspergillus Oryzae*, Residuos Agroindustriales, Glucosidasa, Xilanasa y Pectinasa.

PRODUCTION OF ENZYMES BY CULTURE IN A SOLID ENVIRONMENT USING AGRICULTURAL BYPRODUCTS.

ABSTRACT

This research was conducted under controlled laboratory conditions; the aim is to produce enzymes with agroindustrial waste through *Aspergillus oryzae* fermentation in solid medium. The strain was provided by the from the University Center for Santic Spiritus, Agricultural Faculty Escambray Mountain, Trinidad, Cuba. For its development a completely randomized design (DCA) was mounted, the physicochemical of each of the raw materials used (Peel potatoes, bran Wheat and Corn Starch), composition previously analyzed were mixed to form fermentation media and inoculated thereon a hoe spores of the fungus in question leaving 148 hours under ideal growth conditions and evaluated every 24 hours expansion thereof on the Petri dish. In all cases they were compared with a control treatment consisting of Agar Culture Medium Czapek Dox. Once the results are obtained high values of crude protein, ash and various minerals was observed also it found generally high growth response to rising flour potato peel, with treatment 4 (6 grams of shell flour Pope) the highest result, meanwhile evaluated different times showed a positive correlation dynamics to the treatments in question. The results showed biological potential that potato combined peel with cornmeal and wheat bran, for use in replacing some culture media used for the growth of filamentous fungi.

Keywords: Fermentation in Medium Solid, *Aspergillus Oryzae*, Agroindustrial Residues, Glucosidasa, Xilanasa and Pectinasa.

1. INTRODUCCION

Las enzimas son proteínas especializadas capaces de acelerar la velocidad de una reacción química, promoviendo así la transformación de diferentes moléculas en productos específicos (Castillo y Rodríguez, 2014). Hace un siglo, los científicos descubrieron que las enzimas eran proteínas y comenzaron a entender cómo funcionaban; sin embargo, hace cientos o miles de años tenemos contacto con ellas y las aprovechamos en nuestro beneficio (Ramírez y Ayala, 2014).

Peña y Quirasco (2014) señalan que las proteínas se clasifican de acuerdo con las reacciones que catalizan en: oxidoreductasas (aceleran reacciones de óxido-reducción), transferasas (transfieren grupos químicos entre moléculas), hidrolasas (rompen o sintetizan enlaces covalentes de las moléculas), liasas (rompen enlaces formando a su vez dobles ligaduras), isomerasas (catalizan un rearrreglo espacial de grupos químicos en la molécula sin modificar su composición química) y ligasas (promueven unión covalente de dos moléculas acopladas con la ruptura de un enlace pirofosfato como fuente de energía).

Fermentación en medio sólido (FMS) se define como el crecimiento de microbios sin fase acuosa de flujo libre (Rodríguez y col 2011). El concepto de la utilización de sustratos sólidos es probablemente el método más antiguo utilizado por el hombre para hacer que los microorganismos trabajen para él (Hesseltine, 1977). Carrillo (2003) define crecimiento microbiano como el incremento ordenado de todos los componentes de la célula viva del microorganismo, arribando a la duplicación de todas las estructuras, orgánulos y componentes celulares, así como la biogénesis de mitocondrias y cromoplastos cuando ciertos microorganismos se ven súbitamente expuestos a las condiciones en que dichos orgánulos son esenciales.

Liang y col. (2009) mencionan que el *A. oryzae* es un hongo filamentoso, que tiene una capacidad de secretar grandes cantidades de enzimas hidrolíticas. Es ampliamente utilizado en la fabricación de salsa de soja fermentada tradicional en Asia.

Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue obtener enzimas de interés alimenticio a través del uso de la fermentación en medio sólido, con uso de microorganismo en particular el hongo *A. oryzae*.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo general

Producir enzimas con residuos industriales a través de *Aspergillus oryzae* por fermentación en medio sólido para su aplicación en alimentos.

1.1.2 Objetivo específico:

➤ **Etapa 1**

- Caracterización de los residuos industriales mediante un análisis proximal

➤ **Etapa 2**

- Determinar la velocidad de crecimiento del hongo *Aspergillus oryzae* para crecer en los diferentes sustratos (harina de maíz, salvado de trigo y cascara de papa).

➤ **Etapa 3**

- Producir enzimas de Xilanasa, β -glucosidasa y Pectinaza en cultivo de FMS.

1.2 JUSTIFICACIÓN

El creciente tema de aprovechamiento de los desechos de la industria alimentaria, aunado a la conservación del medio ambiente y reutilización de los mismos, para la generación de nuevos empleos en el área de alimentos, obtener un medio de cultivo y enzimas a bajo costo comercial, que sea amigable con el medio ambiente.

En este sentido de la implementación de tecnologías de alto impacto y de bajo costo como la fermentación en medio sólido (FMS) dentro del escenario de la búsqueda de alternativas alimenticias; se tiene como meta principal la rentabilidad de las pequeñas y medianas producciones del país, contribuyendo a la sostenibilidad de los sistemas de alimentación.

Esta tecnología nos permite aprovechar los desechos de la industria alimentaria, como materia prima que es sometida a un proceso biotecnológico sencillo se convierte en una fuente alimenticia con altísimo valor energético y proteico, a muy bajo costo. Esto incide directamente en la productividad, la economía y la protección del medio ambiente, mejorando los niveles de competitividad de las producciones a nivel nacional.

1.3 HIPOTESIS

Es posible la producción de enzimas con aplicación en la alimentación humana, con los residuos de la industria alimentaria en la fermentación de medio sólido (FMS) con el hongo *Aspergillus oryzae*.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Enzimas

Las enzimas son proteínas especializadas capaces de acelerar la velocidad de una reacción química, promoviendo así la transformación de diferentes moléculas en productos específicos (Castillo y Rodríguez, 2014), pueden estar relacionadas directamente con las reacciones metabólicas de las células que constituyen un alimento. Todas las células, incluyendo microorganismos y organismos superiores, producen enzimas (Badui, 2006).

Hace un siglo, los científicos descubrieron que las enzimas eran proteínas y comenzaron a entender cómo funcionaban; sin embargo, hace cientos o miles de años tenemos contacto con ellas y las aprovechamos en nuestro beneficio (Ramírez y Ayala, 2014), en la antigüedad, diversos pueblos utilizaban las hojas de ciertas plantas para envolver carne, lo que facilita la acción de proteasas vegetales (papaína, bromelina y ficina) sobre las proteínas del tejido animal, provocando su ablandamiento. Así mismo, algunos grupos humanos utilizaban el estómago de corderos y becerros como recipiente, causando accidentalmente la coagulación de la leche con enzimas asociadas a este órgano. Ahora se sabe que la acción de las proteasas presentes en el estómago (principalmente quimosina) sobre las caseínas provoca su coagulación, proceso que es indispensable en la elaboración del queso (Badui, 2006).

Castillo y Rodríguez (2014) afirman que en la actualidad, el uso de enzimas a escala industrial es una realidad, considerando la velocidad del avance científico y tecnológico en el área de la biotecnología, es de esperarse que el número de procesos biocatalíticos se incremente de manera acelerada en las próximas décadas. Aparentemente, el gran obstáculo que representa la aceptación por la sociedad de cualquier nueva tecnología está superado en el caso de las enzimas

2.2 Principales usos de las enzimas

Castillo y Rodríguez (2014) mencionan que las enzimas se han utilizado desde hace varios siglos en industrias como la cervecera, láctea, de panificación o

peletera, es indiscutible el interés que ha despertado durante las últimas décadas el uso de estos exquisitos catalizadores en diferentes procesos industriales.

Peña y Quirasco (2014) señalan que las proteínas se clasifican de acuerdo con las reacciones que catalizan en: oxidoreductasas (aceleran reacciones de óxido-reducción), transferasas (transfieren grupos químicos entre moléculas), hidrolasas (rompen o sintetizan enlaces covalentes de las moléculas), liasas (rompen enlaces formando a su vez dobles ligaduras), isomerasas (catalizan un rearrreglo espacial de grupos químicos en la molécula sin modificar su composición química) y ligasas (promueven unión covalente de dos moléculas acopladas con la ruptura de un enlace pirofosfato como fuente de energía).

Los seis grupos de enzimas corresponden a reacciones en el metabolismo celular aunque no todas tienen la misma importancia para la industria, el procesamiento o el deterioro de alimentos. En la tabla 1 se enlistan algunos ejemplos que ilustran la clasificación (Badui, 2013).

Tabla 1. Clasificación de algunas enzimas de interés en alimentos.

Grupo	Nombre común	Sustrato
Oxidorreductasas	Glucosa oxidasa	D-glucosa y oxígeno
	Catecol oxidasa	Catecol y oxígeno
	Catalasa	Peróxido de hidrógeno
	Lipoxigenasa	Ácidos grasos poliinsaturados
Transferasas	Amilosacarasa	Sacarosa
	Dextrasacarasa	Sacarosa
	Levansacarasa	Sacarosa
	Ciclomaltodextrina	
	Glucosiltransferasa	Almidón
Hidrolasa	Lipasa	Acilgliseridos
	Pectinesterasa	Pectina esterificada
	α -amilasa	Almidón
	β -amilasa	Almidón
	Amiloglucosidasa	Glucopolisacáridos con enlaces α 1-4 o α 1-6
	Endoglucanasa (celulasa)	Celulosa
	β -glucanasa	Glucanos con enlaces β 1-4 o β 1-3
	Poligalacturonasa	Péctanos
	Invertasa	Sacarosa
	Pululanasa	Glucopolisacáridos con enlaces α 1-6
	Subtilisina	Proteínas
	Papaína	Proteínas
	Bromelina	Proteínas
Renina	Caseína	
Liasas	Pectato liasa	Pectatos
	Pectina liasa	Pectina esferificadas
Isomerasas	Glucosa (xilosa) isomerasa	Glucosa (xilosa)

Fuente: Badui, 2013

2.2.1 Xilanasas

La xilanasas es el nombre genérico para una familia de enzimas que catalizan la ruptura de los enlaces xilosídicos internos de la molécula de heteroxilano (xilano), un tipo de polisacárido constituyente mayoritario de la hemicelulosa, componente importante de la biomasa de la pared celular en vegetales (Fang y col., 2008; Anthony y col., 2003). También son enzimas que degradan polisacáridos no amiláceos, los cuales incluyen xilanos, glucanos, pentanos y arabinoxilanos (Cowieson y Bedford, 2009). Las xilanasas son producidas por una gran cantidad de organismos como bacterias, algas, hongos, protozoos, gasterópodos y artrópodos. De estos, los microorganismos más utilizados a nivel industrial para producir xilanasas son las bacterias, los hongos mesófilos y termófilos (Beg y col., 2001; Howard y col., 2003; Polizeli y col., 2005).

La mayoría de los microorganismos xilanolíticos pueden tener varios genes capaces de codificar la producción de diferentes tipos de xilanasas que difieren en cuanto a la especificidad del sustrato, secuencia y estructura (Wong y col., 1988). Las xilanasas pueden ser producidas por hongos filamentosos, levaduras, algas marinas y algunas bacterias, entre otros. Entre las fuentes microbianas los hongos filamentosos son especialmente interesantes, ya que secretan estas enzimas en el medio y sus niveles de xilanasas son más elevados que los que se encuentran en las levaduras y las bacterias (Polizeli y col., 2005). Debido a la complejidad y heterogeneidad de las xilanasas, existe una limitación al clasificar estas enzimas por solo la especificidad del sustrato. En un principio, las xilanasas se clasificaban en dos grupos según sus propiedades químicas: (i) masa molecular baja, menor a 30 kDa, y pI básico, y (ii) peso molecular alto, mayor a 30 kDa, y pI ácido. Sin embargo, muchas xilanasas, en particular de hongos, no pueden ser clasificadas por este sistema por lo que posteriormente se creó otra clasificación siendo agrupadas colectivamente como glucan-hidrolasas (EC 3.2.1) (Butt y col., 2008).

Los productos comerciales preparados a base de celulasas y xilanasas que están disponibles en el mercado han sido obtenidos de hongos y bacterias de los

géneros *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Humicola* y *Bacillus* (Bhat, 2001; Ovando y Waliszewski, 2005; Polizeliy col., 2005).

2.2.3 Pectinasa

Las pectinasas son un grupo de enzimas de diversos tipos encargadas de degradar a la pectina hasta sus compuestos monoméricos elementales. Las actividades enzimáticas que actúan sobre la cadena principal de la pectina comprenden a las hidrolasas, que actúan sobre los enlaces α -1,4-glicosídicos. Dado su modo de acción estas pueden ser del tipo endo, si actúan de manera aleatoria a lo largo de la cadena principal, o exo, si actúan sobre los finales no reductores de los oligogalacturónidos (Kashyap y col., 2001; Niture, 2008).

La pectina es uno de los heteropolisacáridos más complejos de los que conforman a la pared celular de las plantas. La estructura de la pectina está constituida por dos grandes regiones: homogalacturonano y ramnogalacturonano. La región del homogalacturonano es la de estructura más sencilla. Su cadena lineal está constituida por unidades de ácido D-galacturónico, unidas entre sí por enlaces α , 1-4. A lo largo de dicha cadena se encuentran grupos acetilo (en los grupos hidroxilo de los carbonos 2 y 3) o metilo (en el carbono 6), así como algunos iones de sodio, potasio o amonio (Jayani y col., 2005).

Las pectinasas pueden tener distintas funciones, en dependencia del organismo que las produce. Así, mientras que en los hongos saprófitos (organismo que obtiene su alimento a partir de la materia orgánica de otros organismos, muertos o en descomposición), como *A. niger*, estas enzimas son importantes para proveer al microorganismo los nutrientes a partir de los materiales de su medio ambiente, en el caso de los microorganismos fitopatógenos, como *A. flavus*, intervienen en la degradación de la pared celular durante el proceso de invasión microbiana a las células vegetales (Parenicová, 2000).

La pectina forma parte de la pared celular primaria, y su función es estabilizar a las microfibrillas de celulosa, así como a otros polímeros y proteínas (Annis & Goodwin, 1997). La complejidad estructural de la pectina puede limitar el

rendimiento de diversos procesos industriales que emplean como materia prima elementos ricos en este polisacárido (Kashyap, y col., 2001; Hoondal y col., 2002; Jayani y col., 2005; Hadj-Taieb y col., 2006).

Por otro lado, en la naturaleza este tipo de materiales son los sustratos de los microorganismos saprófitos (organismo que obtiene su alimento a partir de la materia orgánica de otros organismos, muertos o en descomposición), debido a la capacidad de estos para producir pectinasas. Así, las enzimas pectinolíticas producidas de manera natural por los microorganismos saprófitos se han utilizado para incrementar los rendimientos de algunos procesos industriales, como sucede en la elaboración de jugos y alimentos de diversos tipos (Ortega y col., 2004; Rodríguez-Nogales y col., 2008);

La producción de azúcares fermentables a partir de los subproductos de las industrias productoras de azúcar y almidón (Kashyap y col., 2001; Mathew y Abraham, 2005) y los procesos de fabricación del papel (Kashyap y col., 2001, Hoondal y col., 2002; Chand y Mishra, 2003).

2.2.3 Glucosidasas

La degradación de la celulosa por los organismos vivos tiene lugar mediante la acción de tres tipos de enzimas: I) endoglucanasa (endo-1,4- β -glucanasa; Eg; EC 3.2.1.4); II) exoglucanasa o celobiohidrolasa (exo-1,4- β -glucanasa; Cbh; EC 3.2.1.91) y III) β glucosidasa (β -1,4-glucosidasa; EC 3.2.1.21) (Coutinho & Henrissat, 1999).

Las endoglucanasas cortan de manera aleatoria en sitios internos amorfos de la cadena del polisacárido celulosa, generando oligosacáridos de varios índices de polimerización y consecuentemente nuevos extremos de cadenas. Las exoglucanasas actúan de manera progresiva sobre el extremo reductor o no reductor del polisacárido de celulosa, liberando glucosa (glucanohidrolasas) o celobiosa (celobiohidrolasas) como productos más abundantes. Estas enzimas también pueden actuar sobre celulosa microcristalina, presuntamente liberando cadenas de celulosa de la estructura cristalina. Las enzimas β glucosidasa hidrolizan los dímeros solubles de celobiosa a glucosa. Las celulasas se

diferencian de otras glucosil hidrolasas por la habilidad de hidrolizar los enlaces β -1,4-glucosídicos entre los residuos glucosídicos. La acción enzimática consiste en romper el enlace vía un mecanismo de hidrólisis ácida, usando un aminoácido dador de protones y un aceptor, nucleófilo o base (Cantarel, 2008).

La β -glucosidasa es la actividad que completa el sistema celulasa. No se puede considerar una celulasa propiamente dicha, aunque su papel es esencial para hidrolizar la celobiosa, que es un fuerte inhibidor de la exoglucanasa (Berghem y Col., 1975).

Uno de los componentes más importante del sistema enzimático celulolítico es la enzima endo1, 4- β glucanasa, la cual hidroliza al interior de las cadenas de celulosa aleatoriamente. Esta enzima se encuentra en todos los organismos celulolíticos desde bacterias hasta hongos (Aro y Col. 2005).

Las glucohidrolasas β -D-glucósido (E.C. 3.2.1.21), más conocidas como β -glucosidasas, pertenecen a la familia de las β -glucanasas, y son responsables del catabolismo de una amplia gama de hidratos de carbono; pueden ser endo o exoglucanasas, cuya diferencia es el punto por el que inician la hidrólisis del polisacárido (Schomburg y Schomburg 2003).

Las β -glucosidasas se han aislado de distintas fuentes. En humanos, se han identificado hasta tres β -glucosidasas nativas (Hays et al., 1996). Dos de ellas formando parte de las membranas biológicas y con alta especificidad de sustrato, mientras que la tercera se localiza en el citosol de las células hepáticas y en el intestino de los mamíferos (Mellor y Layne 1971, Daniels y col., 1981).

2.3 SISTEMAS DE PRODUCCIÓN ENZIMÁTICA

2.3.1 Fermentación en medio sólido (FMS)

La fermentación en medio sólido (FMS) es una técnica conocida desde hace siglos y se define como el proceso fermentativo en el cual el microorganismo crece sobre una matriz sólida en escasez o ausencia de agua libre (Blandino y col., 2005; Krishna, 2005). El sustrato debe contener sólo la humedad suficiente

para favorecer el crecimiento y la actividad metabólica del microorganismo (De Ory y col., 2007).

Moo-Young y col. (1980 y 1983), definen a la FMS como un proceso en donde la humedad presente se encuentra retenida de forma compleja dentro de la matriz sólida. Posteriormente se incluyeron a todos los procesos que utilizan materiales insolubles en agua para el crecimiento de microorganismos en ausencia de agua libre, al igual que Mitchell y col. (1999).

Duran y col. (1996), describen a la FMS como un método de cultivo de microorganismos sobre y/o dentro de partículas sólidas. El líquido ligado a las partículas debe ser en una cantidad que asegure la actividad de agua adecuada para el crecimiento y el metabolismo de los microorganismos, pero sin exceder el máximo poder de retención de agua de matriz sólida.

Viniegra (1997), define a la FMS como un proceso microbiológico que ocurre comúnmente en la superficie de materiales sólidos que tienen la propiedad de absorber y contener agua, con o sin nutrientes solubles, haciendo énfasis en que esta definición abarca a procesos donde el soporte sólido es inerte y los sustratos que utilizan los microorganismos pueden ser sustancias solubles en agua.

Pandey (2003) menciona que la fermentación en medio sólido se ha convertido en una tecnología potencial para la producción de productos microbianos tales como alimentos, combustible, productos químicos industriales y productos farmacéuticos.

En la actualidad la fermentación en medio sólido (FMS) se usa con gran éxito en la producción de antibióticos, micotoxinas, surfactantes, ácidos orgánicos, compuestos aromáticos, pesticidas y enzimas, entre otros (Blandino y col., 2005; De Ory y col., 2007).

En los últimos años, FMS se ha considerado como un proceso con un gran potencial, en el desarrollo de bioprocesos y de productos de alto valor agregado. Algunas de sus aplicaciones incluyen: en la transformación biológica y la biodegradación de compuestos contaminantes, la detoxificación de residuos

agroindustriales, la producción de micotoxinas, biopulpeo, antibióticos, giberelinas, biopesticidas, ácidos orgánicos, saborizantes, enzimas, etc. (Flores y col, 2011).

Cabe destacar que FMS sirve para la producción de enzimas, metabolitos y esporas, ya que existen diferentes sustratos sólidos (residuos agrícolas) se han combinado con muchos hongos diferentes y la productividad de cada fermentación informado (Hölker y Col., 2004).

2.3.1.1 Ventajas y desventajas de la fermentación en medio sólido (FMS)

Doelle y col., (1992) consideran como ventajas los siguientes aspectos:

- Los medios de cultivo son simples, generalmente subproductos agrícolas que presentan un alto contenido de los nutrientes necesarios.
- La baja actividad del agua es de gran ayuda para evitar las contaminaciones, especialmente de bacterias y levaduras.
- La concentración natural del sustrato permite utilizar reactores más pequeños en comparación con los utilizados en otro tipo de fermentación. Tienen mayor productividad volumétrica.
- La aireación forzada es facilitada por la porosidad del soporte, lo que permite una alta transferencia de oxígeno al microorganismo.
- Pueden emplearse, frecuentemente conidios como inóculo en los procesos de crecimiento de hongos, lo cual disminuye los costos y las manipulaciones en la preparación del inóculo.
- Los conidios de los hongos que se producen son mucho más resistentes y tienen mejor adaptabilidad a las condiciones en las que se aplican como agente de biocontrol.
- El proceso de recobrado es simplificado. Algunos productos son utilizados integralmente, como alimento animal, productos para el control biológico, etc.
- Los procesos se consideran generalmente como tecnologías limpias.

Entre las principales desventajas se encuentran:

- Su aplicación se limita a microorganismos que crecen en bajos contenidos de humedad.
- La extracción del calor metabólico puede ser un problema, sobre todo cuando se trabaja a gran escala y no se controla el proceso.
- La naturaleza sólida del sustrato trae problemas al medir los parámetros de la fermentación tales como el pH, la temperatura, el contenido de humedad y la concentración de sustrato y productos.
- Los procesos de transferencia de masa son limitados por la difusión.
- Muchos aspectos ingenieriles como el diseño de reactores y el escalado están muy poco caracterizados.
- El tiempo de fermentación es mayor debido a que generalmente se utilizan microorganismos que presentan bajas velocidades específicas de crecimiento.

2.3.1.2 Factores que determinan la fermentación en medio sólido (FMS).

2.3.1.2.1 pH

En los medios de cultivos donde la fermentación se realiza en medio sólido (FMS) el pH es una variable que afecta el desarrollo de los procesos de fermentativos, al igual que lo hace en los cultivos sumergidos. Sin embargo, en el caso de la fermentación sólida, su control es prácticamente imposible, debido a la ausencia de instrumentos capaces de medir el pH en la capa de líquido que rodea el sólido (Mitchell y col., 2002). Por otra parte, el mezclado de sólidos es un proceso complejo por lo cual se dificulta también el control de esta variable durante el desarrollo de la fermentación.

El pH cambia por diferentes razones; normalmente disminuye por la secreción de ácidos orgánicos como acéticos y lácticos durante el proceso. No obstante, la fuente de nitrógeno utilizada influye mucho en la tendencia que sigue el pH (Domenech, 2000).

2.3.1.2.2 Temperatura

El crecimiento y la formación de productos son resultados de complejas reacciones químicas y al igual que cualquier otra reacción, están afectados por la temperatura, la que ejerce una acción determinante en el conjunto de actividades celulares. La temperatura es la variable cuyo control, en una fermentación sólida, se considera el más crítico debido a la alta concentración de sustrato por unidad de volumen y a la baja conductividad térmica del sistema heterogéneo sólido - líquido - gas, lo que favorece la acumulación del calor metabólico en el sistema y un aumento de la temperatura del cultivo. En la fermentación de Tempeh, por ejemplo, se midieron gradientes de temperatura de 30°C por cm (Bernard y col., 1992).

El aumento de la temperatura favorece tres aspectos negativos:

- La actividad microbiana se desacelera o se detiene.
- Se deshidrata el medio sólido.
- El metabolismo se desvía como un mecanismo de defensa ante el calor o ante la deshidratación (Gutiérrez y col., 1995).

El control de la temperatura se ha tratado a través de métodos convencionales de extracción de calor y de métodos no convencionales. Los métodos convencionales incluyen el intercambio de calor por los mecanismos de conducción y convección forzada. Se demostró que los primeros no son tan efectivos como los segundos (Saucedo - Castañeda y col., 1990). Los métodos de extracción de calor por convección, para ser efectivos, requieren de elevadas tasas de aireación que con frecuencia deshidratan al medio. Los métodos no convencionales se refieren a la utilización del calor latente de vaporización del agua para eliminar el calor metabólico de manera rápida y efectiva (Sargantanis y col., 1993).

Sobre esto se han pronunciado diferentes autores, pues plantean que el control de temperatura es uno de los problemas que se ha detectado desde siempre en las FMS y que, a la fecha, no tiene una solución clara. En función de las

condiciones de cultivo, se han reportado diversos gradientes de temperatura dentro del lecho de fermentación: $30^{\circ}\text{C cm}^{-1}$ (Rathbun y Schuler, 1983); $2.5^{\circ}\text{C cm}^{-1}$ (Raimbault, 1980); $4\text{-}5^{\circ}\text{C cm}^{-1}$ (Saucedo-Castañeda y col., 1990; González-Blanco y col., 1990). Poco se conoce sobre la magnitud del calor metabólico generado en las FMS. En la mayoría de los casos se concretan a un valor constante. Rathbun y Schuler (1983) proponen que se producen hasta 15.9 J kg^{-1} de materia seca, mientras que la velocidad de generación de calor es del orden de $3.3 \times 10^5 \text{ J h}^{-1} \text{ kg}^{-1}$ de materia seca.

Raimbault (1980) menciona que esto puede provocar un sobrecalentamiento en la masa del cultivo, que influye negativamente sobre la actividad microbiana. Resulta también claro que los sistemas de control de las FMS deberán tomar en cuenta, simultáneamente, la humedad del medio, la humedad relativa del aire y la temperatura. También el tipo de reactor utilizado (con o sin agitación) juega un papel fundamental en la eficiencia del control de la temperatura.

2.4 MICROORGANISMO

2.4.1 Crecimiento microbiano

Carrillo (2003) define crecimiento microbiano como el incremento ordenado de todos los componentes de la célula viva del microorganismo, arribando a la duplicación de todas las estructuras, orgánulos y componentes celulares, así como la biogénesis de mitocondrias y cromoplastos cuando ciertos microorganismos se ven súbitamente expuestos a las condiciones en que dichos orgánulos son esenciales. Esta misma autora plantea que en la mayoría de los organismos unicelulares, la reproducción es consecuencia del crecimiento y lleva al incremento en el número de individuos de la población, mientras que en los pluricelulares el crecimiento conduce al aumento del tamaño del organismo.

2.4.2 *Aspergillus oryzae*

Liang y col. (2009) mencionan que es un hongo filamentososo, que tiene una capacidad de secretar grandes cantidades de enzimas hidrolíticas. Es ampliamente utilizado en la fabricación de salsa de soja fermentada tradicional en Asia.



Figura 1. *Aspergillus oryzae*

Un aspecto común asociado con el suministro de *A. oryzae* es el incremento de determinadas poblaciones del rumen. Tras la adición de este aditivo se observaron incrementos entre un 14 y 90% de las bacterias viables totales (Wiedmeier y col., 1987).

Varios autores encontraron que la inclusión de *A. oryzae* implica un incremento de bacterias celulolíticas (Wiedmeier y col., 1987, Beharka y Nagaraja, 1991, Newbold y col., 1991 y Yoon y Stern., 1996) lo que resulta en un cambio de los patrones de fermentación ruminal, y consecuentemente en una mayor digestión de la fibra (Gómez-Alarcón y col., 1991 y Bertrand y Grime, 1997). En estudios con cultivos puros de bacterias ruminales se demostró que la adición de *A. oryzae* aumenta la tasa de crecimiento de tres de las principales especies celulolíticas, las bacterias *Ruminococcus albus* y *Fibrobacter succinogenes* (Beharka y Nagaraja 1998) y el hongo predominante en el rumen, *Neocallimastix frontales* (Welch y col., 1996).

2.5 Salvado de trigo

Según Vargas y Murrillo (1978) el salvado de trigo es la tercera fracción por tamaño de la molienda del trigo. Un 40% de las partículas constitutivas son retenidas por mallas de 1.0 mm o mayores y otro porcentaje similar es de menor tamaño que mallas de 0.7mm y el salvado de trigo está constituido por las partículas de mayor tamaño resultantes del procesamiento industrial del trigo. Donde un 47% de las partículas son mayores a los 1.1 mm mientras que solamente un 32% son de tamaño menor a los 0.7 mm.



Figura 2. Salvado de Trigo

En la Tabla 2 se muestra un análisis químico correspondiente a subproductos de trigo. Donde se aprecia el contenido promedio de proteína total, siendo de 16.31 y 16.48% para el salvadillo y salvado, respectivamente. El salvado presentó cantidades de fibra relativamente altas (10.26%) en contraste con el salvadillo (7.77%).

Tabla 2. Análisis físico químico de salvado de trigo

Composición (%)	Salvadillo	Salvado
Humedad	13.14±0.79	13.07±1.18
Proteína *	16.31 ± 2.78	16.48 ±1.46
Grasa	4.09 ±1.09	5.15 ±1.85
Fibra cruda	7.77 ±1.01	10.26 ±1.72
Extracto libre de N.	52.46±3.83	50.56± 4.62
Ceniza	4.87±0.79	5.41± 1.04
Calcio mg/100	696±81	668±15
Fósforo mg/100	234±4	193±18
Magnesio g/100	538±34	674±36
Potasio mg/100	1574±290	1505± 86
Hierro µ.g/	354±50	150 ± 3
Cobre µ.g/	16± 1	16 ± 2
Zinc µ/g	70±2	68+-2
Manganeso µ.g	138± 14	132 ±7

Fuente: Vargas y Murrillo (1978)

* El valor de proteína, fue obtenido de la multiplicación del valor obtenido de nitrógeno multiplicado por el factor 6.25

2.6 Harina de maíz

El maíz es uno de los cereales más importantes a nivel nacional. La aplicación más evidente del maíz en México es en la elaboración de tortilla, un producto de gran importancia ya que representa la base principal de alimentación de los mexicanos (Arámbula y col 2001).



Figura 3. Fécula o Harina de Maíz

Trabajos de Gohl (1982) plantean que el maíz constituye, junto con el arroz y el trigo, uno de los principales alimentos cultivados en el mundo. Su uso no solo se centra en la alimentación humana sino que forma parte de la alimentación animal por sí mismo o constituyendo un ingrediente muy importante en la composición de piensos para cerdos, aves, y vacas. Los tallos de maíz, una vez separada la mazorca, se pueden utilizar como forraje. En la Tabla 3, se muestra un análisis físico-químico correspondiente a algunas de sus potencialidades proteicas y contenido mineralógico

Tabla 3. Análisis físico-químico de diferentes fuentes de maíz usado en la alimentación animal.

Composición (%)	Maíz en grano, Israel	Maíz híbrido en grano	Maíz blanco en grano	Maíz amarillo en grano	Pienso de maíz machacado
Materia seca	87.0	90.8	89.0	87.8	88.0
Proteína cruda	11.0	10.2	10.6	12.1	10.9
Fibra cruda	4.6	1.7	1.9	1.4	10.2
Ceniza	2.0	1.5	1.3	1.4	3.4
Estrato etéreo	5.5	5.2	4.8	5.5	4.8
Calcio	0.01	-	0.02	0.02	0.03
Fosforo	0.32	-	0.33	0.33	0.27

Fuente: Gohl (1982)

2.7 Cáscara de papa

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es el cuarto cultivo alimenticio de mayor importancia a nivel mundial, presente en la dieta de muchas culturas, rico en carbohidratos, proteínas, minerales y vitaminas, y por los beneficios en la salud humana que esta especie proporciona, ya que algunos de sus constituyentes poseen ciertas propiedades antioxidantes (Suttle, 2008).



Figura 4. Cáscara de papa

Las industrias pelan las papas como parte de la producción de papas fritas, chips, puré, etc. (Schieber y Aranda, 2009:25). El desecho obtenido de esta operación varía desde 15 a 40% dependiendo de la técnica de pelado que se utilice. Como por ejemplo, pelado por vapor, abrasión o con lejía (Israilides, y col., 2008).

Existen cada vez más estudios sobre el potencial uso de la cáscara de papa como un aditivo en alimentos debido a su efecto antioxidante. La cáscara de papa tiene alto contenido de compuestos fenólicos, principalmente ácidos fenólicos. Alrededor del 90% de estos compuestos lo constituye el ácido clorogénico, mientras que el ácido caféico, ácido gálico y ácido protocatecuico se encuentran en menor concentración (Mohagheghi y col., 2012)

Prada (2012) menciona que su calidad está influenciada por las condiciones ambientales y el manejo agronómico (temperatura presente durante el crecimiento de la planta, precipitación y/o calidad y cantidad de riego usado, tipo de suelo, fertilización química y orgánica empleada, época y forma de la eliminación del follaje y especialmente la madurez del tubérculo). Dentro de los factores de calidad tenemos, la textura, el color y el sabor. El tubérculo de la papa es un producto con alto contenido de humedad, aprox. 70%-75%, el cual se puede observar en la tabla

4, los carbohidratos de la papa incluyen el almidón, la celulosa, la glucosa, la sacarosa y la pectina, pero específicamente, los almidones de este tubérculo son la amilosa y la amilopectina en la proporción de 1:3.

Tabla 4. Análisis físico químico de la papa

Composición (%)	Otras variedades	Papa criolla
Calorías (100gr)	84.0	83.0
Agua	76.7	75.5
Proteína	1.9	2.5
Grasa	0.1	0.1
Carbohidratos	19.31	18.7
Fibra	1.0	2.2
Cenizas	1.0	1.0
Calcio mg/100 g	4.0	7.0
Fosforo mg/100 g	26	54.0
Hierro mg/100 g	1.1	1.0
Ácido ascórbico mg/100 g	20	15.0

Fuente: Prada (2012).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se llevó a cabo en los laboratorios de Nutrición Animal perteneciente al Departamento de Producción Animal y el laboratorio de alimentos del departamento de ciencia y tecnología de alimentos de la División de Ciencia Animal de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Saltillo, ubicada en la ex hacienda de Buenavista, municipio de Saltillo, Coahuila, a 7 km al sur de esta ciudad, sobre la carretera 54 (Saltillo-Zacatecas). Se localiza entre las coordenadas geográficas 25°22´ de latitud norte y 101°02´ longitud oeste y a una altitud de 1742 msnm. El Clima se caracteriza como muy seco, semicálido, con invierno fresco, extenso, con lluvias en verano y una precipitación invernal superior al 10 % del total anual. La precipitación total anual media va de 350-400 mm. La temperatura media anual es de 19.8 °C.

➤ Etapa 1

3.1 Caracterización físico química de los residuos industriales (cáscara de papa, harina de maíz y salvado de trigo)

3.1.1 Material Vegetal

Se empleó harina de maíz, cáscara de papa y salvado de trigo. Las muestras fueron deshidratadas en una estufa de secado a 60 °C por 48 h, para posteriormente ser molida en un homogenizador industrial y tamizada por la malla No.30 (0.600 mm) para así obtener un polvo fino para los posteriores análisis.

3.1.2 Caracterización físico-química de los residuos industriales (cáscara de papa, harina de maíz y salvado de trigo) mediante un análisis proximal

Se llevó a cabo la caracterización físico-química de los residuos industriales (cáscara de papa, harina de maíz y salvado de trigo), los parámetros determinados fueron:

- Materia seca total
- Humedad

- Cenizas
- Extracto etéreo
- Nitrógeno
- Proteína cruda o bruta
- Fibra cruda
- Extracto libre de nitrógeno (ELN)
- Contenido calórico

Los análisis fueron realizados de acuerdo al manual de técnicas utilizadas por la AOAC (Association of Official Analytical Chemists, 1980), técnicas utilizadas como estándar a nivel internacional. La muestra fue analizada por triplicado.

3.1.2.1 Materia seca total

La remoción parcial de la humedad libre del material permite la conservación del mismo disminuyendo su deterioro o alteraciones químicas. No obstante el material aún conserva cierto nivel de humedad que está ligada a ciertas estructuras y compuestos, la cual debe ser removida para determinar con exactitud el contenido total de agua del material. Para determinar la materia seca total proceda con los siguientes pasos:

1. Se coloca un crisol de porcelana en una estufa de secado a 105 °C por 24 horas por lo menos. Remueva el crisol de porcelana de la estufa, utilizando pinzas de metal, y se coloca en un desecador. Espere 15 minutos para que se enfríe el crisol, con unas pinzas de metal tome el crisol y péselo en una balanza analítica.
2. Se agregan 2.0 g de muestra al crisol y registre el peso de la muestra.
3. Se coloca el crisol en una estufa de secado a 105 °C durante 24 horas.
4. Al final del periodo de secado, remueva el crisol de la estufa y lo coloca en un desecador, con las mismas precauciones indicadas con anterioridad. Déjelo enfriar por 15 minutos.
5. Registre el peso del crisol más la muestra seca.

Para obtener el contenido de materia seca total a 105 °C, utilice la siguiente ecuación:

$$\%MST = \frac{\text{peso de crisol} + \text{muestra seca} - \text{peso de crisol vacío}}{\text{gramos de muestra}} \times 100$$

El contenido de humedad se obtiene por diferencia:

$$\%H = 100 - \%MST$$

Estas muestras secas se conservan en los crisoles para la determinación del contenido de cenizas.



Figura 5. Determinación de materia seca total (MST) y humedad.

3.1.2.2 Cenizas

Los minerales que están presentes en los alimentos, de muy diversas formas, constituyen la materia denominada inorgánica, la cual se obtiene como residuo de la incineración del material o cenizas. Para la determinación de cenizas proceda con los siguientes pasos:

1. El crisol y la muestra seca utilizada para la determinación de materia seca total (MST) se coloca en la mufla, donde se ha preestablecido como temperatura máxima los 600 °C.
2. Cuando la temperatura alcance los 600 °C deje las muestras por espacio de dos horas.

3. Apague la mufla y deje que la temperatura descienda.
4. Con mucho cuidado abra la puerta de la mufla, remueva los crisoles hacia un desecador, utilizando pinzas y guantes de asbesto, para que se enfríen. Esto puede durar cerca de una hora.
5. Pese los crisoles más las cenizas con exactitud en una balanza y realice los cálculos siguientes para obtener el porcentaje de cenizas:

$$\%C = \frac{\text{peso de crisol} + \text{cenizas} - \text{peso de crisol solo}}{\text{gramos de muestra}} \times 100$$

Para ajustar sus datos en base a materia seca total dividir su % cenizas entre su % MST y multiplicar por 100.



Figura 6. Mufla, equipo utilizado para la determinación de cenizas.

3.1.2.3 Extracto etéreo (Método Soxhlet)

El método para la determinación de la fracción de lípidos se basa en la evaporación continua de un solvente orgánico, en muchos casos éter de petróleo o hexano, que luego de condensarse pasa por la muestra extrayendo los materiales solubles. Al utilizar algún tipo de solvente orgánico se espera que los compuestos grasos o lípidos se disuelvan y puedan ser removidos del material. El procedimiento para determinar extracto etéreo utilizando el método Soxhlet es el siguiente:

1. Un matraz bola de fondo plano con capacidad para 250 mL, se coloca en una estufa de secado a 105°C por espacio de dos horas como mínimo. Se deja enfriar en un desecador, se pesa en una balanza y se registra su peso.

2. En el matraz bola de fondo plano se colocan de 100 a 150 mL del solvente orgánico que se va a utilizar (éter de petróleo). Se recomienda no utilizar solventes cuyo punto de ebullición exceda los 85 °C.
3. Se pesan cerca de 4.0 g de muestra en una balanza y se colocan en los dedales de extracción a base de celulosa.
4. Se coloca el dedal con la muestra dentro del sifón. Se conecta el sifón al matraz bola de fondo plano. Encienda las parrillas eléctricas.
5. La muestra permanecerá sifoneando por alrededor de 8 horas.
6. Retirar el dedal y recuperar el solvente.
7. Una vez que no se tengan residuos de éter en el matraz, coloque los matraces con los residuos del extracto etéreo en la estufa de secado por 24 horas.
8. Retírelos y colóquelos en un desecador. Déjelos enfriar, pese y registre el peso del matraz.

Estime el contenido de extracto etéreo de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\%EE = \frac{\text{peso de matraz + grasa} - \text{peso de matraz solo}}{\text{gramos de muestra}} \times 100$$

Para ajustar sus datos en base a materia seca total dividir su % EE entre su % MST y multiplicar por 100.



Figura 7. Equipo utilizado para la determinación de extracto etéreo por el método Soxhlet

3.1.2.4 Nitrógeno y proteína cruda o bruta (Método Kjeldhal)

En muchas partes este análisis es conocido como determinación de proteína cruda, debido a que por conversión, el porcentaje de nitrógeno determinado en el análisis se multiplica por el factor 6.25 para obtener el porcentaje de proteína cruda. Este factor está relacionado con el hecho de que la proteína, en términos generales, contiene un 16 % de nitrógeno, por lo que el factor se obtiene de la relación 100/16. Sin embargo, es conocido que esto no es tan cierto, puesto que se conoce que el porcentaje de nitrógeno en las proteínas varía desde un 15.5 hasta un 18 %, por lo que habría que aplicar un factor diferente para cada tipo de muestra. En el procedimiento conocido como método Kjeldhal, todo el nitrógeno presente en la muestra, exceptuando los nitratos y nitritos, se convierten en amonio que a su vez es liberado del medio de reacción en forma gaseosa y atrapado con un ácido débil para su titulación. El procedimiento para determinar nitrógeno y por consiguiente el porcentaje de proteína cruda o bruta por el método Kjeldhal es el siguiente:

1. En un papel filtro o encerado libre de nitrógeno pese aproximadamente 1.0 g de muestra.
2. Coloque la muestra con el papel dentro del matraz tipo Kjeldhal, evitando que se pierda algo de muestra.
3. Añada con mucho cuidado 30 mL de H_2SO_4 concentrado al matraz y rote levemente el mismo para que humedezca completamente el papel con la muestra.
4. Coloque las perlas de ebullición y la mezcla reactiva de selenio.
5. Encienda el calentador de manera que la solución entre en ebullición. Durante este periodo la mezcla del matraz pasa de un color oscuro hasta quedar completamente clara o ligeramente verdosa, y se dejan de emitir vapores. Terminado el periodo, apague el calentador y deje enfriar los matraces.
6. Agregue lentamente al matraz aproximadamente 300 mL de H_2O destilada tratando de lavar las paredes, y deje enfriar a temperatura ambiente. Asegúrese de que no se le han formado cristales en el balón.

7. Añada al matraz lentamente, sin agitar, aproximadamente 100 mL de NaOH al 40%. No permita que se caliente bruscamente la solución.
8. Coloque el matraz sobre el calentador del sistema de destilación y en el extremo opuesto del sistema de condensación coloque un matraz Erlenmeyer con aproximadamente 50 mL de la solución de ácido bórico al 4 % e indicadores correspondientes, de manera que el extremo del tubo recolector quede inmerso en la solución. Gire el matraz de manera que la solución de NaOH se mezcle completamente con el contenido del matraz. Encienda el calentador y destile.
9. Destile hasta haber recolectado cerca de 250 mL de destilado. La solución debe haber cambiado de un color rojo a verde.
10. Retire el matraz Erlenmeyer y titule el destilado con la solución estandarizada de H₂SO₄ y calcule el porcentaje de nitrógeno en la muestra. Durante la titulación el color cambiará de color verde a un rojizo casi transparente. Registre el volumen utilizado de ácido. Se debe correr un blanco en donde se coloca igual cantidad de reactivos.
11. Al volumen utilizado para titular la muestra se resta el volumen utilizado en el blanco y se calcula el contenido porcentual de nitrógeno en la muestra de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\%N = \frac{0.014 \times [(mL. de H_2SO_4 \text{ de muestra} - mL. de H_2SO_4 \text{ de blanco}) \times N \text{ de } H_2SO_4]}{\text{gramos de muestra}} \times 100$$

Para el cálculo de proteína cruda se multiplica el contenido de nitrógeno por el factor 6.25 o en su defecto el factor que más se adecua al tipo de material analizado, según se indicó con anterioridad.

$$\% \text{ de proteína cruda o bruta (PC o PB)} = \% \text{ de nitrógeno} \times 6.25$$

Para ajustar sus datos en base a materia seca total dividir su % PC entre su % MST y multiplicar por 100.



Figura 8. Equipo Kjeldhal utilizado para la determinación de nitrógeno (por conversión proteína cruda o bruta), se aprecian los 3 procesos que conlleva el método (digestión, destilación y titulación).

3.1.2.5 Fibra cruda

Este análisis corresponde al método proximal o de Weende. Se basa en la digestión de la muestra en soluciones ácidas y básicas, donde el peso perdido de la muestra luego de la incineración del residuo se considera la fibra cruda. La muestra a utilizar debe ser una muestra libre o con muy poco contenido de lípidos por lo que la muestra que se utiliza para esta determinación es la que proviene de la determinación de extracto etéreo. Los pasos para la determinación de este parámetro son los siguientes:

1. Pese 2.0 g de muestra desengrasada, colóquela en el vaso de Berzelius, registre el peso de la muestra.
2. Agregue 100 mL de ácido sulfúrico 0.255 N. Abra la llave del digestor, encienda la parrilla y coloque el vaso. A partir de que la muestra empiece a hervir se toma el tiempo de 30 minutos.
3. Caliente agua destilada, coloque el filtro sobre el embudo filtre su muestra y lave con agua caliente.
4. Por medio de una espátula vacíe su muestra en el vaso, agregue 100 mL de hidróxido de sodio 0.313 N a partir de que empiece a hervir tome el tiempo de 30 minutos.

5. Retire su muestra, fíltrela y lave con agua caliente, con las pinzas saque un crisol de la estufa, por medio de una espátula retire la muestra y colóquela en el crisol. Deje el crisol en la estufa durante 24 horas
6. Saque el crisol de la estufa con las pinzas, colóquelo en el desecador enfrié por alrededor de 15 min. y pese.
7. Coloque su crisol en la mufla durante 2 horas, enfrié en el desecador durante 30 minutos y pese.

Determine el porcentaje de fibra cruda de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\%FC = \frac{\text{peso del crisol + muestra seca} - \text{peso del crisol + cenizas}}{\text{gramos de muestra}} \times 100$$

Para ajustar sus datos en base a materia seca total dividir su % FC entre su % MST y multiplicar por 100.



Figura 9. Equipo Labconco para la determinación de fibra cruda.

3.1.2.6 Extracto libre de nitrógeno (ELN)

En realidad no se determina por análisis en el laboratorio, sino que se calcula por diferencia. El extracto libre de nitrógeno (ELN) corresponde a los azúcares, almidón y gran parte del material clasificado como hemicelulosa. Se obtiene sumando los porcentajes de cenizas, grasas, proteínas y fibra cruda y se resta de 100 partes de muestra analizada. Es necesario para realizar el cálculo total de nutrientes digestibles (TND). La ecuación es la siguiente:

$$\text{ELN} = 100 - (\% \text{cenizas} + \% \text{extracto etereo} + \% \text{proteína cruda} + \% \text{fibra cruda})$$

3.1.3 Determinación de minerales (Método húmedo por absorción atómica; Fick y col., 1976)

La determinación de los niveles de nutrientes inorgánicos de los alimentos tiene dos objetivos, el primero consiste en obtener minerales de forma concentrada, separados de cuanta fuente de interferencia sea posible, lo que se consigue destruyendo la materia orgánica del alimento por oxidación húmeda o incineración seca, obteniendo los elementos a medir en forma más fácilmente manipulable para su determinación. El segundo objetivo es la determinación de los elementos individuales, lo cual se puede realizar por varias técnicas. En el presente trabajo se analizarán 8 minerales: los microelementos (Cu,Zn,Mn,Fe) y macroelementos (Na,K,Ca,Mg) de los residuos industriales (cáscara de papa, harina de maíz y salvado de trigo), utilizando la espectrofotometría por absorción atómica, el tratamiento de la muestra para llevar dicha determinación fue la siguiente:

1. Se coloca 1.0 g de muestra en un vaso de precipitado de 100 mL.
2. Posteriormente se le adicionan 40 mL de la mezcla digestora ($\text{HNO}_3:\text{HClO}_4$ en una concentración 3:1 v/v), se coloca un vidrio de reloj como tapa al vaso de precipitado.
3. Se lleva el vaso de precipitado a una plancha de calentamiento dentro de una campana de extracción, ahí se mantiene hasta observar el cambio de color oscuro a cristalino, procurando que la mezcla digestora no baje de un volumen de 20 mL (en el caso de que no se haya realizado la digestión:cambio de coloración).
4. Digerida la muestra se deja enfriar y al volumen resultante se le añade un volumen doble de agua desionizada para neutralizar la muestra, posteriormente se filtra (papel filtro Whatman No.41 sin cenizas), el filtrado se recibe en un matraz de aforación de 100 mL y se afora con agua desionizada.
5. Se lleva a cabo la lectura en el espectrofotómetro de absorción atómica, previamente calibrado, con los estándares para cada mineral.

➤ **Etapa 2**

3.2 Obtención del inóculo, condiciones de crecimiento e inoculación

Para la obtención del inóculo en cuestión se partió de un cultivo de *A. oryzae* cepa H/6.28.1, perteneciente a la colección del Centro Universitario de Santic Spiritus, Facultad Agropecuaria de Montaña del Escambray, Trinidad, Cuba. El cultivo creció en Medio de Agar Czapek- Dox, haciéndole varios pases de la cepa sobre el mismo medio para alcanzar el crecimiento deseado.

Antes de inocular la cepa sobre los medios de fermentación, se llevaron estos últimos a la humedad requerida según manual OXOID, en este caso se partió de la materia seca presente en cada uno de los tratamientos y se calculó la cantidad de agua necesaria para alcanzar el 70% de humedad que es el óptimo para esta cepa microbiana.

Una vez obtenido el inóculo y teniendo las condiciones óptimas de humedad en los medios se procedió a la siembra de cada uno de los tratamientos antes señalados, la técnica se realizó mediante el uso de azadilla de siembra y un mechero de alcohol y en cada caso solo se tomó una azada del inóculo y se trasladó al medio de fermentación.

Luego se llevaron a una estufa incubadora donde se mantuvo a 30 °C por 148 horas como condiciones favorables de crecimiento según el Manual OXOID.

3.2.1 Evaluación de la velocidad de crecimiento microbiano

Para evaluar la velocidad de crecimiento microbiano de la cepa sobre las mezclas o sustrato, se partió del criterio de Sáez y col., (2004), el mismo plantea que midiendo la expansión de la colonia sembrada en el centro de la caja de Petri con un pie de rey GAHZ GEHARTET se puede determinar el crecimiento diametral de la cepa sobre el sustrato.

Las evaluaciones se realizaron a intervalos de 24 horas y en dinámica de fermentación, en cada una de los muestreos se determinó el tamaño del diámetro

por la parte más extensa hasta alcanzar el máximo de la caja de Petri o las 148 horas de duración del experimento.

➤ **Etapa 3**

3.3 Determinación de actividad xilanasa (Miller; 1959)

Para evaluar la actividad xilanasa obtenida por la fermentación en medio sólido (anteriormente descrita); se utilizó la técnica de determinación de actividad xilanasa propuesta por Miller (1959) la cual consiste en tomar 0.5 ml del preparado enzimático adecuadamente diluido en buffer citrato 0.05 M pH 4.8, se añadió a 0.5 ml de solución de xilano 1 %, preparada en el mismo buffer. La mezcla se incubó durante 20 minutos a 50 °C y la reacción se detuvo con 1ml de 3-5 DNS. El desarrollo de color se realizó colocando los tubos en baño de agua a 100°C durante 5 minutos. Después de enfriar se añadió agua destilada hasta completar 5 ml, para luego ser leída a 540nm.

Cálculos:

Vol. reacción = 1 ml

Tiempo =10 minutos

Formula:

$$U/g = \frac{\mu M/ml \text{ xilosa} \times \text{vol reacción} \times \text{dilución de la enzima}}{\text{vol enzima} \times \text{tiempo} \times \text{peso seco del solido}}$$

3.4 Determinación de actividad pectinasa (Miller; 1959)

Para evaluar la actividad pectinasa obtenida por la fermentación en medio sólido (anteriormente descrita); se utilizó la técnica de determinación de actividad pectinasa propuesta por Miller (1959) la cual consiste en tomar 0.1 ml del preparado enzimático adecuadamente diluido en buffer citrato 0.05 M pH 4.8, se añadió a 0.9 ml de sln. 0.5 % de pectina o ácido péptico, preparada en el mismo buffer. La mezcla se incubó durante 15 minutos a 50 °C y la reacción se detuvo con 1ml de 3-5 DNS. El desarrollo de color se realizó colocando los tubos en baño de agua a 100°C

durante 5 minutos. Después de enfriar se añadió agua destilada hasta completar 5 ml, para luego ser leída en espectrofotómetro a 540nm.

Cálculos:

Vol. reacción =1 ml

Tiempo =15 minutos

Formula:

$$U/g = \frac{\mu M/ml \text{ glucosa } \times \text{ vol reaccion } \times \text{ dilucion de la enzima}}{\text{vol enzima } \times \text{ tiempo } \times \text{ peso seco del solido}}$$

3.5 Determinación de actividad endoglucanasa (Miller, 1959)

Para evaluar la actividad endoglucanasa obtenida por la fermentación en medio sólido (anteriormente descrita); se utilizó la técnica de determinación de actividad endoglucanasa propuesta por Miller (1959) la cual consiste en tomar 0.25 ml de caldo de fermentación o preparado enzimático adecuadamente diluido en buffer citrato 0.05 M pH 4.8, se añadió a 0.5 ml de solución de CMC al 0.5 %, preparada en el mismo buffer. La mezcla se incubó durante 30 minutos a 50 °C y la reacción se detuvo con 1ml de 3-5 DNS. El desarrollo de color se realizó colocando los tubos en baño de agua a 100°C durante 5 minutos. Después de enfriar se añadió agua destilada hasta completar 5 ml, para luego ser leída a 540nm.

Cálculos:

Considerando que:

x= μ M/ml de glucosa determinados por la curva patrón

V_t= volumen total de mezcla de reacción, ml (1 ml)

V_m= volumen de muestra, ml (0.05 ml)

D= dilución de la muestra (20)

t= tiempo de reacción, min (30 min)

p= peso seco del sólido

Fórmula:

$$U/g = x \cdot Vt \cdot D / Vm \cdot t \cdot p$$

La unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que libera un μ M de azúcares reductores/ min en las condiciones de ensayo establecidas.

3.6 Diseño experimental

Para la organización y desarrollo del experimento se utilizó un Diseño Experimental Completamente al Azar (DCA). El mismo constó de 7 tratamientos con cuatro réplicas cada uno.

Cada una de las mezclas fueron homogenizadas y llevadas a cajas de Petri, conformando así los tratamientos del experimento en cuestión, los cuales se muestran en la Tabla 5:

Tabla 5. Tratamientos del experimento.

Tratamiento (T)	Harina de maíz (g)	Salvado de trigo (g)	Cáscara de papa (g)
1	6	6	0
2	6	6	2
3	6	6	4
4	6	6	6
5	6	6	8
6 (Control)	6	6	6
7 (Control)	-	-	-

*T6: (control sin inocular para verificar que no estuviera contaminado con algún patógeno ninguno de los componentes de las mezclas)

*T7: Inoculación de la cepa de *A. oryzae* sobre medio convencional Agar Czapek Dox.

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 Caracterización fisicoquímica de los residuos industriales (cáscara de papa, harina de maíz y salvado de trigo)

Los resultados que se presentan en la tabla 6, nos permitieron conocer los valores de los nutrientes de salvado de trigo, harina de maíz y cáscara de papa que se utilizaron como soporte/sustrato en el presente trabajo. Los cuales se comportaron de manera similar a lo reportado en la literatura de las fuentes de salvado de trigo, harina de maíz y papa (Vargas y Murrillo, 1978, Gohl, 1982 y Prada, 2012) respectivamente, para el caso específico de la cáscara de papa no se encontraron hasta el momento citas bibliográficas que corroboren los resultados encontrados, ratificando de esta manera la poca importancia y uso que se le da a este residuo industrial.

Es importante mencionar el alto contenido de proteína cruda que se encuentra en la cáscara de papa, motivo por el cual se enfocó dichos análisis, es por ello que se utilizó la cáscara de papa como una de las fuentes principales de proteína, en este trabajo, se utilizó como soporte/sustrato para llevar a cabo la producción de enzimas en fermentación en medio sólido (FMS) utilizando la cepa *A. Oryzae*, ya que en la actualidad se trabaja buscando materiales orgánicos con alto contenido proteico. El resultado para este trabajo en dicho nutriente fue de 19.86% con una gran diferencia en comparación con lo descrito por Prada (2012) en donde reporta un contenido proteico en papa criolla de 2.5% y en otras variedades 1.9%, por otra parte Siebald y col., (2002), reporta un valor de 6% de proteína cruda. También se puede observar su alto porcentaje de ceniza que es de 8.60% en comparación con lo que reporta (Prada, 2012) el cual reporta el contenido de ceniza del 1%, en materia seca la cual es la cantidad total de minerales presentes en un alimento podemos observar que su valor es similar a lo obtenido en las dos materias (harina de maíz y salvado de trigo).

Por su parte Vázquez y Torres (2006) plantean que este incremento se debe a la riqueza que presentan las células epidérmicas en muchos de los minerales requerido por la planta. La USDA (2016) en su reporte se puede observar que se

tienen altos y bajos valores de minerales encontrados en la cascara de papa, por su parte, los valores de proteína cruda responden a la forma de análisis de laboratorio en la determinación de la misma ya que se emplean técnicas basada en la concentración de Nitrógeno el cual es un mineral con igual forma de absorción y asimilación a la antes citada, estos criterios coinciden plenamente con los planteados por Ramos y col. (2005) los cuales exponen que en todos los casos los altos niveles de Nitrógeno asimilado suponen altos niveles de proteína cruda pues su síntesis en el ribosoma y la de sus aminoácidos están reguladas por la presencia de dicho nutriente.

Tabla 6. Análisis físico químico de los residuos industriales.

Composición	Harina de maíz	Salvado de trigo	Cáscara de papa
Materia Seca	89.584	90.038	94.913
Humedad	10.416	9.962	5.087
Ceniza	1.828	5.788	8.609
Proteína Cruda	8.468	17.469	19.864
Extracto etéreo	5.327	3.815	0.647
Fibra Cruda	2.036	9.951	6.214
Extracto libre de nitrógeno (ELN)	82.341	62.977	64.666
Cobre	0.01	0.01	0.01
Magnesio	1.04	5.89	8.97
Fierro	0.05	0.13	0.17
Zinc	0.04	0.07	0.05
Manganeso	0.09	0.13	0.11
Potasio	3.2	12.45	20.06
Sodio	0.48	0.02	0.35
Calcio	0.45	0.71	0.95

4.3 Velocidad de crecimiento del hongo *Aspergillus oryzae*

Se evaluó la velocidad de crecimiento del hongo *A. oryzae* en diferentes tipos de sustrato con diferentes tratamientos, se inoculó la cepa y en placas de petri a diferentes tiempos (0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 horas). Se inoculó la cepa sobre medio de cultivo Agar Czapek Dox que sería el tratamiento control y para comprobar la desinfección de los medios de fermentación empleados se mantuvo otro tratamiento solo con el medio y sin inocular para observar si crecían o no algunas colonias en el material utilizado.

Otro de los resultados obtenidos y parte esencial de la presente investigación lo constituyó el crecimiento de *A. oryzae* bajo la influencia de diferentes niveles de cáscara de papa a diferentes tiempos de fermentación y su interacción (tabla 7), como se puede observar el mejor tratamiento lo constituyó el tratamiento 4, es decir el medio de fermentación que contenía niveles de 6 gramos de cáscara de papa, el mismo tuvo 2.58 cm de crecimiento, resultados similares obtuvieron Albelo y col., (2008) y Albelo y Col., (2010) en un sustrato compuesto a base de harina de maíz.

Este resultado puede estar dado según Carrillo (2003) a uno de los factores más importantes de comportamiento microbiano, la relación Carbono/Nitrógeno (C/N), que en muchos casos es la causa fundamental en la tendencia del crecimiento y que siempre se encuentra ligado a los nutrientes del medio cuando se trata de sistemas de fermentación sobre sustratos mixtos.

Si tomamos en consideración lo antes planteado, podemos decir que en el crecimiento de *A. oryzae* sobre los diferentes tratamientos de fermentación se observa una tendencia al incremento en los tratamientos 2, 3 y 4 con niveles crecientes de cáscara de papa, la cual es rica en proteína (también como fuente de nitrógeno), esto trae consigo que se modifique la relación C/N hacia el óptimo encontrado en el tratamiento 4 (figura 10), por su parte si se analizan los valores de crecimiento de los tratamientos 1 y 5 se puede ver que estos son inferiores a los demás y la causa puede ser que para el tratamiento 1 existe una escasa fuente de nitrógeno y para el tratamiento 5 una muy alta fuente nitrogenada las cuales traen consigo un desbalance en la relación C/N.

Aurea y col. (1993) destacaron que, cuando se utiliza aire seco en los procesos de fermentación sólida, ocurre el fenómeno inverso, que deprime de igual forma la actividad enzimática.

Tabla 7. Crecimiento de *A. oryzae* (cm) bajo la influencia de diferentes gramos de cáscara de papa y diferentes tiempos de fermentación

Tiempos (Horas)	Tratamientos (g de cáscara de papa)						
	1 (0)	2 (2)	3 (4)	4 (6)	5 (8)	6 *	7**
0(0)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.0	0.1
1(24)	0.1	0.21	0.5	0.82	0.70	0.0	0.48
2(48)	0.1	0.27	0.99	1.42	1.38	0.0	0.83
3(72)	0.1	2.40	2.8	2.64	1.94	0.0	1.33
4(96)	0.1	2.76	3.55	3.66	2.64	0.0	1.58
5(120)	0.1	3.38	4.05	4.43	3.40	0.0	2.06
6(144)	0.44	3.79	4.39	4.97	3.71	0.0	2.28

*Control-1 (Medio de fermentación sin inocular); **Control-2 (Medio de Agar Czapek Dox)

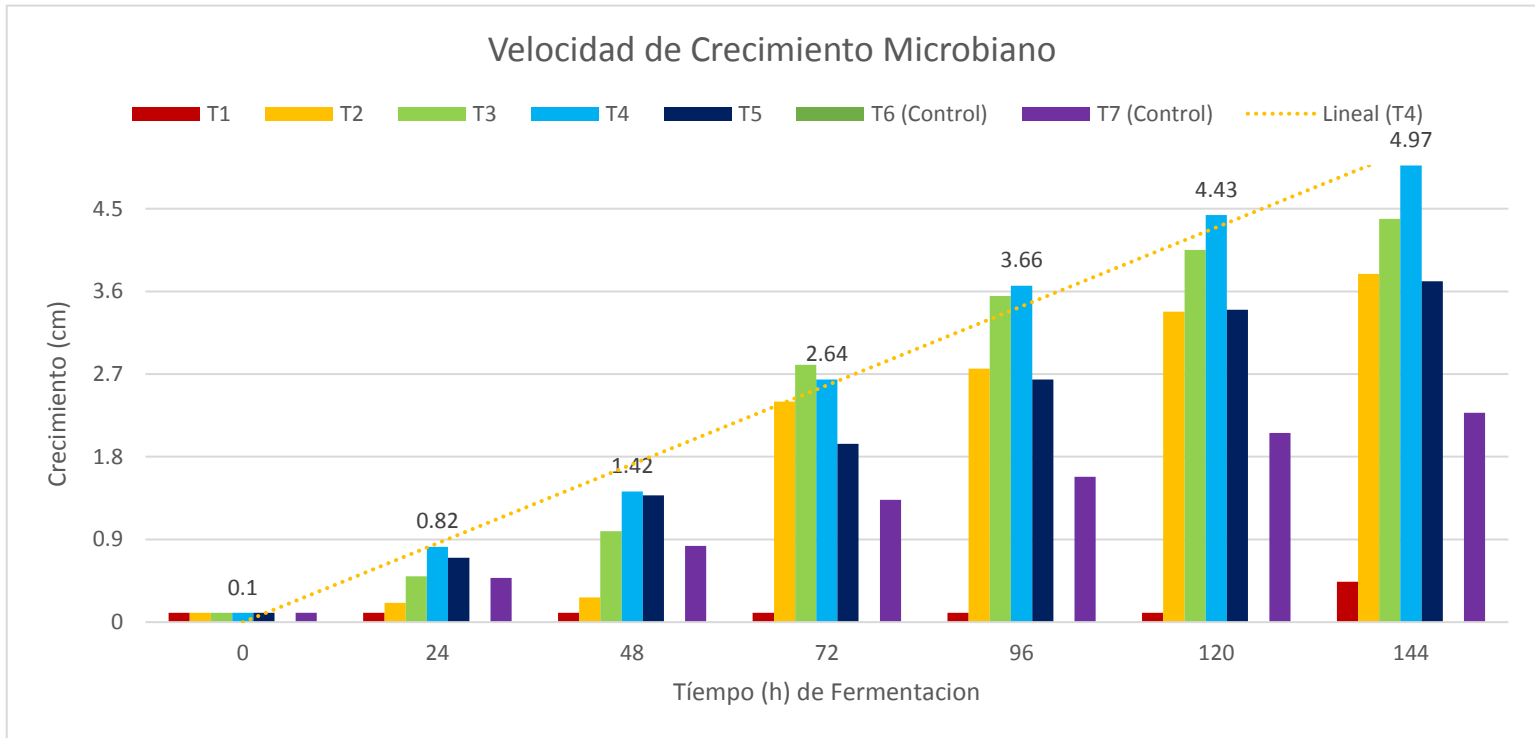


Figura 10. Crecimiento de *A. oryzae* sobre los tratamiento

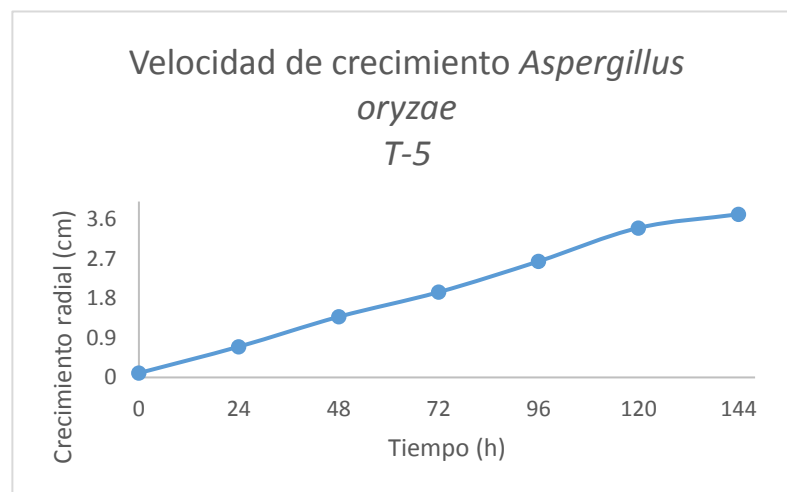
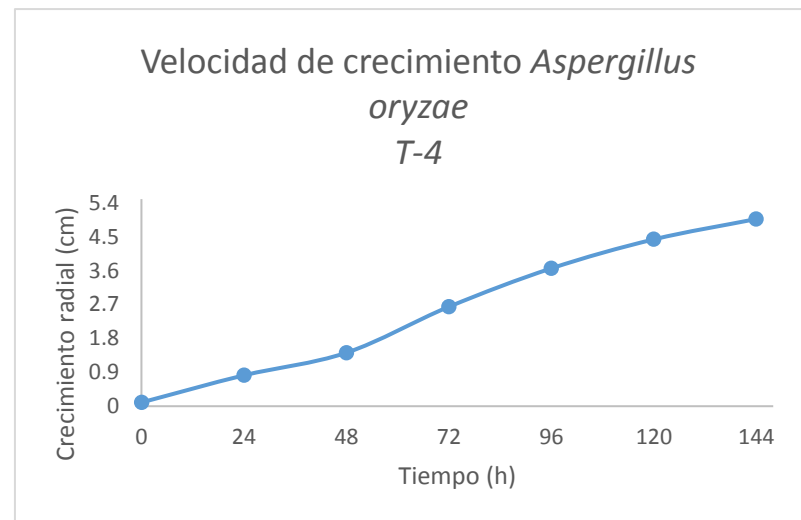
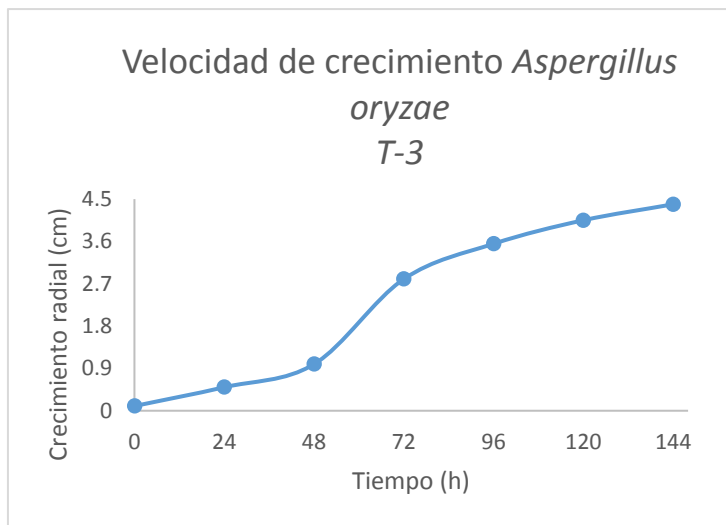


Figura 11. Curvas de velocidad de crecimiento de los T-3, T-4 y T-5.

En la figura 11 se observa el comportamiento de los tratamientos 3, 4 y 5, en el cual se aprecia un mayor crecimiento en el tratamiento 4, este crecimiento solo es seguido de los encontrados en el tratamiento 3, el cual pudiera ser objeto de estudio pues a pesar de presentar un crecimiento inferior significativo comparado con el tratamiento 4, sus menores dosis de aplicación pudieran suponer mayores ganancias económicas, Orzúa y col (2001), mencionan que a grandes cantidades de nutrientes, punto crítico de humedad y velocidad de secado son algunos de los factores que favorecen el crecimiento fúngico.

Es necesario resaltar que a pesar de ser el tratamiento 4 el de mejor crecimiento, todos los demás con excepción del tratamiento 1 se comportaron con medias de crecimiento por encima del control Agar Czapek, lo que evidencia el potencial nutritivo de la cáscara de papa para ser empleado en sustitución de este medio de fermentación.

En cuanto a la dinámica de crecimiento del hongo *A. oryzae* a lo largo del experimento, se encontró que crecía de forma proporcional con excepción del tratamiento 1 (tabla 7 y figura 10), esto coincide con lo reportado por Albelo y col., (2008) y Albelo y Col., (2010) el cual encontraron en 144 horas de crecimiento una tendencia similar sobre un sustrato de harina de maíz.

Lo anteriormente planteado se puede ver mejor si analizamos la tabla 6, en este caso podemos observar que el salvado de trigo y la cáscara de papa tienen los más altos niveles en proteína cruda, lo que explica que sí en los medios se mantuvieron los niveles constantes de harina de maíz y salvado de trigo es entonces la cáscara de papa la que regula el incremento de proteína cruda en cada medio.

4.4 Producción de xilanasa en fermentación en medio sólido (FMS)

Umsza y col., (2011) concluyen que la actividad xilanolítica es estable en un margen de temperatura de 30 a 45 °C y que a temperaturas superiores se presenta la inhibición de la actividad enzimática. Estos mismos autores citan a Beg y col. (2001), quienes reportan que la producción de xilanasas por diferentes especies hongos es estable en un rango de 24 a 60 °C. Ito y col. (1992) reportan que las xilanasas

producidas por *Aspergillus kawachii* IFO 438 fueron estables en un rango de temperatura de 30 a 60 °C.

La producción de la xilanasa fue evaluada utilizando el hongo *Aspergillus oryzae* en una fermentación en medio sólido (FMS) utilizando como soporte/sustrato mixto de harina de maíz (38,91%), salvado de trigo (38,91%) y cáscara de papa (22,18%), para ello se mezclaron homogéneamente las diferentes materias primas siguiendo las proporciones antes señalados.

El experimento se montó sobre un Diseño Completamente Aleatorizado (DCA), donde el tiempo de fermentación se comportó como la única causa de variación posible. Cada matraz de 250 ml constituyó una unidad experimental. En cada matraz se aplicó una cantidad del medio homogéneo de 25.7 g, y el mismo se llevó a 70% de humedad para la posterior inoculación con *A. oryzae* (106 esporas/gramo de sustrato, es decir 1.36ml de solución/25.7gramos de sustrato), se incubó a 50 °C por 108 h, en la figura 12 se puede apreciar que la máxima producción de la xilanasa fue a las 24 h de fermentación (321.50 U/L y/o 193.06g/L) pero también se puede observar que a las 12 h inicia la producción de la xilanasa, Albelo y col., (2008) y Albelo y Col., (2010) mencionan que obtuvieron mayor producción a las 48 horas, de la enzima fitasa usando la cepa de *A. oryzae*, posterior a este tiempo la producción decrece, sin embargo, Sandhya y col., (2005) señalan que la reducción de la producción de la enzima se puede deber a la limitación de nutrientes y a la hidrólisis de la propia proteasa.

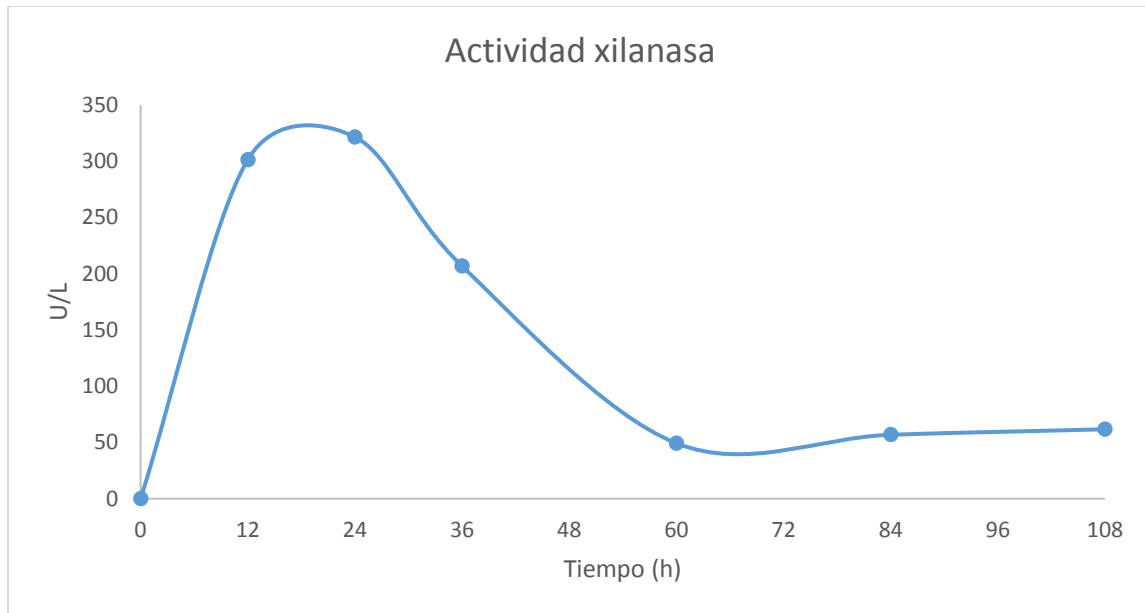


Figura 12. Comportamiento de la actividad xilanasa

4.5 Producción de pectinasa en fermentación en medio sólido (FMS)

Para la determinación de la actividad pectinasa se utilizó el mismo procedimiento descrito en el subtema 4.4, en la figura 13 se puede apreciar que la máxima producción de la pectinasa fue a las 12 h de fermentación (79.11 U/L y/o 23.75 g/L), Yegres (2001) realizaron un estudio para la producción de pectinasas con *A. niger* CH4 en FMS utilizando como sustrato pulpa de café y bagacillo de caña, utilizaron micelio preadaptado (3 % p/p), y alcanzo el máximo de producción de la actividad pectinasa a las 48 h pero la producción es 44 % menor que con esporas. Trejo y col (1991) mencionan que la actividad “endo” pectinasa encontrada en los cultivos con pectina como sustrato fue muy importante con esta relación. Sin embargo, la actividad “exo” pectinasa determinada por la aparición de grupos reductores fue mínima, esta relación permitió un crecimiento rápido sobre sacarosa y una producción importante de enzima inducida por la pectina.

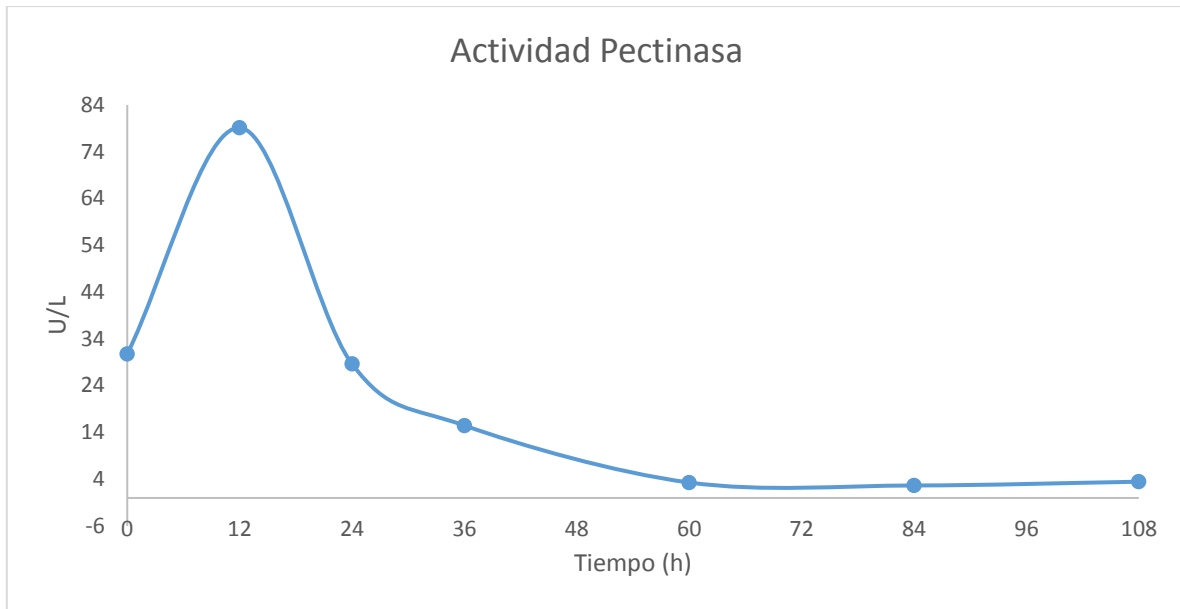


Figura 13. Comportamiento de la actividad pectinasa

4.4 Producción de endoglucanasa en fermentación en medio sólido (FMS)

Para la determinación de la actividad endoglucanasa se utilizó el mismo procedimiento descrito en el subtema 4.4, en la figura 14 se puede apreciar que la máxima producción de la endoglucanasa fue a las 12 h de fermentación (445.26 U/L y/o 240.65 g/L), Carrasco y col (2003) en su estudio mencionan que obtuvo la mayor producción de la enzima a las 72 h de fermentación, posterior a este tiempo la producción decrece, sin embargo, Sandhya y col., (2005) señalan que la reducción de la producción de la enzima se puede deber a la limitación de nutrientes y a la hidrólisis de la propia proteasa. Vázquez y col., (1998) mencionan que la producción de β - 1,3 - glucanasa, quitinasas y proteinasas, cuya actividad se ve incrementada notoriamente cuando el hongo se cultiva en un medio de residuos orgánicos con quitina.

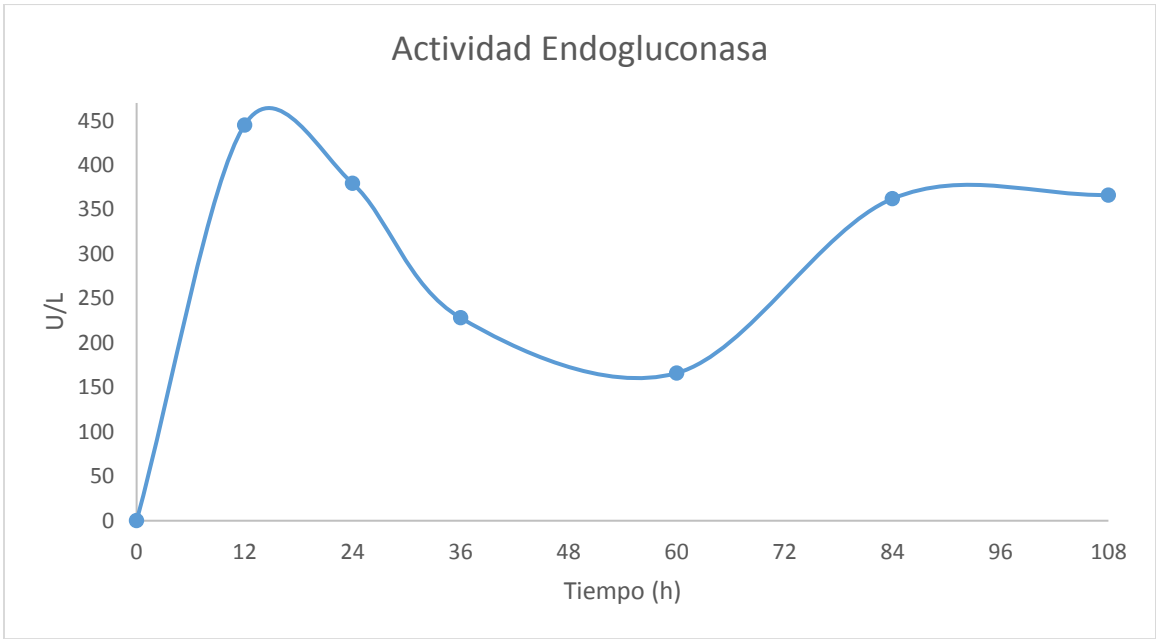


Figura 14. Comportamiento de la actividad endoglucanasa

5. CONCLUSIONES

- La mezcla de los tres sustratos (harina de maíz, salvado de trigo y cascara de papa) puede ser utilizada como soporte/sustrato para una fermentación en medio sólido (FMS), por su alto contenido proteico.
- El hongo *A. oryzae* presentó la mayor velocidad de crecimiento microbiano con la mezcla del tratamiento 4 a comparación con el tratamiento contro del Agar Czapek Dox.
- La mayor actividad de la enzima xilanasa se obtuvo a las 24 h de fermentación (321.50 U/L y/o 193.06g/L).
- La mayor actividad de la enzima pectinasa fue a las 12 h de fermentación (79.11 U/L y/o 23.75 g/L).
- La mayor actividad de la enzima endoglucanasa fue a las 12 h de fermentación (445.26 U/L y/o 240.65 g/L)

6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFÍA

- Albelo H. E., Gutiérrez, B. O. Bocuort, S. R., Albert R. A. y Vera C. M., (2008) Evaluación de la actividad fitasa de un crudo enzimático a partir de fermentaciones microbianas sobre un sustrato amiláceo, Revista electrónica de Veterinaria 1695-7504 Vol. 9 No. 11.
- Albelo H. E., Gutiérrez, B. O. Bocuort, S. R., Albert R. A. y Vera C. M., (2010) Potencialidades del hongo *Aspergillus oryzae* como regulador de las excreciones de fósforo inactivo al medio por animales monogástricos, Revista electrónica de Veterinaria 1695-7504 Vol. 11 No. 03B.
- Arámbula, V.G.; Barrón, A.L.; González, H.J.; Moreno, M.E.; Luna, B.G. 2001. Efecto del tiempo de cocimiento y reposo del grano de maíz (*Zea mays* L.) nixtamalizado, sobre las características fisicoquímicas, reológicas, estructurales y texturales del grano, masa y tortillas de maíz. Arch Latinoam Nutr. 51:2: 187-94
- Aro N, Pakula T, Penttilä M. (2005) Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. FEMS Microbiology Review; 29:719-739.
- Aurea, R., Morales, M., Villegas, E. y Revah, S. 1993. Influence of mold growth on the pressure drop in aerated solid state fermentation. Biotechnol-Bioeng. 41:1007
- Badui D., Salvador (2006) Química de los alimentos-Cuarta edición, person educación México.
- Badui D., Salvador (2013) Química de los alimentos-Quinta edición, person educación México.
- Beg Q.K., Kapoor M., Mahajan L., Hoondal G.S. 2001. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. Appl Microb Biotechnol. 56, 326-338.
- Berghem, E. R.; Pettersson, L. G.; Axio-Frediksson, U. B., (1975): The mechanism of enzymatic cellulose degradation. Characterization and enzymatic

- properties of a p-I, 4-glucan cellobiohydrolase from *Trichoderma viride*. *Eur. J. Biochem.*, 53: 55-62.
- Bhargav, B. S. Panda, M.P., Ali, y Javed, S. (2008) Solid-state Fermentation: An Overview, *Chem. Biochem. Eng. Q.* 22 (1) 49–70
- 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.
- Butt MS, Tahir-Nadeem M, Ahmad Z, Sultan MT. (2008) Xylanases and their applications in baking industry. *Food Technol Biotechnol*; 46(1): 22-31.
- Cannel, E., Moo-Y oung, M. (1980), *Process Biochem.* Vol. 4 No. 2.
- Cantarel, B; P. Coutinho; C. Rancurel; T, Bernard; B. Lombard. and B. Henrissat. (2008). The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics.
- Carrasco, T., Valiño, E., Ibarra, A., García, Y., Pérez, T., (2003) Efecto negativo de la humedad en la fermentación en estado sólido del bagazo de caña de azúcar *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, vol. 37, núm. 1, pp. 37-41
- Carrillo, L. (2003) *Microbiología Agrícola*, Universidad Nacional de Salta, ISBN 987-9381-16-5
- Castillo R., Edmundo y Rodríguez A., Ma. Elena (2014) Enzimas aplicadas en procesos industriales, RDN, *Revista Digital Universitaria*, 1607-6079 2014, Vol. 15 Núm. 12, ISSN 1607-6079, Art. 96.
- Coutinho, P. and B. Henrissat. (1999). Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach. In: Gilbert HJ, Davies G, Henrissat H, Svensson B, editors. *Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry. 3–12.
- Couto, S. R. y M. Á. Sanromán (2006). Application of solid-state fermentation to food industry—A review. *Journal of Food Engineering* 76(3): 291-302.

- Cowieson, A. J.; Bedford, M. R.(2009) The effect of phytase and carbohydrase on ileal amino acid digestibility in monogastric diets: Complementary mode of action? *Worlds Poult. Sci. J.* 65: 609–624.
- Crueger, W. y A. Crueger (1993). *Biotecnología. Manual de Microbiología Industrial.*, Ed. Acribia.
- 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.
- Doelle H. W., Mitchell D. A. y Rolz C. E. (1992). *Solid Substrate Cultivation.* Elsevier Applied Science, London, N. York, Chapter 3
- Fang, H-Y., Chang, S-M., Lan, C-H., Fang, T. J. 2008. Purification and characterization of a xylanase from *Aspergillus carneus* M 34 and its potential use in photoprotectant preparation. *Process Biochemistry* 43:49-55.
- Fazenda, M. L., R. Seviour, R, McNeil, B & Harvey, LM. (2008). Submerged Culture Fermentation of "Higher Fungi": The Macrofungi. *Advances in Applied Microbiology* 63: 33-103.
- Flores. F. T.C., Gutiérrez-R. M., Revah S. y Favela T.E. (2011) Estudio comparativo de oxigenasas producidas por *Aspergillus niger*, ATCC 9642, en fermentación en estado sólido y sumergido, *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 189-207, Vol. 10, No. 2
- Golh, B.,(1982). *Piensos Tropicales*, FAO, pp. 347 – 350.
- Hölker, U., Höfer, M. y Lenz, J. (2004). Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 175-186, Vol 64 No. 2
- Hernández, A. (2003). *Microbiología Industrial.* Costa Rica, Ed. EUNED.
- Hesseltine, C. W (1977) "Solid State Fermentation, Part I", *Process Biochemistry*, Julio-Agosto,

- Hesseltine, C. W. (1972). Biotechnology report: solid-state fermentations. *Biotechnology and Bioengineering* 14: 517-532.
- Hesseltine, C. W., *Process Biochem.* July/August 1977 24.
- Israilides, C., Vlyssides, A., Arapoglou, D., Varzakas, T., Marchant, R., & Vlyssides, A. (2008). Integrated Management of Potato Starch Wastes. *Institute of Technology of Agricultural Products*, 12-27.
- Ito K., Ogassawara J., Sugimoto T., Ishikawa T. 1992. Purification and properties of acid stable xylanases from *Aspergillus kawachii*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 56, 547 - 550.
- Jayani, R S, Saxena, S Y Gupta, R (2005) Microbial pectinolytic enzymes: a review. *Proc. Biochem.* 40: 2931-2944.
- Kashyap, D R, Vohra, P K, Chopra, S Y Tewari, R (2001). Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Biores. Technol.* 77: 215-227.
- Liang Y, Pan L, Lin Y (2009). Analysis of extracellular proteins of *Aspergillus oryzae* grown on soy sauce koji. *Biosci Biotechnol Biochem*, 192-5 Vol. 73, num. 1.
- Machida M, Asai K, Sano M, Tanaka T, Kumagai T, Terai G, et al. (2005) Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature*;43:1157-61.
- Mitchell, D. 1999. Scale-up Strategies for Packedbed Bioreactors for Solid-state Fermentation, *Process Biochem.* 35:167-178.
- Mitchell, D.A., Berovic, M. & Krieger, N. (2002). Overview of solid state bioprocessing *Biotechnology Annual Review* 183 © 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved. Volume 8. M.R. El-Gewely, editor.
- Mohagheghi, A., Poorazarang, H., Hematyar, N., & Elhamirad, A. (2012). Phenolics in Potato Peels: Extraction and Utilization as Natural Antioxidants. *World Applied Sciences Journal*, 191-195.

- Moo-Young M., Moreira, A. R y Tengerdy, R. P. 1983.Principles of the Solid Substrate fermentation, In Filamentous Fungi.4 Ed. J. E. Smit, D.R. Berry and B. Kristianse, Edward Arnold.117-144.
- Moo-Young M.,y Cannel, E.1980.Solid State Fermentation Systems.Process Biochem.24-28.
- Niture, S K (2008) Comparative biochemical and structural characterizations of fungal polygalacturonases. *Biología*, 63(1): 1-19.
- Orzúa G. MC., Aguilar G. C., Rodríguez H. R. (2001) Velocidad de crecimiento de *Aspergillus niger* (Aa-20) sobre diversos residuos agroindustriales, Departamento de Investigación en Alimentos, Universidad Autónoma de Coahuila A.P. 252, 25289
- Pandey A. (2003) Solid-state fermentation, *Biochemical Engineering Journal*, Volume 13, No. 2, Pag. 81-84
- Pandey P., Selvakumar, P., Soccol, C. R., Nigan, P. (1999) Solid-state fermentation for the production of industrial enzymes *Current Science*. 27(1).
- Parenicová, L (2000). Pectinases of *Aspergillus niger*: A Molecular And Biochemical Characterisation. Tesis de doctorado. Wageningen University. Holanda. ISBN 90-5808-203-2.
- Peña m., Carolina y Quirasco B. Maricarmen (2014) Enzimas en lo Alimentos, *Bioquímica de lo comestible*, RDN, *Revista Digital Universitaria*, 1607-60792014, Vol. 15 Núm. 12, ISSN 1607-6079, Art. 94.
- Polizeli , M. L. T. M. A., Rizzatti, C. S., Monti, R., Terenzi, H. F., Jorge, J. A., Amorim, D. S. (2005) Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 67: 577–591.
- Prada, O. R (2012) Alternativa de aprovechamiento eficiente de residuos biodegradables: el caso del almidón residual derivado de la industrialización de la papa Bogotá, *Rev. Esc. Adm. Neg*. No.72: 180-192

- Ramírez R. Joaquín y Ayala A. Marcela (2014) Enzimas: ¿qué son y cómo funcionan?, RDN, Revista Digital Universitaria, 1607-6079 2014, Vol. 15 Núm. 12, ISSN 1607-6079, Art. 91.
- Ramos, A., de Cárdenas, I., Echenagusía, A., Ferrer, A., Hernández, M., Huelva, R., y Valdés, R. (2005). Bioquímica para estudiantes de ciencias agropecuarias. La Habana: Pueblo y Educación.
- Rodríguez F. D.E., Rodríguez L. J. A., De Carvalho J. C., Sturm w. , Soccol C.R., (2011) The behavior of kinetic parameters in production of pectinase and xylanase by solid-state fermentation, Volume 102, No. 22, Pag. 10657–10662
- Rodríguez, Z.A. (2004). Uso del boniato (*Ipomea batata lam*) en la tecnología de fermentación en estado sólido de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*). La Habana. Tesis (en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Veterinarias).
- Sandhya C., Sumantha A., Szakacs G., Pandey A. 2005. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid state fermentation. *Process Biochemistry* 40, 2689-2694.
- Schieber, A., & Aranda, M. (2009). Potato Peels: A Source of Nutritionally and Pharmacologically Interesting Compounds. *Food. Global Science Books*, 23-29.
- Siebold E, Goic L, Matzner M. (2002). Alimentación de rumiantes con papa de desecho. En: Boletín Técnico N° 88 Instituto de Investigaciones Agropecuarias –Centro Regional de Investigaciones Remehue.
- Suttle, J. (2008) Symposium introduction: enhancing the nutritional value of potato tubers. *American Journal of Potato Research* 85: 266.
- Trejo H. M. R., Oriol E., Pez C. A. I, Roussos S., Viniegra G. G. y Raimbaul M., (1991) Producción de pectinasas de *Aspergillus niger* por fermentación sólida sobre soporte, *MICOL. NEOTROP. APL.* 4:49-62.

- Umsza M.A., Días A., Ory I., Blandino A., Gomes E., Caro I. 2011. Xylanase production by *Aspergillus awamori* under solid state fermentation conditions on tomato pomace. *Braz J Microbiol.* 42, 1585 – 1597.
- USDA National Nutrient Database for Standard Reference 28 slightly revised May 2016, information consulted in: <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/3080?manu=&fgcd=&ds=>
- Vázquez G., S., Leal M., C. y Herrera E., A. (1998). Analysis of the β -1,3-Glucanolytic System of the Biocontrol Agent *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology.* Vol. 64 N. 4, p. 1442 – 1446
- Vázquez, E. y Torres, S. (2006). Nutrición mineral. *Fisiología Vegetal*, pp. 158-212.
- Viniegra, G. G. 1997. Solid Stated Fermentation: Difinition, Characteristics, Limitations and Monitoring, Ed. *Advances in solid Stated Fermentation*, Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, Chapter 2. 5-22.
- Wong, K.K., Tan, T.U., Saddler, J N. (1988) Multiplicity of beta-1, 4-xylanase in microorganisms: functions and applications. *Microbiol Reviews.* 52(3): 305–317.
- Yegres S., Sánchez J., Belmar M., Riveros W. y Belmar D., (2001) Producción De Enzimas Pécicas Ensayos Preliminares, Saber, Universidad de Oriente, Venezuela. Vol. 13. N° 1:55-59.

ANEXOS

➤ Anexo A. Algunos equipos utilizados en la presente investigación:

- **Estufa de secado a 60 °C**

Marca: Robertshaw Control Company

Serie: 15697

- **Molino Thomas Willey**

Marca: M. Thomas Company

Modelo: 4

- **Tamiz de acero inoxidable forma alta**

Marca: Tyler

Número de malla: 30

Abertura en mm / Abertura en pulg.: 0.600 / 0.0234

- **Estufa de secado 105 ± 5 °C**

Marca: Thelco

Modelo: 27 GCA Precisión Scientific

- **Mufla Thermo Scientific**

Marca: Thermolyne

Modelo: 1500

- **Balanza analítica capacidad 210 g**

Marca: OHAUS

Modelo: Explorer 490202

- **Aparato Labconco para Fibra Cruda**

Serie: 54781

- **Potenciómetro digital (pH-meter)**

Marca: conductronic pH10

- **Incubadora**

Marca: Quincy Lab. Inc. (QL)

Modelo: 20 GC Lab.Oven

- **Cámara de recuento Neubauer-improved**

Marca: Marienfeld GmbH Co. KG

- **Microscopio óptico binocular**

Marca: Motic microscopes

Serie: B3 Professional Objetivos 4x, 10x, 40 x y 100x (para aceite)

- **Termobalanza**

Marca: OHAUS

Modelo: MB23

➤ **Anexo B. Principales reactivos utilizados en la presente investigación:**

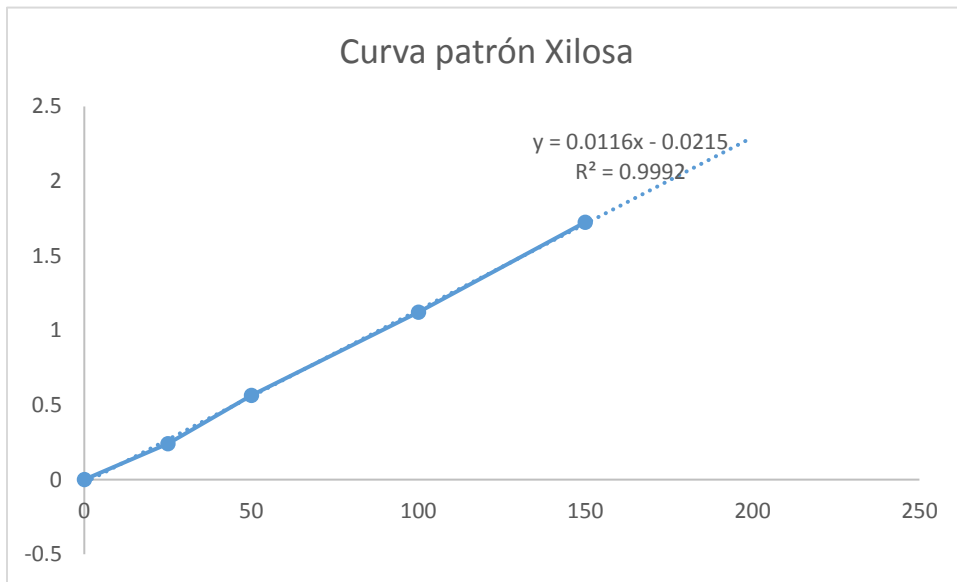
- **Agar Czapek Dox** marca Titan Biotech
- **Hidróxido de sodio (NaOH)** marca Fermont Productos Químicos Monterrey
- **Ácido sulfúrico (H₂SO₄)** marca Jalmeq
- **Ácido nítrico (HNO₃)** marca CTR Scientific
- **Ácido perclórico 70 % (HClO₄)** marca Fermont Productos Químicos Monterrey
- **Éter de petróleo** marca Jalmeq

➤ Anexo C. Preparación de reactivos.

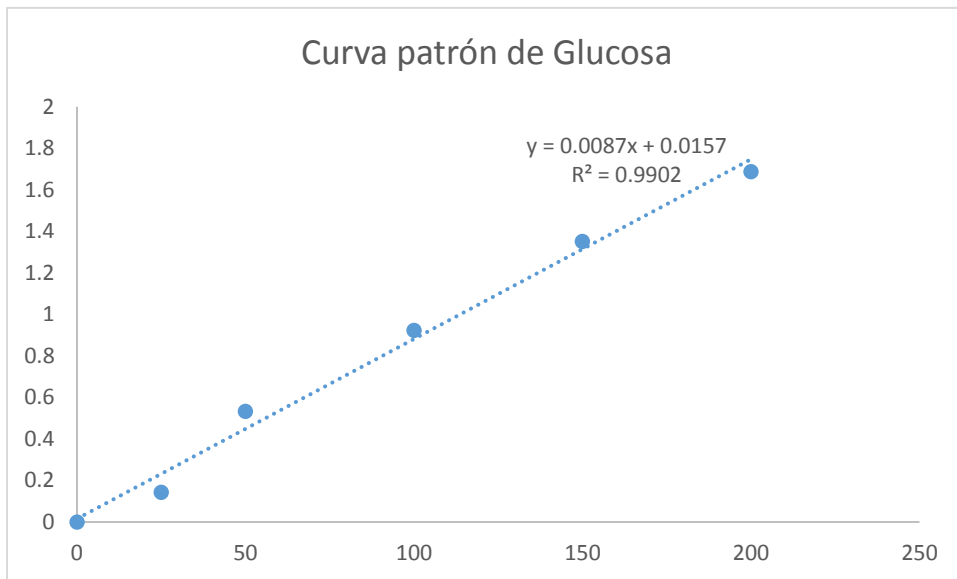
Buffer citrato de sodio 0.1 M, pH 4.8

- **Solución A**: Solución de ácido cítrico 0.1 M (21.01g en 1000 ml de agua destilada).
- **Solución B**: Solución de citrato de sodio 0.1M 29.41g de $C_2H_6O_6Na \cdot 2 H_2O$ en 1000 ml de agua destilada.
 - ❖ Se añaden a un volumétrico de 1000 ml, 230 ml de la solución A y 290 ml de la solución B y se completa el volumen con agua para análisis.
- **Solución del 3,5- dinitrosalicílico (DNS)**
 - ❖ Pesar 10 g de ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) y disolver en la solución de NaOH 2N caliente (100° C).
 - ❖ Una vez disuelto del DNS añadir a un volumétrico de 1litro que debe contener aproximadamente 100 ml de la solución de tartrato de Na-K caliente.
 - ❖ Con la solución de tartrato restante arrastrar el resto de DNS disuelto que queda en el beaker
 - ❖ Enfriar y completar y filtrar
- **Solución de xilano 1 %**: 1.0 g de xilano es añadido a un beaker de 100 ml y disuelto con agitación en 50 ml de 0.1 N NaOH, luego de lo cual se ajusta el pH a 4.8 con ácido acético concentrado y se enrasa en un volumétrico de 100 ml con agua destilada (Smith y Wood, 1992)
- **Solución de pectina o ácido péctico, 0.5 %**: 0.5 g de pectina o ácido péctico son añadidos a un beaker de 50 ml y disueltos con agitación en cierto volumen de buffer citrato de sodio 0.1 M, pH 4.8. Luego la solución fue añadida a un volumétrico de 100 ml, para enrasar.
- **Solución CMC, 0.5 %**: 0.5 g de CMC son añadidos a un beaker de 50 ml y disueltos con agitación en cierto volumen de buffer citrato de sodio 0.1 M, pH 4.8. La solución fue añadida luego a un volumétrico de 100 ml, para enrasar.

Anexo D. Curva patrón de xilosa.



Anexo E. Curva patrón de glucosa para pectinasa.



Anexo F. Curva patrón de glucosa para endoglucanasa.

