

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



EVALUACION DE LA UTILIZACION DE TRES SUSTRATOS (GUISHE, BAGAZO DE UVA Y NOPAL) HIDROLIZADOS MEDIANTE FERMENTACION EN MEDIO SOLIDO PARA SU INCLUSION EN DIETAS PARA RUMIANTES.

Tesis

Que presenta GUSTAVO LOPEZ GUARIN
como requisito parcial para obtener el Grado de:
DOCTOR EN CIENCIAS EN ZOOTECNIA

Saltillo, Coahuila.

Diciembre 2017

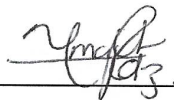
EVALUACION DE LA UTILIZACION DE TRES SUSTRATOS (GUISHE,
BAGAZO DE UVA Y NOPAL) HIDROLIZADOS MEDIANTE
FERMENTACION EN MEDIO SOLIDO PARA SU INCLUSION EN DIETAS
PARA RUMIANTES.

Tesis

Elaborada por GUSTAVO LOPEZ GUARIN como requisito parcial para
obtener el grado de Doctor en Ciencias en Zootecnia con la supervisión y
aprobación del Comité de Asesoría.



Dr. Mario Alberto Cruz Hernández
Asesor Principal




Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez
Asesor



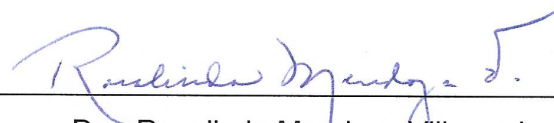
Dr. Jesús Manuel Fuentes
Rodríguez
Asesor



Dra. Dolores Gabriela Martínez Vázquez
Asesor



Dr. Armando Robledo Olivo
Asesor



Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal
Subdirectora de Postgrado
UAAAN

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme culminar este ciclo de mi vida y por enviarme a tres de las personas más importantes en mi vida.

A mi comité de asesores:

Dr. Mario Alberto Cruz Hernández, Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez, Dr. Armando Robledo Olivo, Dr. Jesús M. Fuentes, por compartir sus conocimientos y por su valiosa colaboración en la elaboración de este proyecto.

Al CONACyT por el apoyo económico brindado durante estos dos años

A la UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO por el financiamiento del proyecto otorgado y por la facilidad de las instalaciones para realizar este trabajo

ÍNDICE GENERAL

1. Introducción	2
1.1. justificación	3
1.2. Objetivo general	3
1.2.1 Objetivos específicos	3
1.3. Hipótesis	4
2. Revisión de literatura	5
2.1. Plantas de zonas áridas y semiáridas de México:	5
2.1.1 <i>Opuntia spp</i>	5
2.1.2. <i>Agave spp</i>	7
2.1.3. <i>Prosopis spp</i>	8
2.1.4. <i>Acacia subangulata</i>	8
2.1.5. <i>Flouresia cernua</i>	9
2.1.6. <i>Parthenium incanum</i>	9
2.1.7. <i>Agave lechuguilla</i>	9
2.1.8 <i>Leucophyllum frutescens</i>	10
2.1.9. Tratamiento a sustratos.	11
2.2. Fermentación en medios solidos	11
2.2.1 características estructurales de la celulosa	14
2.2.2 características de la celulosa	15
2.2.3 Biodegradación enzimática de celulosa	16
2.3. Principales parámetros de la FMS	17
2.3.1. Los microorganismos y la inoculación	17
2.3.2. La actividad de agua y la humedad	17
2.3.3. La aireación y el cambio de metabolismo	18
2.3.4. La temperatura	18
2.3.5. La evolución del pH	18
2.3.6. Los microorganismos y la cantidad de inóculo	19
2.3.7. Sustratos empleados para la producción de enzimas en FMS	19
2.4. Diseño del fermentador en sistemas para la reproducción de enzimas en FMS	19
2.5. Biorreactores para FMS	21
2.5.1. Biorreactor en columna	21
2.5.2. Biorreactor de Columna Estéril.	22
2.5.3. Tambor horizontal	23
2.5.4. Biorreactor Zymotis	24
2.5.5. Biorreactor Growtek	24
2.5.6. Biorreactor para proceso continuo	25
2.5.7. Biorreactor Columna-Charola	25
2.5.8. Biorreactor Biocon	26
2.5.9. Biorreactor de lecho fluidizado	26
2.6. producción de alimentos por fermentación en medio sólidos	27
3.0. Materiales y Métodos	30
Etapa I	
3.1 Aislamiento y caracterización de hongos filamentosos obtenidos del semidesierto de Coahuila:	30
3.1.1 Aislamiento de microorganismos	30
3.1.2 Identificación macro y microscópica de microorganismos filamentosos	30
3.1.3 Crecimiento radial de microorganismos	30
3.1.4 Identificación molecular de los microorganismos	30
Etapa II	

3.2 Caracterización fisicoquímica de residuos agroindustriales:	32
3.2.1 Acondicionamiento de la materia prima:	32
3.2.2 Caracterización química de la materia prima:	32
3.2.2 Caracterización física de la materia prima:	32
Etapa III	
3.3 Selección de una cepa en base al crecimiento radial sobre la materia prima:	33
3.3.1 Crecimiento radial de microorganismos en guishe (R1)	33
3.3.2 Crecimiento radial de microorganismos en bagazo de uva (R2)	33
3.3.3 Crecimiento radial de microorganismos en nopal (R3)	33
3.4 Producción de la enzima celulasa mediante FMS:	34
3.4.1 Medio de cultivo Czapeck:	34
3.4.2 Recuento de esporas:	34
3.4.3 Condiciones de la fermentación:	36
3.4.3.1 Empaque:	36
3.4.3.2 Fuente de nitrógeno:	36
3.4.3.3 Tamaño de partícula:	37
3.4.3.4 Inoculo:	37
3.4.3.5 Aireación:	37
3.4.4 Montaje de columnas:	37
3.4.5 Fermentación	38
3.4.5.1 Buffer de extracción de celulasas:	38
3.4.5.2 Determinación de biomasa:	39
3.4.6 Diseño de experimentos:	39
Etapa IV	
3.5 Determinación de la actividad enzimática:	40
3.5.1 Determinación de actividad endo-glucanasa:	41
3.5.2 Determinación de actividad exo-glucanasa:	41
3.5.3 Determinación de actividad β -glucosidasa:	42
3.5.4 Determinación de azúcares reductores por DNS:	42
3.5.5 Conversión de unidades (U/mL) de actividad enzimática:	43
3.5.6 Parámetros cinéticos:	43
3.5.6.1 Formación de biomasa:	43
3.5.6.2 Formación de producto:	44
Etapa V	
3.6 Caracterización físico-química del material degradado:	44
Etapa VI	
3.6 Digestibilidad in vitro de sustratos:	45
4.0. Resultados y discusión	47
Etapa 1	
4.1 Aislamiento y caracterización de hongos filamentosos obtenidos del semi desierto de Coahuila:	47
4.1.1 Aislamiento de microorganismos	47
4.1.2 Identificación macro y microscópica de microorganismos filamentosos	47
4.1.2 Selección de una cepa en base al crecimiento radial en PDA:	51
Etapa II	
4.2 Caracterización fisicoquímica de las materias primas:	53
Etapa III	
4.3 Selección de una cepa en base al crecimiento radial sobre la materia prima:	54
4.3.1 Crecimiento radial de microorganismos en guishe (R1)	54

4.3.2 Crecimiento radial de microorganismos en bagazo de uva (R2)	57
4.3.3 Crecimiento radial de microorganismos en nopal (R3)	60
Etapa IV	
4.4. Determinación de la actividad enzimática en cada uno de los sustratos:	60
4.4.1 Determinación de actividad endo-glucanasa en Guishe	61
4.4.2 Modelado con Luederking y Piret de la actividad endo-glucanasa en Guishe.	62
4.4.3. Cuantificación de la actividad exo-glucanasa en guishe (S1)	65
4.4.4 Modelado con Luederking y Piret de la actividad exo-glucanasa en Guishe.	66
4.4.6 Cuantificación de la actividad exo-glucanasa en bagazo de uva (S2)	68
4.4.7 Modelado con Luederking y Piret de la actividad exo-glucanasa en S2	69
4.4.7 Parámetros cinéticos de la actividad exo-glucanasa en bagazo de uva (S2)	71
4.4.8. Cuantificación de la actividad endo-glucanasa en bagazo de uva (S2)	72
4.4.10. Modelado con Luederking y Piret de la actividad endo-glucanasa en S2	73
4.4.11 Parámetros cinéticos:	75
4.4.11.1 cinética de formación de biomasa usando guishe:	75
4.5. Análisis estadístico	79
4.5.1. Optimización de la producción de la enzima celulasa mediante FMS en al menos un sustrato. Actividad exo-glucanasa en guishe	79
4.5.2. Optimización de la producción de la enzima celulasa mediante FMS en al menos un sustrato Actividad endo-glucanasa en guishe	81
4.5.3. Optimización de la producción de la enzima celulasa mediante FMS en al menos un sustrato Actividad exo-glucanasa en bagazo de uva	83
4.5.4. Optimización de la producción de la enzima celulasa mediante FMS en al menos un sustrato Actividad endo-glucanasa en bagazo de uva	85
Etapa V	
3.6 Caracterización físico-química del material degradado obtenido por FMS	87
Etapa VI.	
4.6 Digestibilidad in vitro de sustratos:	91
5.0 Conclusiones	94
6.0. Referencias bibliográficas	96

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Nivel de aprovechamiento de diferentes plantas de zonas áridas y semiáridas de Coahuila.	5
Cuadro 2. Estudio comparativo de análisis proximal de cuatro variedades de nopal (datos en % en base a materia seca) (Vásquez, 2008).	6
Cuadro 3. Promedios anuales de la composición química y digestibilidad in situ de la materia orgánica de arbustivas nativas que crecen en el norte de México. (Gómez, 2012).	10
Cuadro 4. Composición del medio Czapek-Dox	31
Cuadro 5. Contenido del medio de cultivo Czapeck	34
Cuadro 6. Cantidad de empaque empleada en cada fermentación	36
Cuadro 7. Cantidad de fuente de nitrógeno empleada en cada fermentación	36
Cuadro 8. Humedad para crecimiento del microorganismo en columna	37
Cuadro 9. Relación de buffer extracción y soporte fermentado	39
Cuadro 10. Condiciones de las diferentes fermentaciones en medio solido	40
Cuadro 11. Reactivos utilizados en la solución buffer	45
Cuadro 12. Descripción macro- y microscópica de las cepas aisladas de material vegetal del semi-desierto de Coahuila.	48
Cuadro 13. Velocidades específicas de crecimiento de las cepas M4 y M5 en PDA.	52
Cuadro 15. Análisis proximal de la materia prima empleada como soporte para la FMS	53
Cuadro 16. Determinación de Aw en la materia prima empleada como soporte	54
Cuadro 17. Velocidades específicas de crecimiento de las diferentes cepas empleando guishe como sustrato	56
Cuadro 18. Velocidades específicas de crecimiento de las diferentes cepas empleando bagazo de uva como sustrato	59
Cuadro 19. parámetros cinéticos de la actividad endo-glucanasa en Guishe.	65
Cuadro 20. Parámetros cinéticos de la actividad exoglucanasa en bagazo de uva	71
Cuadro 22. Velocidades específicas de crecimiento de la cepa M4 Sobre guishe en FMS	77
Cuadro 23. Velocidades específicas de crecimiento de la cepa M4 sobre uva en FMS	79
Cuadro 24. Análisis de varianza para actividad exo-glucanasa en guishe.	80
Cuadro 25. Optimización de parámetros de parámetros para producción de exoglucanasas en guishe	81
Cuadro 26. Análisis de varianza para actividad endoglucanasas en guishe	82
Cuadro 27 Optimización de parámetros de parámetros para producción de endoglucanasa en guishe	83
Cuadro 28. Análisis de varianza para actividad exoglucanasas en bagazo de uva	84
Cuadro 29 Optimización de parámetros de parámetros para producción de exoglucanasa bagazo de uva.	85
Cuadro 30. Análisis de varianza para actividad endoglucanasas en bagazo de uva	86
Cuadro 31. Optimización de parámetros para producción de endo-glucanasa en bagazo de uva	87
Cuadro 32. Análisis de fibra de guishe después de la FMS	88
Cuadro 33. Análisis de fibra en bagazo de uva en %	90

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura principal de la celulosa (Fengel et., 1984)	14
Figura 2. Monómeros precursores de la hemicelulosa. (Ozcan, 2001)	15
Figura 3. Sistemas enzimáticos para la degradación de celulosa.	16
Figura 4. Conteo de esporas para preparación de inóculo	35
Figura 5. Montaje y preparado de las columnas de vidrio para FMS	38
Figura 6. Crecimiento radial de la cepa M4 en PDA a 30 C.	7
Figura 7. Crecimiento radial de la cepa M5 en PDA a 30 C.	7
Figura 8. Crecimiento radial de la cepa M4 sobre guishe empleando 3 tamaños de partícula	55
Figura 9. Crecimiento radial de la cepa M5 sobre guishe empleando 3 tamaños de partícula	56
Figura 10. Crecimiento radial de la cepa M4 sobre bagazo de uva empleando 3 tamaños de partícula	58
Figura 11. Modelado de la actividad endo-glucanasa fermentación "A"	62
Figura 12. Modelado de la actividad endo-glucanasa fermentación "B"	62
Figura 13. Modelado de la actividad endo-glucanasa fermentación "C"	63
Figura 14. Modelado de la actividad endo-glucanasa fermentación "D"	63
Figura 15. Modelado de la actividad endo-glucanasa fermentación "E"	63
Figura 16. Modelado de la actividad endo-glucanasa fermentación "F"	63
Figura 17. Modelado de la actividad endo-glucanasa fermentación "G"	63
Figura 18. Modelado de la actividad endo-glucanasa fermentación "H"	63
Figura 19. Modelado de la actividad endo-glucanasa fermentación "I"	64
Figura 19. Actividad exo-glucanasa en cada una de las fermentaciones realizadas	66
Figura 20. Modelado de la actividad exo-glucanasa fermentación "A"	66
Figura 21. Modelado de la actividad exo-glucanasa fermentación "B"	66
Figura 22. Modelado de la actividad exo-glucanasa fermentación "C"	67
Figura 23. Modelado de la actividad exo-glucanasa fermentación "D"	67
Figura 24. Modelado de la actividad exo-glucanasa fermentación "E"	67
Figura 25. Modelado de la actividad exo-glucanasa fermentación "F"	67
Figura 26. Modelado de la actividad exo-glucanasa fermentación "G"	67
Figura 26. Modelado de la actividad exo-glucanasa fermentación "H"	67
Figura 27. Modelado de la actividad exo-glucanasa fermentación "I"	68
Figura 28. Actividad exo-glucanasa en bagazo de uva.	68
Figura 29. Modelado de la actividad exo-glucanasa fermentación "A"	69
Figura 30. Modelado de la actividad exo-glucanasa fermentación "B"	69
Figura 31. Modelado de la actividad exo-glucanasa fermentación "C"	69
Figura 32. Modelado de la actividad exo-glucanasa fermentación "D"	69
Figura 33. Modelado de la actividad exo-glucanasa fermentación "E"	70
Figura 34. Modelado de la actividad exo-glucanasa fermentación "F"	70
Figura 35. Modelado de la actividad exo-glucanasa fermentación "G"	70
Figura 36. Modelado de la actividad exo-glucanasa fermentación "H"	70
Figura 37. Modelado de la actividad exo-glucanasa fermentación "I"	70
Figura 38. Actividad endoglucanasa en bagazo de uva	73
Figura 39. Modelado de la actividad endo-glucanasa fermentación "A"	74
Figura 40. Modelado de la actividad endo-glucanasa fermentación "B"	74
Figura 41. Modelado de la actividad endo-glucanasa fermentación "C"	74
Figura 42. Modelado de la actividad endo-glucanasa fermentación "D"	74

Figura 43. Modelado de la actividad endo-glucanasa fermentación “E”	74
Figura 44. Modelado de la actividad endo-glucanasa fermentación “F”	74
Figura 45. Modelado de la actividad endo-glucanasa fermentación “G”	75
Figura 46. Modelado de la actividad endo-glucanasa fermentación “H”	75
Figura 47. Modelado de la actividad endo-glucanasa fermentación “I”	75
Figura 48. Cinética de formación de biomasa empleando guishe como Soporte en FMS	76
Figura 49. Cinética de formación de biomasa empleando bagazo de uva Como soporte en FMS.	78
Figura 50. Actividad exo-glucanasa en guishe	80
Figura 51. Proporción de los factores en la actividad endoglucanasa	82
Figura 52. Proporción de los factores en la actividad exoglucanasa	84
Figura 53. Proporción de los factores en la actividad endoglucanasa en bagazo de uva	86
Figura 54. Análsis de fibra cruda en Guishe. En un control 24 y 96 horas respectivamente	89
Figura 55. Cuantificación de fibra cruda en guishe fermentado a diferentes tiempos.	91
Figura 56. Cinética de digestibilidad in vitro de sustratos empleados en la FMS	92

RESUMEN

POR:

GUSTAVO LOPEZ GUARIN

DOCTORADO EN CIENCIAS EN ZOOTECNIA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

Dr. Mario Alberto Cruz Hernández –Asesor-

Palabras clave: Enzimas, Fermentación, Agave sp; Opuntia sp; Rumiantes

Las implicaciones de cualquier sistema de explotación pecuaria deben ser parte de un plan que busque la mejora de todas sus áreas. La alimentación es una de las más importantes, en ella está basada toda la estructura de producción. Una nutrición adecuada con lleva a una ganancia de peso, mejora la fertilidad, y baja la incidencia de enfermedades. La utilización de forrajes y granos de calidad es parte importante de todo esto, en los últimos años los precios de cada uno de los insumos han ido en aumento, bajando la rentabilidad de las explotaciones tanto como pequeñas y de gran escala. Por ello en la presente investigación se utilizaron tres sustratos (guishe, bagazo de uva y nopal) que fueron sometidos a una fermentación en medio sólido para poder ser utilizados en dietas para rumiantes. El trabajo se divide en: etapa 1. Aislamiento y caracterización de hongos filamentosos aislados del semi desierto de Coahuila. Etapa 2. Caracterización fisico-química de la materia prima. Etapa 3. Producción de la enzima celulasa mediante FMS. Etapa 4. Cuantificación de la enzima producida mediante FMS. Etapa 5. Optimización de la producción de la enzima celulasa mediante FMS en al menos un sustrato. Etapa 6. Caracterización química del material degradado obtenido de la FMS. Etapa 7. Digestibilidad in vitro de sustratos empleados en la FMS. Los resultados obtenidos muestran que se aislaron 7 tipos de microorganismos. De los cuales M4 y M5, presentaron una mayor velocidad de crecimiento en PDA y sobre el sustrato como fuente de carbono. M4 0.1067 cm/h y M5 0.0998 cm/h. seleccionando a M4 para la inoculación en FMS. El análisis de fibra cruda muestra un 36% para guishe y 19.73% para bagazo de uva. Una actividad de agua (Aw) de 0.530, 0.547 y 0.553 para guishe, bagazo de uva y nopal respectivamente. Se utilizó un diseño de Taguchi L9 de 4 factores con 3 niveles. Para la optimización de las mejores condiciones para producir la enzima celulasa, se cuantifico la actividad endoglucanasas y exo-glucanasas para cada sustrato y además se sometieron los datos experimentales al modelo de Luederking y Piret. En guishe la μ_{Max} 0.0145 cm/h y la formación de producto 1034.7529 U. y la producción de biomasa 0.0095 g/h. en el bagazo de uva la mayor formación de producto fue de 836.8022 U y la formación de biomasa de 0.0108 g/h. en la optimización de las mejores condiciones se obtuvo lo siguiente: para la actividad exoglucanasa en guishe, aire de 0.8 L/min, tamiz 0.5 cm, C:N 24

g/L, empaque de 80 g/L. para la actividad endoglucanasa en guishe aire 0.4 tamiz de 5cm, C:N 16 g/L, y empaque de 60 g/L. por otro lado el bagazo de uva en la actividad exoglucanasa, aire de 0.8 L/min, tamiz de 0.5 cm, C:N de 24g/L, y empaque de 80 gr. En ambos casos la aireación, que ayuda a regular los aumentos de temperatura provocada por el metabolismo de los microorganismos y la relación C:N que está directamente relacionada con la disponibilidad de nutrientes muestran un alto porcentaje de contribución durante la fermentación. la presencia de fibra en los sustratos después de 24 horas es de 26.08% y a las 96 horas es de 43.83 % en bagazo de uva. 46.19 % y 60.79% a las 24 y 96 horas respectivamente en guishe. Esto debido al grado de lignificación lo cual coincide con la digestibilidad invitro realizada mostrando un 33% para guishe y 83 % para bagazo de uva debido a sus carbohidratos solubles. La FMS es una alternativa para aprovechar residuos agroindustriales como lo son el guishe y el bagazo de uva. A través de la FMS se pueden obtener celulasas de gran utilidad a nivel industrial. La producción de celulasa se puede llevar a cabo factiblemente en bagazo de uva y guishe que mediante modelos matemáticos y la optimización se pueden establecer parámetros que ayuden a eficientar el uso de estos tipos de sustratos en la alimentación de rumiantes.

ABSTRACT

POR:

GUSTAVO LOPEZ GUARIN

DOCTORADO EN CIENCIAS EN ZOOTECNIA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

Dr. Mario Alberto Cruz Hernández–Asesor-

Key words: Enzymes, Fermentation, *Agave lechuguilla*, *Opuntia sp.*, Ruminants

The implications of any livestock exploitation system should be part of a plan that seeks to improve all of its areas. Food is one of the most important, it is based on the entire production structure. Adequate nutrition leads to weight gain, improves fertility, and lowers the incidence of diseases. The use of fodder and grains of quality is an important part of all this, in recent years the prices of each of the inputs have been increasing, lowering the profitability of farms. Therefore, in the present investigation, three substrates were used (guishe, grape bagasse and nopal) that were subjected to a fermentation in solid medium to be used in diets for ruminants. The work is divided into: stage 1. Isolation and characterization of filamentous fungi isolated from the semi-desert of Coahuila. Stage 2. Physical-chemical characterization of the raw material. Stage 3. Production of the cellulase enzyme by FMS. Stage 4. Quantification of the enzyme produced by FMS. Step 5. Optimization of cellulase enzyme production by FMS in at least one substrate. Stage 6. Chemical characterization of the degraded material obtained from the FMS. Stage 7. In vitro digestibility of substrates used in the FMS. The results obtained show that 7 types of microorganisms were isolated. Of which M4 and M5, showed a higher growth rate in PDA and on the substrate as a carbon source. M4 0.1067 cm / h and M5 0.0998 cm / h. selecting M4 for inoculation in FMS. Raw fiber analysis shows 36% for guishe and 19.73% for grape bagasse. An activity of water (A_w) of 0.530, 0.547 and 0.553 for guishe, bagasse of grape and nopal respectively. for the statistical analysis we used a Taguchi L9 4-factor design with 3 levels. To optimize the best conditions to produce the cellulase enzyme, the endo-glucanase and exo-glucanase activity was quantified for each substrate and the experimental data were also subjected to the Luederking and Piret model. In guishe the μ_{Max} 0.0145 cm / h and the product formation 1034.7529 U. and the biomass production 0.0095 g / h. in the grape bagasse the highest product formation was 836.8022 U and the biomass formation of 0.0108 g / h. in the optimization of the best conditions the following was obtained: for the exoglucanase activity in guishe, air of 0.8 L / min, sieve 0.5 cm, C: N 24 g / L, packing of 80 g / L. for the endoglucanase activity in air guishe 0.4 sieve of 5cm, C: N 16 g / L, and packing of 60 g / L. on the other hand the grape

bagasse in the exoglucanase activity, air of 0.8 L / min, sieve of 0.5 cm, C: N of 24 g / L, and packing of 80 gr. In both cases, aeration, which helps to regulate temperature increases caused by the metabolism of microorganisms and the C: N ratio that is directly related to the availability of nutrients, shows a high percentage of contribution during fermentation. The presence of fiber in the substrates after 24 hours is 26.08% and at 96 hours it is 43.83% in grape bagasse. 46.19% and 60.79% at 24 and 96 hours respectively in Guishe. This is due to the degree of lignification which coincides with the invitro digestibility carried out, showing 33% for guishe and 83% for grape bagasse due to its soluble carbohydrates. The FMS is an alternative to take advantage of agroindustrial waste such as guishe and grape bagasse. Through the FMS can be obtained cellulases of great utility at industrial level. The production of cellulase can be carried out feasibly in bagasse of grapes and stews that by means of mathematical models and optimization can be established parameters that help to make efficient the use of these types of substrates in the feed of ruminants.

I. INTRODUCCIÓN

En cualquier sistema de producción pecuaria bajo condiciones de estabulación, la alimentación de los animales representa del 70 al 80 % de los costos totales de producción. La zona norte del país se dedica a la producción masiva de carne de bovino y caprino para abasto y exportación. Por lo tanto, se ha hecho imperante contar con ingredientes alternativos que permitan abaratar los costos de producción y nuevas tecnologías que puedan ser implementadas para el mismo objetivo. Con respecto a lo anterior existen ingredientes que ya forman parte de la alimentación de rumiantes pero que, sin embargo, la mayoría de ellos necesita mejorar su valor nutricional, ayudados por nuevas tecnologías como por ejemplo el uso de enzimas, aditivos, fermentación en estado sólido y líquido, etc.

El afán permanente por la disminución de costos de producción, el mejoramiento en la calidad de los productos y la búsqueda de una mejor eficiencia en la utilización de insumos, así como en una mejor eficacia alimenticia, para lograr finalmente una competitividad comercial, han llevado a buscar alternativas permanentes en la alimentación y nutrición animal.

Se conoce que en el norte de México la mayoría de los estados cuentan con clima seco. Según la clasificación climática de Köppen, este tipo de clima se caracteriza por tener precipitaciones escasas e irregulares. Los veranos son calientes con escasas de lluvias y los inviernos muy fríos (Inzunza, 2005); esto da como consecuencia que en verano la producción de forraje no sea suficiente para el mantenimiento de los animales (rumiantes) o llegue a ser precaria en nutrimentos y en los meses de invierno no cuenten con alimento que satisfaga sus necesidades y por lo tanto exista una merma en la producción, incluso una gran pérdida de animales, lo que ocasiona un desequilibrio económico para los productores.

Es de suma importancia contar con alimentos alternativos, transformados biotecnológicamente para que posean las cualidades alimenticias que requieren los animales para su mantenimiento y producción. Tal es el caso del nopal (*Opuntia* sp), el maguey (*Agave* sp.) el mezquite (*Prosopis glandulosa*), la lechuguilla (*Agave lechuguilla*), la candelilla (*Euphorbia*

antisyphilitica), la jojoba (*Simmondsia chinensis*) y una larga lista de especies que representan una opción para alimentación de animales.

1.1. Justificación

A lo largo de los años y desde la implementación de la estabulación de los animales como sistema de producción los productores han buscado la máxima rentabilidad de sus explotaciones así sean pequeñas o de grandes dimensiones. Uno de los factores que afecta dicha rentabilidad es el uso correcto de fibra y proteína, resultando esta última la de más alto costo. Por ello en esta investigación se ha desarrollado un método que mediante fermentación en medio sólido hidroliza diferentes sustratos de tal manera que aumente la cantidad de fibra disponible, con llevando al rumiante a que eficiente la energía y por ende mejore su rendimiento. Además, que el aprovechamiento de residuos o sustratos como el guishe, bagazo de uva y nopal reducen los problemas de falta de uso comercial y con estudios y procesos adecuados se podrá dar un valor agregado puesto que los sustratos hidrolizados mediante enzimas celulolíticas representan una alternativa para alimentación de rumiantes en tiempos de sequía.

1.2. Objetivo general

Determinar y cuantificar el efecto de la hidrólisis mediante fermentación en medio sólido de tres sustratos (guishe, el bagazo de uva y el nopal) para su incorporación como forraje en dietas de rumiantes.

1.2.1. Objetivos específicos

- Aislar y caracterizar hongos filamentosos del semi-desierto de Coahuila
- Caracterizar químicamente la materia prima (Agave lechuguilla, *Opuntia ficus indica*, bagazo de uva).
- Producir mediante FMS la enzima celulasa empleando la materia prima como soporte.

- Cuantificar la enzima celulasa producida mediante FMS empleando al menos un sustrato (materia prima seleccionada)
- Optimizar los parámetros para la producción de celulasa en al menos un sustrato.
- Caracterizar químicamente el material degradado obtenido de la FMS
- Realizar una prueba de digestibilidad in vitro de los soportes empleados en la FMS.

1.3. Hipótesis

Aspergillus spp. es capaz de producir enzimas celulolíticas capaces de hidrolizar guishe, bagazo de uva y nopal mediante FMS para su incorporación como forraje hidrolizado en dietas para rumiantes.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Plantas de zonas áridas y semiáridas de México:

La vegetación de las zonas áridas está íntimamente entrelazada con las comunidades rurales, estas aportan sustento a las familias que se encuentran en tales lugares. Existen diferentes niveles de aprovechamiento (Cuadro 1), donde resaltan las siguientes formas

Cuadro. 1. Nivel de aprovechamiento de diferentes plantas de zonas áridas y semiáridas de Coahuila.

Nivel de aprovechamiento	Uso	Ejemplo	Referencia
Directo	Alimento, forraje, ornamental	Nopal	Flores, 2009
Medicinal	Tallos de vara dulce, diuréticos	Eysenhardia polystachya	Guevara, 2008
Mínima transformación	Extracción de fibras	Guishe	Siller, 2014
Procesado	Procesado de candelilla	Cera de candelilla,	Ochoa, 2010
Procesado e industrializado	Saponinas, sapogeninas	Agave lechuguilla	Agüero, 2000

Según la secretaria del medio ambiente, recursos naturales, y pesca (Semarnap) los tipos de vegetación que se presentan en dichas zonas son:

2.1.1 Opuntia spp: Los usos del nopal son muy diversos, así como diversas son sus especies; en toda explotación ganadera sin importar el tamaño o la

capacidad de esta, la alimentación ocupa una buena parte de la inversión o de los gastos de mantenimiento, por tal motivo, Aranda et al., (2008) realizaron un estudio donde se incluyeron en un 15 a 30% nopal picado (en base a peso seco) en dietas para ovinos disminuyendo los costos de producción de un 48 a 65%.

El contenido nutricional de cladodios puede variar dependiendo de la especie utilizada y del manejo de la plantación (cuadro 2); sin embargo, como su contenido de proteína es bajo, su eficiencia radica en la cantidad de agua presente en sus pencas que va de un 85 a 90%. Dado que las zonas áridas son escasas en agua estas representan un sustento importante.

Cuadro 2. Estudio comparativo de análisis proximal de cuatro variedades de nopal (datos en % en base a materia seca) (Vásquez, 2008).

Especie	MS	MO	PC	GC	Fibra	Ceniza	ELN
<i>Opuntia ficus indica</i>	11.29	86.93	3.81	1.38	7.62	13.07	74.13
<i>Opuntia rastrera</i>	14.41	59.89	2.78	0.76	6.18	40.11	43.23
<i>Opuntia robusta</i>	10.38	81.41	4.43	1.73	17.63	18.59	57.61
<i>Opuntia lindelheimeri</i>	11.57	74.51	4.15	1.03	3.02	25.5	66.25

MS=materia seca, MO=materia orgánica, PC=proteína cruda, GC=grasa cruda, ELN=extracto libre de nitrógeno.

Debido a que el género *Opuntia* se ha adaptado a climas extremos y ha transformado sus hojas por espinas, en lugares como México, Brasil y Norte de África se ha optado por la utilización de variedades que están desprovistas de estas o que por lo menos su desarrollo no es tan prolongado, tal es el caso de *Opuntia ficus indica*. Lo cual beneficia su cultivo y manejo además se reducen los problemas gastrointestinales y de abscesos en la boca de animales por ingestión de espinas (Guevara et al., 2009).

Blanco (2010) estudió pencas de nopal obtenidas de cultivos de la región de las Auras, Zacatecas; encontrando que las pencas de nopal de 8-10 meses

de edad presentaron mayores rendimientos en obtención de harina de nopal por unidad de peso. En un estudio realizado por Mejía (2011) se alimentaron 20 corderos destetados con peso promedio de 17 kilogramos, distribuidos en dos grupos a los cuales se les proporciono un bloque multinutricional (BM) con un 25% de inclusión de nopal, midiendo consumo de BM y peso de los corderos. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P > 0.5$) en los pesos de los animales. Sin embargo, Mejía y Mejía en el 2010 señalan que el nopal deshidratado utilizado en concentraciones de 20 a 30 % y 40% de la dieta de ovinos en engorda producen ganancias diarias de peso superiores a dietas que están elaboradas a base de grano y subproductos de fácil fermentación como la melaza, pulpa de cítricos, subproductos de cítricos, los cuales han sido aprovechados muchos años en Cuba y actualmente han tenido una aceptación en México.

2.1.2. *Agave spp*: Las especies de agaves han cobrado importancia sobre todo en zonas áridas y semiáridas de México debido a sus propiedades y sus diferentes usos que puede llegar a tener, donde resaltan las bebidas, forraje y alimentos. Existen divergencias en cuanto a la posición taxonómica del maguey, la taxonomía común lo ubica en familia *Amaryllidaceae*, subfamilia *Agavoideae* y comprende 275 especies (García, 2010).

El empleo de agaves en la alimentación de rumiantes ha tomado un alto grado de importancia porque reduce el consumo de agua, debido al alto contenido de humedad, minerales y fibra cruda en sus pencas, que tradicionalmente se combinan con melaza o residuos de cosecha, abaratando de este modo los costos de alimentación. Silos *et al.*, (2005) determinaron por electroforesis que los niveles de Ca, Mg, Zn, Fe y Cu, en pencas de maguey son los óptimos y que satisfacen las necesidades nutrimentales de ganado lechero siempre y cuando se utilicen una dieta balanceada para poder tener una digestibilidad del maguey arriba del 80%. De acuerdo con (Pinos-Rodríguez, 2008). En el *Agave salmiana* las hojas son una buena fuente de carbohidratos solubles, sin embargo tiene bajos contenidos de proteína a lo cual se recomienda un enriquecimiento proteico. En estudios anteriores (Zamudio, 2009) establece que la combinación de Agave-Alfalfa, mejora la calidad nutricional, la digestibilidad ruminal, que

vierten sus resultados en el desempeño y la ganancia de peso del animal. Por otra parte, Ramírez (2012) realizó una valorización de la digestibilidad del bagazo de Agave, tratado con hidróxido de calcio Ca(OH)_2 al 10%, en un reactor de vidrio de 50L; dando como resultado el aumento de la digestibilidad de 36% (bagazo no tratado) a 54.5% con el tratamiento de hidróxido de calcio.

2.1.3. *Prosopis spp.*: (Corona, 2011) realizó Un análisis químico proximal de vainas de mezquite en árboles podados y no podados en 6 etapas de fructificación fueron analizados con un diseño completamente al azar con dos factores (fecha y tipo de árbol). El resultado de este trabajo muestra que los árboles podados tienen más elementos nutritivos en relación directa con la maduración. Se pueden colectar vainas entre 10 y 20 días para proteína, para fibra cruda de 40 a 50 días y para grasa y carbohidratos después de los 50 días (Corona, 2011). Por otra parte, Freyre (2010) dirigió una investigación donde se estudió la presencia de diferentes nutrientes en las semillas de *Prosopis ruscifolia*. El análisis de la información generada en este trabajo indica que son ricas en proteínas (354,8 g/ kg) presentando importantes valores del aminoácido lisina, así como poseen un importante nivel de fibra dietética (548 g/kg) constituida mayoritariamente por galactomananos, el contenido lipídico aproximado a 50 g/kg está caracterizado por una importante insaturación con predominio de ácido linoleico; y aportan buenos niveles de hierro (49,3 $\mu\text{g/g}$) y otros micronutrientes. Los niveles de antinutrientes hallados en este estudio son semejantes a otros *Prosopis*, o mejor aún resultan inferiores a otras leguminosas.

2.1.4. *Acacia subangulata*: Las hojas, vainas, flores y vástagos se emplean como forraje para ganado vacuno y caprino, especialmente durante el invierno. El follaje y la corteza tienen un olor desagradable y se dice que pasa un mal sabor a la leche. Debido a su altura es necesario hacer cortes de rama para su máximo aprovechamiento (Rojas, 2012). Ruiz *et. al* (2008) evaluaron las características nutricionales de la dieta del ganado caprino en época de sequía se determinaron los principales componentes de la misma y sus características. Por otro lado, se evaluaron diferentes recursos vegetales

de la zona, determinando sus propiedades bromatológicas con el objetivo de analizar su uso potencial como complemento alimenticio.

2.1.5. *Flouresia cernua*: La existencia de plantas que tienen dentro de sus propiedades funciones farmacológicas son de gran importancia en las comunidades con bajos recursos económicos. *Flouresia cernua* se caracteriza por ser una planta que se distribuye en el norte de México y sur de Estados Unidos usado comúnmente como infusión para tratamiento de diarreas y disentería (Estrada, 2006). Pruebas realizadas por Molina, 2006, muestran efecto bactericida contra cepas de *Mycobacterium tuberculosis*. Por otro lado se ha descrito toxicidad crónica, específicamente hepatotoxicidad, en un grupo de ovejas hembra alimentado con alfalfa y un complemento de *F. cernua* en un periodo de 120 días. Además de la toxicidad crónica, se registró la muerte de tres miembros de dicho grupo.

2.1.6. *Parthenium incanum*: El departamento de agricultura de los estados unidos, (2010) la considera como una planta tolerable a la sequía que puede ser utilizada como complemento de alimento en épocas de escasas de forraje en el ganado caprino y también en el ganado bovino. Tiene una producción promedio de 480 kg con 1200 plantas/Ha. Se adapta a suelos con textura franco-arenosa, es tolerante a la salinidad y a suelos con pH de 7.8 y 8.29, se desarrolla fácilmente en regiones con un rango de precipitación de 250-450 mm y en altitudes menores a los 2000 m.

2.1.7. *Agave lechuguilla*: Dentro de esta familia se encuentra el *Agave lechuguilla*, que se caracteriza por ser plantas con hojas verde amarillentas con espinas marginales; inflorescencia en forma de racimo u espiga. Esta planta representa un recurso forestal único para muchas comunidades que se ven beneficiadas con su explotación de donde se obtienen fibras para su aprovechamiento. Su aprovechamiento ha sido una actividad de subsistencia y la principal fuente de captación de ingresos económicos para los habitantes de la región ixtlera del país (Pando *et al.*, 2004). La fibra de esta planta se obtiene del cogollo, constituido por las hojas más tiernas que están agrupadas al centro de la misma, del cual se obtiene la fibra de mayor calidad y del mejor valor comercial, dado que posee menor lignificación, en

comparación con las hojas laterales. Con la finalidad de proporcionar un aprovechamiento y manejo sostenido de los recursos naturales es importante conocer el turno técnico, que se define como el tiempo necesario para que una especie llegue a su etapa óptima por la cantidad de productos extraíbles, que dependerá de diversos factores como las características de suelo, clima, de la especie, etc. (Narcia, 2012).

2.1.8 *Leucophyllum frutescens*: La producción animal en México y en muchas partes del mundo donde se dan las explotaciones pecuarias tiene el mismo problema, el estado nutricional de los animales derivado del consumo de forrajes de mala calidad nutricional. los principales factores que limitan el comportamiento productivo de los animales en pastoreo son: el bajo contenido proteico de las plantas (Cuadro 3) el bajo consumo de energía debido al alto contenido de fibra en los forrajes y las deficiencias de minerales o de vitaminas. Uno de los nutrientes más importantes para los animales en pastoreo es la proteína. Aparentemente, el nivel de proteína de 7% en un forraje se considera como conveniente para mantener la actividad de los microorganismos benéficos (bacterias, protozoarios y hongos) en el rumen del animal (Gómez, 2012).

Cuadro 3. Promedios anuales de la composición química y digestibilidad in situ de la materia orgánica de arbustivas nativas que crecen en el norte de México. (Gómez, 2012).

Arbustivas	P	F	C	H	L	T	DMO
<i>Acacia berlandieri</i>	22	34	9	8	16	23	29
<i>Acacia farnesiana</i>	21	33	8	14	14	2	59
<i>Prosopis glandulosa</i>	20	44	16	11	15	1	61
<i>Leucophyllum frutescens</i>	12	44	9	11	24	1	48
<i>Opuntia engelmannii</i>	5	39	13	24	1	0	50
<i>Larrea tridentata</i>	17	25	7	4	10	2	52
<i>Zanthoxylum fagara</i>	22	34	9	14	9	0	61

P=proteína, F=fibra, C=celulosa, H=hemicelulosa, L=lignina, T=taninos

2.1.9. Tratamiento a sustratos.

Existen numerosas tecnologías que permiten la transformación y aprovechamiento de la biomasa; desde las más simples que no requieren grandes inversiones ni recientes adelantos tecnológicos, hasta sistemas actualizados con tecnologías de punta. La diversidad y la productividad de las zonas áridas dependen de la interacción entre las limitaciones ambientales que presenta cada región en particular y el complejo de adaptaciones desarrolladas por los organismos que les permiten mantener el balance de agua y energía térmica dentro de límites viables (Villagra, 2011). Existen diversos productos y subproductos de diversas industrias que han sido empleados para la alimentación de animales; sin embargo, incorporación en dietas se ve limitada debido al bajo contenido de proteína y poca digestibilidad de la fibra debido a que sus paredes celulares tienen un alto contenido de hemicelulosa, celulosa y lignina (Cano, 2003). Por tanto, se han empleado diversos tratamientos físicos, químicos y biológicos o sus combinaciones para reducir la fibra principalmente el complejo lignocelulósico (Fahey, 1993). En un estudio desarrollado por Grilli (2015) para determinar la degradación y utilización de la hemicelulosa contenida en diferentes forrajes por dos cepas bacterianas (*P. xylanivorans* 2 y *P. ruminis* 153), aisladas del rumen de caprinos Criollos. El cultivo de las cepas puras fue desarrollado hasta evidenciar la fermentación completa del heno de alfalfa y de diversas forrajeras nativas. Los resultados mostraron que *A. lampa* evidenció el máximo valor de degradación y utilización de la hemicelulosa y *M. ephedroides* y *G. decorticans* fueron las forrajeras nativas con el menor valor de degradación, en comparación con el heno de alfalfa. Estos resultados proporcionan un marco para intentar modificar la actividad hemicelulolítica del ambiente ruminal, mediante la incorporación de *P. xylanivorans* como cepa probiótica.

2.2. Fermentación en medio sólido

Existen numerosas tecnologías que permiten la transformación y aprovechamiento de la biomasa; desde las más simples que no requieren

grandes inversiones ni recientes adelantos tecnológicos, hasta sistemas actualizados con tecnologías de punta.

La biomasa residual originada de residuos agrícolas, forestales, urbanos está compuesta principalmente de hidratos de carbono principalmente celulosa, hemicelulosa, almidón, glucosa o fructosa (Carrasco, 1996). Se estima que, aproximadamente 4×10^9 toneladas de celulosa se forman anualmente (Aro et al., 2005). Esta gran cantidad no se acumula sobre la tierra gracias a la acción de bacterias y hongos, capaces de degradar con eficiencia estos materiales reciclando carbono de los ecosistemas. Los hongos filamentosos secretan un conjunto de enzimas capaces de atacar estos componentes de la pared celular vegetal, las cuales son potentes catalizadores, produciendo una aceleración en las reacciones del orden de 10^{17} veces. Estas enzimas han recibido una gran atención debido a su potencial de aplicación en la bioclarificación de productos textiles (celulasas), suavizante de tejidos y blanqueamiento del papel (xilanasas), clarificación e incremento de extracción de pulpa (pectinasas), (Bhat 1997; de Vries et al., 2001; Buchert et al., 1998; Penttilä et al., 2003; Galante et al., 1998) y la conversión de biomasa vegetal en azúcares fermentables, que podrían ser empleados en la producción de productos químicos y combustibles. El mercado mundial de enzimas industriales fue valorado en \$ 3.1 mil millones en 2009 y alcanzó cerca de \$ 3.6 mil millones en 2010, las enzimas alimentarias y de bebidas representan el mayor segmento de la industria de las enzimas industriales con unos ingresos de casi \$ 1,2 mil millones en 2010 (Bharatbook).

En México la principal empresa productora es Enmex, S.A de C.V, que produce y distribuye la mayor parte de las enzimas de aplicación masiva. Conforme sucedieron los avances en los métodos de producción y en la modificación genética para la optimización de su obtención, la producción de enzimas en México fue disminuyendo convirtiéndose en mayor parte un mercado de importación, dándose a conocer en el año 2001 un mercado de 46.8 millones de dólares en este sector (Secretaría de Economía con información del Banco de México).

La fermentación en estado sólido consiste en el crecimiento de microorganismos sobre partículas sólidas en ausencia de agua libre en el sistema. El agua se encuentra ligada de una forma compleja a la matriz sólida, ya sea absorbida en la superficie de las partículas o atrapada dentro de la región capilar del sólido (Moo-Young, 1983). Cuando los microorganismos son aerobios es necesario alimentar al sistema con un determinado flujo de aire, el cual, además de suministrar el oxígeno necesario contrarresta el incremento de temperatura que se produce por la generación de calor metabólico. De esta forma se garantiza que las condiciones de operación sean más adecuadas para el crecimiento del cultivo. No obstante, la extracción de calor metabólico puede convertirse en un problema serio cuando se trabaja a escala de producción, la velocidad de crecimiento de los microorganismos es menor que en la fermentación sumergida y su aplicación se encuentra limitada a microorganismos (fundamentalmente hongos) que pueden desarrollarse en ambientes de baja humedad (Gutiérrez, 1995).

La fermentación en estado sólido es una alternativa económica para el tratamiento de residuos orgánicos sólidos, pues no se originan cantidades importantes de desechos líquidos ni sólidos y el producto total puede ser aprovechado como acondicionador de suelos. Por otra parte, este tipo de proceso puede ser empleado para elevar el contenido de proteína en sólidos orgánicos que se utilizan como fuente de alimento animal, de manera que constituye una vía alterna para el empleo de fuentes más económicas que las tradicionales (Valino, 1996). Una de las dificultades que presenta el proceso de fermentación en estado sólido está dada por el hecho de que, generalmente, no se disponen de ecuaciones preestablecidas que permitan llevar los resultados de nivel de laboratorio a una escala industrial, lo cual se debe a la complejidad de los fenómenos involucrados, relacionados con los procesos biológicos que ocurren, la generación del calor metabólico y los procesos de transporte de energía y masa que tienen lugar en el sistema. Por tal motivo resulta importante disponer de un procedimiento de cálculo que permita describir matemáticamente este tipo de proceso de trans-

formación como base para la predicción de las condiciones de operación para la escala de producción.

2.2.1. Características estructurales de la celulosa

Los materiales lignocelulósicos están constituidos por celulosa, hemicelulosa y lignina en una relación aproximada de 4:3:3 variando sensiblemente según las diferentes especies (Fengel y Wegener, 1984; Sjöström, 1981, Misra, 1993; Oggiano, 1997) y son llamados polisacáridos de la pared celular vegetal. De éstos, la celulosa es un polisacárido insoluble que representa el componente mayoritario, seguido de la hemicelulosa que es el componente más heterogéneo y que a diferencia de la celulosa está compuesta de diferentes azúcares formando cadenas más cortas, con ramificaciones y formando poros en toda la estructura de la pared celular; y por último el xilano cuya función es asegurar protección contra la humedad y los agentes atmosféricos además de actuar como elemento aglomerante de las fibras. La celulosa de fórmula $(C_6H_{10}O_5)_n$ es un homopolímero lineal constituido por unidades de β -glucosa unidas entre sí por enlaces 1-4 (Figura 1) con un peso molecular de aproximadamente 500.000. Estas moléculas se pueden hidrolizar con dificultad en medios catalizados por ácido. Entre las principales propiedades fisicoquímicas de la celulosa se encuentran el índice o grado de polimerización (número de monómeros de azúcares del polímero), la cristalinidad y la porosidad (Sjöström, 1981; Fan et al., 1982; Blanch et al., 1983; Thonart et al., 1983). La cadena de celulosa es alargada y las unidades de glucosa están dispuestas en un solo plano debido a la presencia del anillo glicosídico y a su conformación (Fengel, 1984)

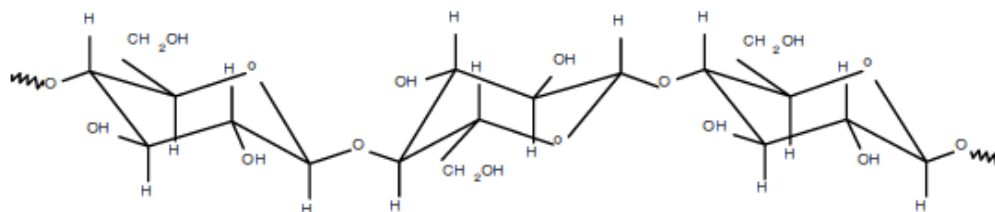


Figura 1. Estructura principal de la celulosa (Fengel et., 1984)

2.2.2. Características estructurales de la hemicelulosa

La hemicelulosa es un polímero constituido por unidades de anhidroazúcares unidas por enlaces glucosídicos, y formadas por más de un tipo de azúcar; además presentan ramificaciones y sustituciones. Los azúcares que forman las hemicelulosas se pueden dividir en diferentes grupos como las pentosas (xilosa, arabinosa), hexosas (glucosa, manosa, galactosa), ácidos hexurónicos (ácidos glucurónico, metilglucurónico y galacturónico) y desoxihexosas (ramnosa y fucosa) (figura 2), la cadena principal puede consistir en una sola unidad (homopolímero) como por ejemplo los xilanos o en dos o más unidades (heteropolímero) como por ejemplo los glucomananos. Su papel es contribuir a la unión entre la lignina y la celulosa. (Ozcan, 2001)

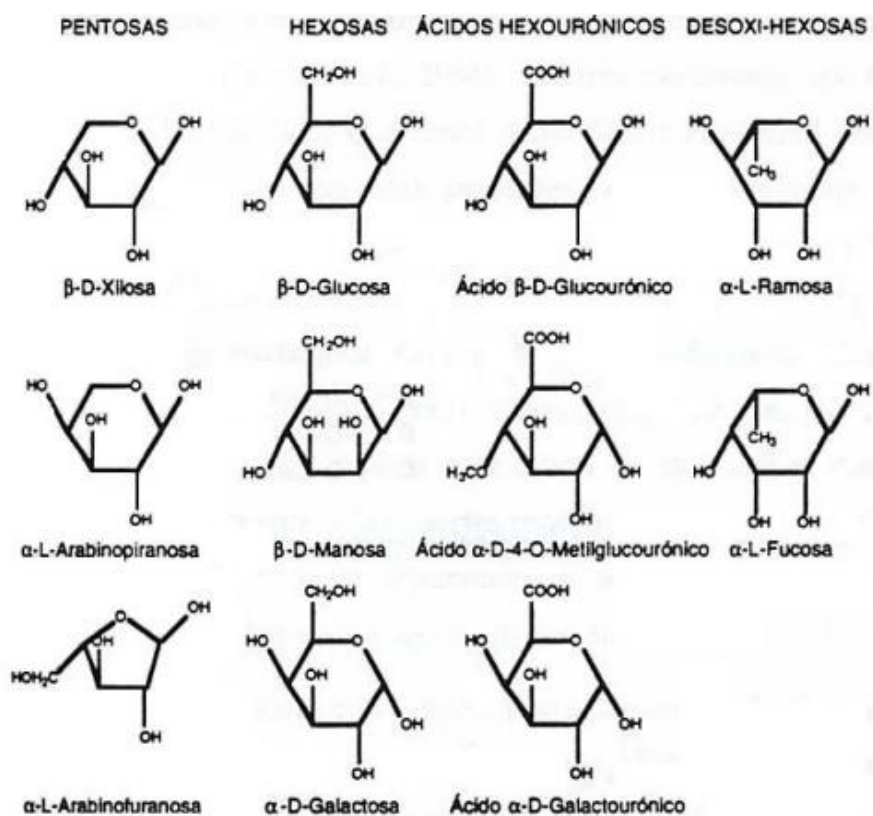


Figura 2. Monómeros precursores de la hemicelulosa. (Ozcan, 2001)

2.2.3. Biodegradación enzimática de celulosa y hemicelulosa.

Los microorganismos capaces de degradar celulosa secretan un sistema complejo de enzimas extracelulares, celulasas y xilanasas, que actúan en forma conjunta en la degradación de celulosa y hemicelulosa (figura 3). Las fibras de celulosa son degradadas esencialmente por dos tipos de sistemas enzimáticos llamados agregativos y no agregativos.

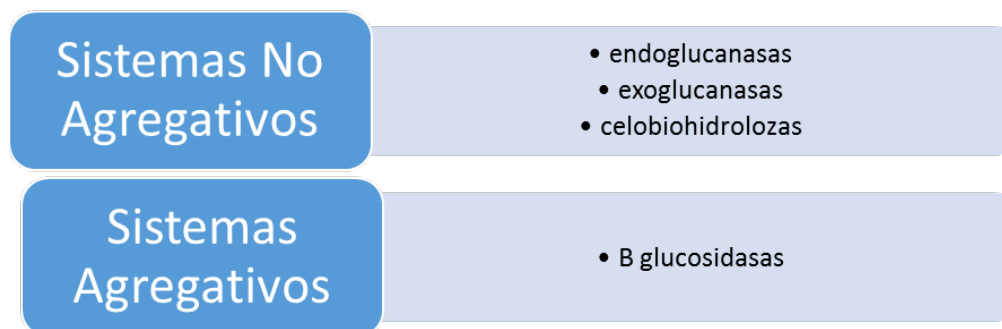


Figura 3. Sistemas enzimáticos para la degradación de celulosa.

Las cuatro clases mayoritarias de actividades enzimáticas intervienen en la biodegradación de la celulosa; endoglucanasas (EC 3.2.1.4), que hidrolizan regiones internas de la cadena celulolítica principalmente en regiones amorfas, generando celoligosacáridos; celobiohidrolasa (EC 3.2.1.91), que remueve celobiosa de las extremidades del polisacárido, incluyendo la forma cristalina; exoglucanasas (EC3.2.1.71), que libera glucosa de las extremidades reductoras, tanto de la celulosa como de los celoligosacáridos(de Vries et al.,2001; Aro et al., 2005); y b-glucosidasas (EC 3.2.2.21), las cuales hidrolizan celobiosa y celoligosacáridos a glucosa, removiendo la inhibición por producto de las otras enzimas y generando fuente de carbono de fácil metabolismo. De esta manera, los microorganismos pueden utilizar los productos generados por la hidrólisis de la celulosa

como fuente de carbono para el crecimiento (Cullen y Kersten, 1992; Pérez et al., 2002; Rabinovich et al., 2002).

2.3. Principales parámetros en FMS

El cultivo de microorganismos sobre diferentes sustratos o soportes sólidos depende de diferentes parámetros y factores ambientales como son: el tipo de microorganismo y la cantidad de inóculo; la humedad y la actividad de agua; la aireación y la transferencia de oxígeno; la regulación de la temperatura y del pH (Oriol, 1988; Lambarri, 1994). Para medir el crecimiento de los microorganismos en FMS, se puede recurrir a la respirometría, análisis de la biomasa con diferentes métodos indirectos (proteínas, quitina, ácidos nucleicos) o por la producción de diferentes metabolitos (Roche, 1993).

2.3.1 Los microorganismos y la inoculación

En los procesos de FMS se usan dos tipos de inoculantes. Primero, la microflora natural o endógena del sustrato y segundo, inoculantes controlados. En los procesos de composteo y de ensilado se prefiere la microflora natural (Perraud-Gaime, 1995), en los procesos de producción de enzimas y de alimentos fermentados se utilizan inóculos puros o inóculos mixtos. Para la producción industrial de Koji se utilizan esporas de *Aspergillus oryzae* (Pandey, 1992).

2.3.2. La actividad de agua y la humedad

El papel del agua en los procesos de FMS es múltiple. Componente dominante en la composición de la biomasa, el agua sirve además de vehículo para las enzimas y los nutrientes, además de facilitar los intercambios gaseosos (Oriol, 1987). Una humedad elevada en el sustrato causa una disminución de la porosidad del sustrato, una baja difusión de oxígeno y una alta contaminación. Al contrario, una baja humedad conduce a

un crecimiento limitado y disminuye la disponibilidad del sustrato. El aumento de la humedad y de la disponibilidad del agua causa un aumento de la tasa del crecimiento, de la producción de biomasa y de la biosíntesis de enzimas (Zadrazi, 1975).

2.3.3. La aireación y el intercambio de metabolismo

Por lo general, en los procesos de FMS se utilizan microorganismos aerobios por lo que la aireación de los medios de cultivo es de sumo interés para el desarrollo de los microorganismos, ya que permite realizar diferentes funciones:

- Aumento en oxígeno para los cultivos
- regulación de la humedad.
- regulación de la temperatura
- eliminación de metabolitos volátiles (CO₂, alcoholes)

2.3.4 La temperatura

Los hongos filamentosos que se utilizan en los procesos de FMS son por lo general mesófilos y crecen a temperaturas óptimas entre 29 y 35 °C. Sin embargo, la producción de calor metabólico durante los procesos de FMS causa un aumento importante de la temperatura y si este calor no se elimina rápidamente del medio de cultivo, puede causar el paro definitivo del crecimiento de los microorganismos (Saucedo-Castaneda, 1990). Diferentes autores proponen estrategias para la regulación de la temperatura. Frecuentemente se utiliza la aireación y la evaporación del agua para controlar automáticamente la humedad y la temperatura en los procesos de FMS. Otra estrategia consiste en utilizar microorganismos termófilos o termorresistentes.

2.3.5. La evolución del pH

Los hongos filamentosos crecen en medios ácidos y pueden tolerar importantes cambios del pH (2.5 hasta 7.5). Sin embargo, la medida del pH *in situ* durante los procesos de FMS es particularmente difícil. Para evitar una disminución importante del pH, se ha utilizado con éxito una mezcla de sulfato de amonio y de urea en el medio de cultivo como fuente de nitrógeno (Saucedo-Castañeda, 1992). Los hongos ectomicorrizicos y saprofitos, necesitan para su crecimiento pH neutros y estables (6.0 hasta 7.5). Para ello se utilizan nitratos mezclados con urea (Roussos, 1995).

2.3.6. Los microorganismos y la cantidad de inculo

La principal dificultad

que se presenta para el escalamiento de los procesos de FMS es poder disponer de una gran cantidad de inculo viable. Se han propuesto diferentes técnicas de producción y conservación de inculo, con objeto de optimizar la cantidad de inculo indispensable para la colonización uniforme y el desarrollo rápido del microorganismo en la superficie del sustrato (Roussos, 1989).

2.3.7. Sustratos empleados para la producción de enzimas en FMS

La selección de sustratos para la producción de enzimas mediante FMS depende de varios factores, principalmente los relacionados con el costo y viabilidad del mismo, por lo que puede ser factible la utilización de residuo agro industrial. En el proceso de FMS, el sustrato (sólido) no solo provee de nutrientes al cultivo microbiano para su crecimiento, sino que también sirve de soporte para las células. El sustrato que provee todas las necesidades nutritivas para el crecimiento de los microorganismos deberá ser considerado como el sustrato ideal.

Existen algunos factores que son importantes para el crecimiento microbiano y producción de enzimas como el empleo de un sustrato en particular, tamaño de partícula y nivel de humedad o actividad acuosa los cuales pueden ser críticos. Generalmente un tamaño de partícula menor en el sustrato provee mayor área superficial para el ataque microbiano, por lo

tanto, es un factor deseable. Sin embargo, un tamaño muy pequeño de sustrato puede resultar en aglutinaciones, las cuales pueden interferir con la respiración o aireación de los microorganismos, y por lo tanto en un pobre crecimiento.

2.4. Diseño del fermentador en sistemas para la reproducción de enzimas en FMS

Los Biorreactores son los equipos donde se realiza el proceso de cultivo (también comúnmente denominado “fermentador”), sea en estado sólido o líquido. Su diseño debe ser tal que asegure homogeneidad entre los componentes del sistema y condiciones óptimas para el crecimiento microbiano y la obtención del producto deseado. Es importante tomar en cuenta los problemas de transferencia de calor y oxígeno sobre la cama de sustrato, los cuales dependen de las características de la matriz que se esté utilizando para la fermentación, siendo este, uno de los principales factores que afectan el diseño y las estrategias de control.

Los criterios más importantes para el diseño de un biorreactor pueden resumirse del siguiente modo dependiendo del tipo de biorreactor y la fermentación a utilizar (Mitchell, 1992):

- El tanque debe diseñarse para que funcione asépticamente durante numerosos días, para evitar la aparición de contaminantes en las operaciones de bioprocesos de larga duración.
- Debe permitir una mayor área de contacto entre las fases biótica y abiótica del sistema, es decir, se debe proporcionar un sistema adecuado de aireación y agitación para cubrir las necesidades metabólicas de los microorganismos.
- El consumo de energía debe de ser el mínimo posible.
- Entradas para la adición de nutrientes y el control de pH.
- El crecimiento microbiano es generalmente exotérmico, por lo que, el biorreactor debe facilitar la transferencia de calor, del medio hacia

las células y viceversa, a medida que se produce el crecimiento celular, además de mantener estable la temperatura deseada.

- Mantener las células uniformemente distribuidas en todo el volumen de cultivo.
- Suministrar oxígeno a una velocidad tal que satisfaga el consumo.
- El diseño debe ser tal que permita mantener el cultivo puro; una vez que todo el sistema ha sido esterilizado y posteriormente inoculado con el microorganismo deseado.

Los biorreactores más utilizados a nivel industrial están provistos de mecanismos de agitación, dispersión y aireación, así como de sistemas para el control de la temperatura, y el pH. Los biorreactores deben ser optimizados para obtener la máxima concentración de productos de la fermentación, como lo son la biomasa microbiana y/o metabolitos en un tiempo mínimo y a menor costo de producción.

2.5. Biorreactores para FMS

La última década ha sido una de las más importantes para el desarrollo en el diseño, operación y escalamiento de biorreactores para la fermentación en medio sólido. Los tipos de biorreactores más estudiados han sido los de bandeja y los de tambor rotatorio y desde hace pocos años se han introducido un nuevo tipo de biorreactores, denominados de cama empacada o columna de lecho fijo. Algunos de los biorreactores utilizados a escala laboratorio son cajas Petri y matraces Erlenmeyer. Estos son utilizados por su simplicidad, los cuales no operan con aeración ni agitación forzada, en ellos solamente es controlada la temperatura del cuarto de incubación. Dentro de los procesos de fermentación en medio sólido existen actualmente dos categorías: a escala laboratorio en las cuales se utilizan pequeñas cantidades de medio sólido hasta pocos kilogramos, y el otro que es a escala piloto y escala industrial en donde se utilizan desde kilogramos hasta toneladas. En la primera categoría existen muchos diseños de biorreactores, los cuales llegan a ser muy sofisticados, mientras que en la

segunda categoría es poca la variedad de biorreactores utilizados, solo algunos de los biorreactores a nivel industrial pueden operar en condiciones estériles.

2.5.1. Biorreactor en columna

Uno de los más interesantes sistemas para fermentación en medio SOLIDO a nivel laboratorio fue el desarrollado y patentado por el grupo del Instituto para la Investigación y Desarrollo (*IRD*) en Francia (antes *ORSTOM*), entre 1975 y 1980, compuesto por pequeñas columnas de cuatro centímetros de diámetro y veinte centímetros de altura, el cual es llenado con un medio previamente inoculado y puesto en un termorregulador de agua. El equipo está conectado a una columna de cromatografía de gases para monitorear la producción de CO_2 , resultado de la respiración del microorganismo y de sus reacciones metabólicas. La demanda de oxígeno se cubre por medio de aeración forzada utilizando compresores con sistemas de regulación de presión para evitar la compactación excesiva del lecho. La geometría y diseño de las columnas permite que sea un equipo barato, debido a que son elaboradas a base de vidrio, por lo que la remoción del calor exotérmico de la fermentación se lleva a cabo de manera eficiente. Requiere de poca cantidad de medio de cultivo y la fácil adaptación del equipo a sistemas más rudimentarios en cuanto a equipamiento y cuantificación de productos, le confiere practicidad de uso. Sin embargo, para llevar a cabo las lecturas de los parámetros cinéticos durante la fermentación es necesario sacrificar una columna completa, ya que el diseño de la misma no permite tomar muestras (Durand, 1993). Este equipo es conveniente en las primeras etapas del desarrollo de un bioprocesos ya que es adecuado para estudios de caracterización y optimización de la composición del medio de cultivo, y para cuantificar los datos necesarios para llevar a cabo el cálculo de parámetros cinéticos.

2.5.2. Biorreactor de Columna Esteril.

Diseñado por un grupo del Instituto Nacional de la Investigación Agronómica (*INRA*) en Francia, tomando como base de diseño al biorreactor

en columna. Se elaboraron varios prototipos previos al modelo desarrollado en el año 2000. Este biorreactor trabaja con un volumen de 1 litro, cuenta con un muestreador de humedad relativa y un sistema de calefacción en la cabeza de la columna, mientras que en el circuito de operación se encuentra un sistema de enfriamiento, utilizando agua fría, el cual rodea una resistencia de calentamiento.

Dichas modificaciones permiten una mejor regulación del contenido de agua durante el proceso. Es posible la toma de muestra de la columna de forma aséptica abriendo la tapa superior, la cual dispone de un dispositivo de flama que impide problemas de contaminación. Se trabaja con varios biorreactores conectados a un sistema de control automático por computadora, el cual regula temperatura, humedad y aireación a través de la cama del sustrato. Debido a que el equipo cuenta con un sistema de control, es adecuado para llevar estudios de perfiles de velocidad de flujo del aire suministrado, así como de temperatura, permitiendo evaluar parámetros necesarios para llevar a cabo estudios de escalamiento (Durand, 2003).

2.5.3. *Tambor horizontal*

Uno de los biorreactores en estado sólido más utilizados son los llamados tambor horizontal, el cual se ha diseñado de varias formas: como un contenedor rotatorio, perforado o con paletas, con el fin de obtener una agitación continua del sustrato sólido para incrementar el contacto entre las paredes del biorreactor y el sustrato, así como, proveer mayor oxígeno al microorganismo. Los equipos rotatorios, desarrollados por el grupo Severe, consisten de un cilindro, con o sin chaqueta con agua para el control de temperatura, el cual gira lentamente volteando al medio de cultivo ayudado de pestañas que se encuentran adheridas a la pared. Este tipo de biorreactor presenta dificultades en el control de temperatura y humedad debido a problemas de aglomeramientos de células por ruptura micelial (Viniestra – Gonzales, 2003).

En cambio, los biorreactores de tipo tambor con paletas, vuelve más eficiente la transferencia de oxígeno y disminuye la aglomeración de

partículas de sustrato durante el crecimiento microbiano. Sin embargo, generalmente, un biorreactor de fermentación sólida con agitación permanente, aunque sea suave, puede modificar la estructura del medio sólido. Además, dependiendo de la naturaleza de la partícula del soporte sólido, esta agitación puede llegar a ser abrasiva causando daños al micelio. Se han diseñado sistemas continuos de tambor rotatorio con el fin de mejorar los sistemas de control de temperatura y humedad, sin embargo, a medida que aumenta el volumen del sistema fermentativo la remoción de calor por las paredes del biorreactor se vuelve más ineficiente.

2.5.4. Biorreactor Zymotis

Diseñado y desarrollado por el grupo *ORSTOM* (hoy IRD de Francia), el cual consiste de platos verticales por donde internamente hay transferencia de calor debido a la circulación de agua fría, mientras, que el aire previamente temporizado es introducido por el fondo del sistema. Entre cada plato se carga el medio sólido previamente inoculado, dicha cama se mantiene estática durante la fermentación. Este sistema es parecido a los biorreactores de columna, con la diferencia de que las capas de sustrato están verticalmente fijas, por lo tanto, es difícil trabajar en condiciones asépticas. Además, existe mayor posibilidad de que la cama de sustrato presente un encogimiento del volumen durante el crecimiento del micelio, provocando que el contacto con los platos verticales disminuya a medida que la fermentación progresa, lo cual llevaría la formación de canales pobres en transferencia de calor y oxígeno (Mitchell, 1999).

2.5.5. Biorreactor Growtek.

Es uno de los últimos fermentadores diseñado por el Departamento de Biotecnología, Agricultura e Ingeniería en Alimentos del Instituto Tecnológico de la India, llamado *Growtek*. Consiste de un envase de 16 cm de altura y 11.3 cm de diámetro, que tiene un tubo, de 2.6 cm de diámetro y 8.5 cm de altura, pegado a la base con una inclinación de 15° con respecto a la vertical. El cuerpo del recipiente y del tubo externo están hechos de

policarbonato, y las tapas de ambos son de polipropileno. Este biorreactor tiene dentro del envase un depósito de polipropileno que contiene una tela de fibra de vidrio en el fondo, donde se sostiene el sustrato. La fermentación ocurre en la vasija cilíndrica y el medio es introducido por el tubo inclinado. Dicho dispositivo también permite la dosificación de agua para mantener la humedad adecuada para el crecimiento microbiano. Sin embargo, no cuenta con un sistema de medición de la variación de temperatura y no es posible la toma de muestra sin descartar toda la cama del sustrato (Kar, 1999).

2.5.6. Biorreactor para proceso continuo

Van de Lagemaat y Pyle (2001) propusieron un proceso de fermentación en medio sólido basado en la producción continua de la enzima tanasa. Este trabajo es uno de los reportes que han explorado el diseño de biorreactores de régimen continuo a escala laboratorio y cuyo principio es el empleo de un tornillo sin fin que sirve para alimentar y agitar los sustratos los cuales pueden o no ser inoculados en el proceso. Los estudios correspondientes de mezclado, crecimiento fungido y niveles de esporulación han sido llevados a cabo en condiciones exitosas de operación continua, debido a que el tiempo de residencia del complejo sustrato-microorganismo- enzima es menor que en los biorreactores convencionales y al estar en condiciones cerradas la asepsia es mayor. En cambio, existe la formación de gradientes de temperatura que no permiten un sistema homogéneo de transferencia de calor. Actualmente, el interés hacia este tipo de biorreactores ha permitido el desarrollo de procedimientos que permitan la optimización del proceso de fermentación en cultivo sólido.

2.5.7. Biorreactor Columna-Charola

Diseño realizado en el Departamento de Investigación en Alimentos de la Universidad Autónoma de Coahuila. El cual consiste de una columna de 13 pulgadas de altura y un diámetro de 10 pulgadas. En su interior se

encuentran ocho charolas perforadas, las cuales tiene una capacidad de 140 mL cada una. La transferencia del oxígeno es por burbujeo a través de un distribuidor de aire, permitiendo la transferencia a un flujo de 194 mL/min. La temperatura es regulada por una chaqueta de enfriamiento y/o calentamiento, por lo que es posible controlar y medir los cambios de temperatura. Bajo este sistema se permite una mejor distribución de oxígeno por aireación hacia las charolas. Al momento solo se han realizado experimentos cuyos resultados han estimulado la continuación del estudio de caracterización total del biorreactor y la optimización de los procesos para los que se puede aplicar (Ruiz- Leza, 2004).

2.5.8. Biorreactor Biocon.

Biocon, desarrollo y patentó un nuevo biorreactor llamado PlaFactorTM para llevar a cabo fermentaciones usando matrices solidas. El sistema fue higiénicamente diseñado y automatizado para un proceso de cultivo en charola, el cual ya es utilizado eficientemente en plantas industriales en Biocon, en el desarrollo de productos de uso alimenticio. La fermentación se lleva a cabo en un biorreactor controlado por computadora. Todas las operaciones del proceso fermentativo, como esterilización, enfriamiento, inoculación, control, recuperación de producto y post-esterilización, se realiza en un solo equipo. El equipo consta de charolas selladas colocadas una sobre la otra formando dos torres unidas por un eje central. Cada módulo cuenta con un brazo de mezclado, el cual, rota alrededor axialmente, y con canales de remoción de calor metabólico, control de humedad, aireación y vapor para la esterilización. Este equipo fue diseñado con el objetivo de reemplazar los cuartos de incubación por un equipo más compacto. El equipo de PlaFactor cuenta con estudios del uso cultivos sólidos para la producción de agentes de biocontrol y productos farmacéuticos a nivel industrial, lo cuales requieren altas condiciones de asepsia y condiciones de alta precisión (Suryanarayan, 2000).

2.5.9. Biorreactor de lecho fluidizado.

Sistema de operación en modo continuo el cual puede ser operado por altos periodos de tiempo a un alto valor de productividad. Los primeros biorreactores constaban de un cilindro de vidrio, con o sin chaqueta, llenado por una carga completa de lecho o sustrato, sin embargo causaba problemas de compactación similares a los presentados en los equipos de cama empacada. (Ruiz, 2007) Las variaciones en el lecho han permitido un mejor funcionamiento de este sistema, ya que se utilizan pedazos de esponjas, troncos naturales (loofa, coyonoxtle), polímeros sintéticos (espumas de poliuretano, poliestireno), así como también canastas o cajas delgadas de acero inoxidable, que cuenten con perforaciones que permiten tener una eficiente inmovilización de las células en el soporte con el medio de cultivo (Ogbonna, 2001). Dichos soportes son llenados por el medio sólido a fermentar, los cuales fueron previamente colocados a lo largo del contenedor. El principio del diseño se basa en proveer agitación y aireación por flujo forzado de aire en la parte del cilindro por medio de una bomba. El sistema provee un incremento en la transferencia de oxígeno a la cama de sustrato, sin embargo, se presenta daño al inóculo por causa del gran esfuerzo de corte generado, además de que se forman gradientes de temperatura a través de la columna que pueden afectar al producto deseado.

2.6. producción de alimentos por fermentación en medio sólidos.

Uno de los métodos más prometedores para la producción de proteína no convencional lo constituye la Fermentación en medio Sólido (FMS) de los residuos lignocelulósicos, lo cual está determinado en primera instancia, por los grandes volúmenes de estos residuos que se producen anualmente en el mundo, y en segundo lugar, por las ventajas que tiene el sistema de FMS sobre las fermentaciones sumergidas convencionales. Tanto la caña de azúcar como sus residuos agroindustriales se utilizan en la producción de alimento animal enriquecido en proteína por FMS. Se han obtenido alimentos como la Saccharina y el Bagarip, entre los más destacados, por sus aplicaciones como sustitutos parciales de alimentos tradicionales y como suplementos dietéticos en algunos animales. La Saccharina es un producto obtenido por fermentación de los tallos de caña de azúcar desprovistos de las hojas, suplementado con urea y sales minerales, según la tecnología

desarrollada por Elías et al. De acuerdo con el procedimiento empleado para la fermentación y secado de la caña durante la elaboración de este material se obtienen tres tipos de Saccharina (industrial, semindustrial y rústica). La industrial se obtiene al fermentar y secar el producto en condiciones controladas en fermentadores, mientras que la semindustrial se fermenta en condiciones también controladas (fermentadores), pero se seca al sol, y en la Saccharina rústica todo el proceso ocurre en una plataforma asfaltada. El proceso de obtención de Saccharina no genera residuales y es relativamente sencillo, pero con resultados muy variables en cuanto a la eficiencia de conversión de los azúcares de la materia prima en proteína de origen unicelular. Esto se debe fundamentalmente a utilizar como inóculo la flora epifita de la caña de azúcar, la cual es susceptible a cambiar en calidad y cantidad por el efecto de diversos factores. Por otra parte, este alimento se caracteriza por un elevado contenido de fibra bruta, que limita su uso en animales monogástricos. Además, su baja densidad atenta contra la economía de su embalaje, transporte y almacenamiento, a la par que dificulta su manejo en las fábricas de piensos.

La Sacchamaíz es una variante que se obtiene al incluir diferentes niveles de harina de maíz en la fermentación de la caña de azúcar buscando mejores resultados en la alimentación de animales monogástricos, pero su producción cuenta con las mismas limitantes que se mencionaron para la Saccharina.

Otros productos se han obtenido a partir del enriquecimiento proteico de la caña de azúcar por FMS, dentro de los que se encuentra el proceso para la producción de un forraje enriquecido en proteína a partir de la caña de azúcar natural finamente triturada, utilizando una cepa de *Aspergillus Níger* y como nutrientes: sulfato de amonio, urea y fosfato monobásico de amonio, patentado por (Roura, 2010). El proceso que dura entre 30 y 40 h, se lleva a cabo en un reactor hexagonal en forma de bandeja, con suministro continuo de aire. Se señala que es un producto a base de caña fresca, que su proceso productivo requiere un área de producción extensa, y que el costo de producción es elevado. Como resultado de los estudios realizados en el perfeccionamiento de la Saccharina, surge la tecnología de producción del

Bagarip (bagazo rico en proteínas), que elimina las principales deficiencias de las tecnologías precedentes. Por otra parte, *Lagunas et al. (2006)* reportan la producción de enzimas celulolíticas a partir de residuos del procesamiento de café soluble y de olote de la cosecha de maíz y su aplicación en alimento balanceado para pollo de engorda, en un biorreactor de columna con capacidad para 6,6 kg de sustrato, con resultados favorables. *Aguilar et al.* Exponen resultados positivos en la obtención de un preparado multienzimático en polvo a partir de un extracto con actividad fitasa y otras enzimas hidrolíticas (pectinasa celulasa y xilanasa), obtenidas por FMS a partir de cáscara cítrica con la cepa *Aspergillus Níger W2*. *Dusted e Izquierdo* estudian dos alternativas para aumentar la eficiencia en la transformación de bagacillo de caña predigerido con cal, demostrando que la transformación del mismo en varios ciclos es una vía para favorecer la síntesis de enzimas, mientras que la alternativa de cultivo mixto es una solución para favorecer el incremento del rendimiento en la síntesis de biomasa.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

El desarrollo del proyecto está dividido en 7 etapas las cuales se describen a continuación:

Etapa I:

3.1 Aislamiento y caracterización de hongos filamentosos obtenidos del semidesierto de Coahuila:

3.1.1 Aislamiento de microorganismos

Las cepas empleadas en esta investigación fueron aisladas de material vegetal del semi-desierto de Coahuila (Santos-Orozco, 2014).

Se sembraron en PDA y se registró su crecimiento cada 24 h. Cada cepa fue conservada en leche descremada-glicerol y congeladas a -20°C.

3.1.2 Identificación macro y microscópica de microorganismos filamentosos

Las cepas obtenidas fueron resembradas en PDA hasta obtener cultivos puros; se analizó su morfología macroscópica (color, textura) y microscópica empleando una tinción con azul de algodón y observadas en el microscopio (40X) para identificar las estructuras celulares.

3.1.3 Crecimiento radial de microorganismos

Las cepas seleccionadas se sembraron en PDA, se incubaron a $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ y cada 24 h se midió su crecimiento radial.

3.1.4 Identificación molecular de los microorganismos

La identificación de las cepas se llevó a cabo por amplificación del gen 18S ADNr. Para lo cual se propagaron las cepas en medio de Czapek-Dox cuadro. con glucosa al 20 % por 4 días para la mayor producción de biomasa, la cual fue filtrada para la posterior extracción del ADN.

Cuadro 4. Composición del medio Czapek-Dox

Componente	g/L
KH ₂ PO ₄	3.04
MgSO ₄	1.52
KCl	1.52
NaNO ₃	0.32
Glucosa	20.00

La biomasa fue transferida a un mortero con pistilo estéril y se le agregó nitrógeno líquido para macerar la muestra y obtener un polvo blanco y fino. El polvo se transfirió a un tubo Falcón de 50 mL estéril y se le agregaron dos volúmenes de buffer de extracción TES (Trizma base 0.01M, EDTA 0.05 M, SDS 0.5 M). Se dio un ligero vortex y se dejó incubar a -20 °C durante 10 minutos utilizando el congelador (PANASONIC MPR-414F), posteriormente la muestra se distribuyó (1.5 ml) en tubos Eppendorf de 2.0 mL estériles, adicionándoles 200 µL de acetato de potasio y 150 µL cloruro de sodio 5 M, se incubó la muestra en el congelador a -20 °C durante 20 minutos. Transcurrido el tiempo se centrifugó a 14,800 rpm por 20 minutos a 4°C; se recuperó el sobrenadante y se transfirió a un tubo nuevo estéril. Se adicionó 0.5 volúmenes de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y se centrifugó a 14,800 rpm por 10 min a 4°C. Nuevamente se recuperó el sobrenadante y se transfirió a un tubo estéril y se agregó 0.1 volúmenes de acetato de amonio 7.5 M y 2 volúmenes de etanol frío al 70 %. Se incubó en el congelador a -20 °C durante toda la noche.

Posteriormente, se centrifugo a 14,800 rpm por 10 minutos a 4°C, se decantó y se dejó evaporar el etanol. Después, se agregaron 50 µL de buffer TE 0.1X para disolver la pastilla.

Etapa II:

3.2 Caracterización fisicoquímica de residuos agroindustriales:

Debido a la disponibilidad y abundancia de los subproductos en el estado de Coahuila se seleccionaron el guishe (residuo del *Agave lechuguilla*) o R₁, el bagazo de la uva (bagazo de *Vitis vinífera*) o R₂ y el nopal (*Opuntia ficus indica*) o R₃.

3.2.1 Acondicionamiento de la materia prima:

El guishe (R₁) fue recolectado en el mes de febrero del 2014 en el ejido el Porvenir ubicado en el municipio de General Cepeda en el estado de Coahuila a -101.70.27,8 de longitud oeste y 25.51.36,1 de latitud norte a 1330 nmms y sometido a un proceso de inactivación microbiana y enzimática a 105 C por 15 minutos; mientras que el bagazo de uva (R₂) fue recolectado de Casa Madero ubicado en carretera Paila-Parras en el estado de Coahuila a 25.30.26,6 de latitud norte y 102.12.58,7 longitud oeste en el mes de agosto 2014 y sometido a inactivación microbiana y enzimática a 105 C por 15 minutos.

Finalmente, el nopal (*Opuntia ficus indica* o R₃) fue recolectado en el mes de febrero de 2014 del ejido la escondida ubicado en el km. 11.5 de la carretera Saltillo –Torreón y cortado en trozos de aproximadamente 5 cm.

Las muestras fueron acondicionadas bajo un secado en horno de convección de la marca (HS45 Novatech) hasta peso constante a una temperatura de 60 C. Posteriormente a los materiales (R₁, R₂ y R₃) se les redujo el tamaño de partícula empleando un molino (WF-130 Unimach).

3.2.2 Caracterización química de la materia prima:

Los componentes proximales fueron determinados por los métodos de la AOAC (1997): humedad (método 925.09) cenizas (método 923.03); grasa cruda o extracto etéreo (método 920.39) proteína cruda (Kjeldahl) (método 954.01) usando 6.25 como un factor de conversión de nitrógeno proteína, fibra cruda (método 962.09). Los carbohidratos se estimarán como el extracto libre de nitrógeno (ELN) calculado como el porcentaje faltante para completar el 100 % de los componentes. La fibra en detergente neutro (FDN) se determinó según procedimiento publicado por Goering y Van Soest, (1970). Estos análisis se llevaron a cabo en el Laboratorio de Producción Animal de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro y en el laboratorio de Tecnología de Alimentos de la Facultad de Ciencias Químicas de la UAdeC.

3.2.2 Caracterización física de la materia prima:

La actividad acuosa se determinó empleando un AquaLab (Decagon Device Inc) y humedad por diferencia de peso.

Etapa III:

3.3 Selección de una cepa en base al crecimiento radial sobre la materia prima:

Las cepas aisladas y purificadas de la etapa fueron sembradas empleando cada uno de los sustratos o materias primas bajo las siguientes condiciones:

3.3.1 Crecimiento radial de microorganismos en guishe (R_1)

Las 7 cepas aisladas y purificadas fueron sembradas empleando agar-agar como soporte y 3 g del soporte como fuente de carbono (R_1). Se realizó una cinética de crecimiento radial durante 30 días a una temperatura constante de 30 C.

3.3.2 Crecimiento radial de microorganismos en bagazo de uva (R_2)

Las 7 cepas aisladas y purificadas fueron sembradas empleando agar-agar como soporte y 3 g del soporte como fuente de carbono (R_2) con 3 tamaños de partícula. Se realizó una cinética de crecimiento radial durante 30 días a

una temperatura constante de 30 C.

3.3.3 Crecimiento radial de microorganismos en nopal (R₃)

Las 7 cepas aisladas y purificadas fueron sembradas empleando agar-agar como soporte y 3 g del soporte como fuente de carbono (R₃). Se realizó una cinética de crecimiento radial durante 30 días a una temperatura constante de 30 C.

3.4 Producción de la enzima celulasa mediante FMS:

Una vez seleccionada la cepa que mejor consumo de sustrato y mayor crecimiento radial se realizó la producción de la enzima celulasa mediante la siguiente metodología:

3.4.1 Medio de cultivo Czapeck:

El medio Czapeck es un medio mínimo en sales para crecimiento de hongos y su contenido se presenta en el cuadro 5.

Cuadro 5. Contenido del medio de cultivo Czapeck

REACTIVO	CANTIDAD (g/L)
Urea	7.65
KH ₂ PO ₄	3.04
MgSO ₄	1.52
KCl	1.52

3.4.2 Recuento de esporas:

Se basa en el recuento directo del número de células en un volumen determinado, prefijado en la cámara de recuento, mediante su observación al microscopio. El método no permite distinguir entre células viables y no viables. Se cuentan las conidias (esporas) presentes en los cuadros elegidos (generalmente se encuentran en los cuadros de la línea superior e inferior y en

diagonal uniendo ambas líneas, formando una “Z”). También se deben contar las conidias que están ubicadas tocando la primera de las tres líneas que se encuentran circundando el cuadro, las que se encuentran en la parte superior y la derecha del cuadro (Figura 4). Se cuentan en total 13 cuadros, cinco en cada línea (cinco arriba y cinco abajo) y tres de la diagonal que cruza el centro uniendo las líneas. Finalmente se saca el promedio (media aritmética).

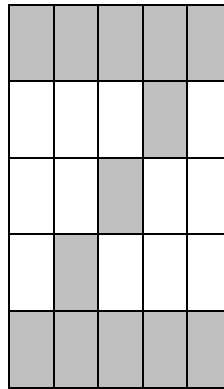


Figura 4. Conteo de esporas para preparación de inóculo

El número de conidias se determina empleando la siguiente fórmula:

$$\text{Conidias / mL} = \text{promedio} \times 250,000 \times \text{factor de dilución (200)}.$$

3.4.3 Condiciones de la fermentación:

Se emplearon columnas de vidrio de 25 cm de largo X 8 cm de diámetro en las fermentaciones empleando las condiciones que se enlistan a continuación:

3.4.3.1 Empaque:

Se evaluaron 3 niveles 60, 80 y 100 g/L. El cuadro 6 muestra la cantidad de soporte que se requirió para cada diseño empleando las siguientes fórmulas:

$$A = \pi r^2 \quad V = \pi r^2 h \text{ (ml o cm}^3\text{)}$$

Cuadro 6. Cantidad de empaque empleada en cada fermentación

Empaque (g/L)	Soporte (g)
60	1.19
80	2.5
100	3.1

Nota: el soporte debe ocupar el 70-80 % del volumen de la columna

3.4.3.2 Fuente de nitrógeno:

La fuente de nitrógeno comúnmente empleada en el crecimiento de hongos filamentosos (NaNO_3) fue sustituida por urea (CH_4NO_2) empleando 3 niveles, los cuales se presentan en el cuadro 7. Cabe mencionar que la fuente de carbono siempre se mantuvo constante.

Cuadro 7. Cantidad de fuente de nitrógeno empleada en cada fermentación

Relación C:N	Urea (g/L)
--------------	------------

8	0.143
16	0.071
24	0.048

3.4.3.3 Tamaño de partícula:

Se analizaron 3 tamaños de partícula en para cada sustrato, 1, 5, 10 cm para guishe, y 0.5, 1 y 5 cm en uva.

3.4.3.4 Inoculo:

Para la fermentación se inocularon 1×10^7 esporas/mL por cada gramo de soporte empleado.

3.4.3.5 Aireación:

Se evaluaron 3 niveles de aireación que fueron 0.4, 0.8 y 1.2 L/min el cual fue controlado con un flujómetro y un compresor de 2.5 HP con tanque de 25 litros 202 Adir.

3.4.4 Montaje de columnas:

Los hongos filamentosos requieren una humedad del 70%, la cual se suministrará a través del medio de cultivo, es decir, que por cada 3 g de soporte se requieren 7 mL de medio Czapeck (30:70), (cuadro 8).

Cuadro 8. Humedad para crecimiento del microorganismo en columna

Soporte (g)	Medio Czapek (mL)	Humedad (%)
3.0	7.0	70
3.1	7.23	70
2.5	5.83	70
1.9	4.43	70

La figura 5 muestra la forma de llenado de las columnas. Que se encuentra con dos gorros de algodón, uno en la parte inferior y el otro en la parte superior de la columna, el soporte, el medio y el inoculo, que suministrado por una corriente de aire en la parte inferior.

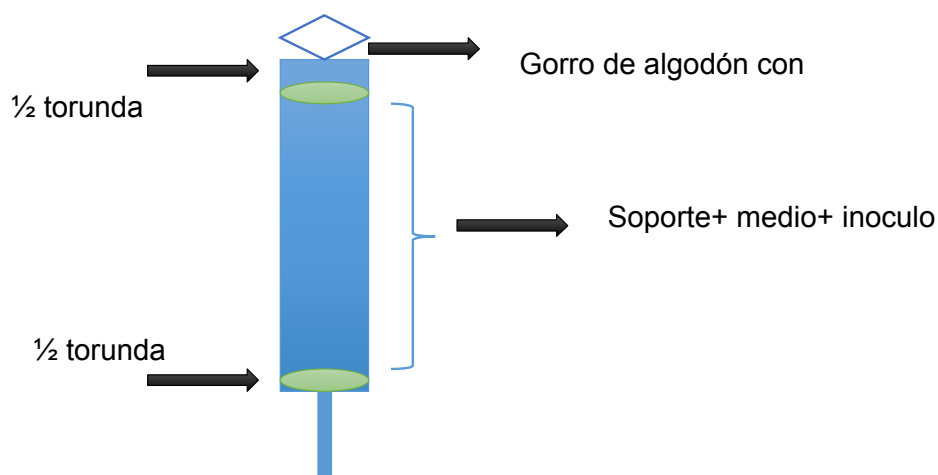


Figura 5. Montaje y preparado de las columnas de vidrio para FMS

3.4.5 Fermentación

Se realizó una cinética de fermentación a las 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 196 horas. Una vez transcurrido el tiempo de fermentación se vació el empaque de la columna en un vaso de precipitado y se agregó el buffer de extracción de celulasas (ver 3.3.5.1), después de agitar constantemente por 15 minutos se centrifugó a 8000 rpm por 20 minutos a 5°C. El sobrenadante se separó (extracto enzimático) y se filtró con filtros de nylon de 0.22 μm , posteriormente se congeló a -20°C hasta su uso.

El soporte fermentado ya lavado con el buffer de extracción de celulasas se secó en una estufa a 50°C y se determinó biomasa por diferencia de peso (ver 3.3.5.2).

3.4.5.1 Buffer de extracción de celulasas:

Se basa en la extracción de proteínas empleando un surfactante y un solvente iónico. El surfactante (en este caso el Tween-80) sirve para

incrementar la permeabilidad de la célula facilitando la extracción de varias moléculas a través de la membrana celular (Silva y col, 2005). Mientras que el solvente iónico (en este caso NaCl) logra liberar la enzima unida a la superficie micelar mediante enlaces iónicos (Fadel, 2001). Se prepararon 100 mL de solución "A" (0.9 g de NaCl) y 100 mL de solución "B" (0.1 mL de Tween 80), posteriormente se juntaron la solución A y la solución B para dar un volumen final de 200 mL.

El cuadro 9 muestra el contenido de buffer a emplear por cada 3 g de soporte.

Cuadro 9. Relación de buffer extracción y soporte fermentado

Soporte (g)	Buffer de extracción (mL)
3.1	41.33
2.5	33.33
1.19	15.86

3.4.5.2 Determinación de biomasa:

La determinación de biomasa es una de las variables más importantes de un bioproceso, ya que su determinación nos lleva a la comprensión de la eficiencia del mismo. Se trata de una variable clave para establecer las tasas de producción, de consumo de nutrientes y el cálculo de los balances de masa de cualquier proceso biológico (Arnaíz, 2000).

La cantidad total de biomasa presente en el material fermentado se midió en términos de peso seco por unidad de volumen, como sólidos solubles totales por diferencia de peso.

3.4.6 Diseño de experimentos:

Se llevó a cabo un diseño de experimentos ortogonal de Taguchi (L9) empleando 4 factores en 3 niveles.

Aire= 0.4, 0.8 y 1.2 L/min

Relación C:N= 8, 16 y 24 g/L

Empaque= 60, 80 y 100 g/L

Tamiz= 1, 5 y 10 cm para guishe y 0.5, 1 y 5 cm para bagazo de uva.

En el cuadro 10 se muestra el diseño y nomenclatura para las diferentes condiciones de las fermentaciones.

Cuadro 10. Condiciones de las diferentes fermentaciones en medio solido

AIRE (L/min)	C:N (g/L)	EMPAQUE (g/L)	TAMIZ	CODIGO
0.4	8	60	3.5	A
0.4	16	100	1.8	B
0.4	24	80	3.5	C
0.8	16	80	3.5	D
0.8	24	60	18	E
0.8	8	100	3.5	F
1.2	24	100	3.5	G
1.2	8	80	1.8	H
1.2	16	60	3.5	I

Etapas IV

3.5 Determinación de la actividad enzimática:

Para realizar la detección de la acción responsable de la de-polimerización de la celulosa es necesario determinar tres actividades enzimáticas, las cuales son: actividad endo-glucanasa, exo-glucanasa y β -glucosidasa.

3.5.1 Determinación de actividad endo-glucanasa:

En este caso se detecta la actividad de las enzimas responsables de la hidrólisis de los enlaces β -1,4 localizados en las regiones internas de la molécula de celulosa, contribuyendo a la disminución del grado de polimerización.

Blanco de enzima (BE):

En un tubo de ensaye colocar 200 μ L de buffer (buffer de citratos 50 mM pH 4.8) más 50 μ L de extracto enzimático obtenido de la fermentación a diferentes tiempos.

Blanco de sustrato (BS):

En un tubo de ensaye colocar 200 μ L de sustrato (carboximetil celulosa 1000 ppm) más 50 μ L de buffer de citratos 50 mM a pH 4.8.

Mezcla de reacción (MR):

En un tubo de ensaye colocar 200 μ L de sustrato más 50 μ L de extracto enzimático. Cada tubo se coloca en baño María a 50 °C durante 10 minutos y se detiene la reacción mediante ebullición en baño María durante 5 minutos. A cada tubo se le miden azúcares reductores (ver metodología 3.4.4) . Cada una de las determinaciones debe realizarse por triplicado o de acuerdo a las muestras que se tengan. Los tubos pueden ser incubados simultáneamente.

3.5.2 Determinación de actividad exo-glucanasa:

En este caso se detecta la actividad de las enzimas responsables de la hidrólisis de los enlaces β -1,4 localizados en las regiones externas de la molécula de celulosa, contribuyendo a la disminución del grado de polimerización.

Blanco de enzima (BE):

En un tubo de ensaye colocar 1 mL de buffer ácido cítrico/citrato de sodio 0.1 M a pH 4.8 y se colocan 50 μ L de extracto enzimático

Blanco de sustrato (BS):

En un tubo de ensaye colocar 1 mL de buffer ácido cítrico/citrato de sodio 0.1 M a pH 4.8 y se colocan una tira de papel filtro

Mezcla de reacción (MR):

En un tubo de ensaye colocar 1 mL de buffer ácido cítrico/citrato de sodio 0.1 M a pH 4.8 y se colocan una tira de papel filtro. Se adicionan 50 μ L de extracto enzimático. Cada tubo se coloca en baño María a 50 °C durante 1 h y se detiene la reacción mediante ebullición en baño maría durante 5 minutos. Posteriormente a cada tubo se le miden azúcares reductores (ver metodología 3.4.4). Cada una de las determinaciones debe realizarse por triplicado o de acuerdo a las muestras que se tengan. Los tubos pueden ser incubados simultáneamente.

3.5.3 Determinación de actividad β -glucosidasa:

En este caso se detecta la actividad de las enzimas responsables de la hidrólisis de los enlaces β -1,4 localizados en la celobiosa liberada por efecto de la acción de la exoglucanasa. La hidrólisis de la celobiosa libera glucosa como producto para finalizar la hidrólisis de la celulosa.

Mezcla de reacción (MR):

En un tubo se colocan 800 μ L de buffer ácido acético-acetato de sodio 0.2 M a pH 4.6 y se adicionan 100 μ L de sustrato (p-NPG ó 4-Nitrophenyl β -D-glucopiranoside) 9.0 mM. A la mezcla se le adicionan 100 μ L de extracto enzimático. Cada tubo se coloca en baño maría a 50 °C durante 10 minutos y se detiene la reacción agregando 100 μ L de Na_2CO_3 0.1 M. Finalmente a cada tubo se le miden azúcares reductores Ver metodología 3.4.4). Cada una de las determinaciones debe realizarse por triplicado o de acuerdo a las muestras que se tengan. Los tubos pueden ser incubados simultáneamente.

3.5.4 Determinación de azúcares reductores por DNS:

Se basa en la reducción del ácido 3, 5-dinitrosalicílico (DNS) (de color amarillo) por la glucosa u otro azúcar reductor, al ácido 3-amino-5-

nitrosalicílico (de color rojo ladrillo) (Chaplin, 1986), cuya presencia puede detectarse por lectura de la Absorbancia en la zona de 540-570 nm.

En un tubo de ensaye se colocar 250 μL de muestra mas 1000 μL de reactivo DNS, poner en baño María durante 10 minutos a 90°C , los tubos se deban enfriar con un baño de agua con hielo y se agregan 5 mL de agua destilada, para finalmente después de agitarlos leer absorbancia a 540 nm en un espectofotómetro (marca).

3.5.5 Conversión de unidades (U/mL) de actividad enzimática:

Las unidades de enzimas presentes en los extractos enzimáticos fueron calculadas de la siguiente manera.

$$u/mL = \frac{\mu mol}{mL \frac{EE}{min}}$$

Dónde: U= unidad enzimática que se define como la cantidad de μ mol del producto derivado de la hidrólisis de la enzima como se expresa a continuación:

μ mol de Glucosa en fermentación CMC al 0.5%:

$$\frac{u}{mL} = \frac{mg}{mL Rxn} = \frac{1 mol}{189160 mg} = \frac{1000000 \mu mol}{1 mol} \left| \frac{2.5 mL Rxn}{0.300 mL EE} \right| \left| \frac{1}{5 min} \right| = 9.25 \frac{u}{mL} \text{ de celulosa}$$

3.5.6 Parámetros cinéticos:

Se determinaron los parámetros cinéticos que se describen a continuación:

3.5.6.1 Formación de biomasa:

La producción de biomasa, fue evaluada mediante la ecuación logística de Velhurst- Pearl (EC. (Gatto *et al.*, 1988; Viniegra *et al.*, 2003).

$$\frac{dX}{dt} = \mu_M \left[1 - \frac{X}{X_{max}} \right] X$$

Dónde: X es la biomasa (g por L, por cm^2 o por Kg), μM es la velocidad máxima de crecimiento específico (h^{-1}) y X_{MAX} es el valor de equilibrio para X donde $dX/dt = 0$, para $X > 0$. La solución de la ecuación anterior es la siguiente:

$$X(t) = X_0 * e^{\mu_{max} * t} / \left(1 - \frac{X_0 * (e^{\mu_{max} * t})}{X_{max}} \right)$$

Dónde: X_0 es la condición inicial para X , la ecuación 12 sirve para ajustar los datos experimentales de la ecuación 11, minimizando la suma de errores al cuadrado como función de los parámetros cinéticos X_0 , X_{max} y μM .

3.5.6.2 Formación de producto:

La cinética de formación de producto fue modelada empleando la ecuación de Luedeking y Piret (1959) (Viniestra *et al.*, 2003).

$$\frac{dP}{dt} = Y_{p/x} \frac{dX}{dt} + kX$$

$$Y_{PS} = \frac{P_2 - P_1}{S_1 - S_2} \quad q_P = \mu Y_{E/S} \quad Y_{PX} = \frac{P_2 - P_1}{X_2 - X_1}$$

$$P_C(t) = P_{C,0} + \alpha_C \cdot (X(t) - X_0) + \beta_C \cdot \frac{X_{max}}{\mu_{max}} \cdot \ln\left(1 - \frac{X_0 \cdot (1 - e^{\mu_{max} \cdot t})}{X_{max}}\right)$$

Dónde: P , es la concentración de producto; C , es la enzima de interés (celulasa);

$Y_{P/X}$, es el rendimiento de producto en términos de biomasa (unidades de producto por unidades de biomasa) y k , es el coeficiente secundario de formación o destrucción de producto.

Etapa V

3.6 Caracterización físico-química del material degradado:

Los componentes proximales fueron determinados por los métodos de la AOAC (1997) para fibra cruda (método 962.09). El material utilizado corresponde al obtenido después de realizar la fermentación correspondiente a diferentes horas.

Etapa VI

3.6 Digestibilidad *in vitro* de sustratos:

Esta digestibilidad se realizó con un equipo DAISY, balanza analítica, estufa de secado, tanque de CO₂, termos de 500 ml, bolsas de tela para concentrado o sustrato 5x10 cm, sellador y sustrato a evaluar

La preparación de la bolsa con lleva un preenjuado para filtrar acetona de 3 a 5 minutos para remover la superficie que inhibe la digestión microbiana, se pesaron cada una de las bolsas y se registró su peso (W1) después de haber tomado el peso de las bolsas se agregó 0.5 g de muestra (W2). Dejando bolsas vacías que se registraron como (C1). En seguida se preparó solución buffer (A) y una solución buffer (B), (cuadro 11) después de tener lista la solución A y B se prepara la mezcla de solución buffer para cada frasco digestor, a temperatura de 39⁰. La obtención del líquido se hizo mediante la extracción de líquido ruminal vía esófago de ovinos que han sido alimentados con nopal y algunos subproductos de la región, para posteriormente ser filtrado y almacenado en termos a 39⁰ y evitar la muerte de microorganismos por cambio brusco de temperatura.

Al tener las soluciones y las bolsas con muestras de concentrados se introdujeron en los frascos dependiendo de los tiempos de la cinética empezando con tiempo cero te terminando en tiempo 72, una vez transcurrido estas horas la bolsa son extraídas y secadas en una estufa marca (SPDI755) tomando el peso después de la digestibilidad.

Cuadro 11. Reactivos utilizados en la solución buffer

KH ₂ PO ₄	1.0 gr/litro
---------------------------------	--------------

MgSO ₄ . 7H ₂ O	0.5 gr/litro
NaCl	0.5 gr/litro
CaCl ₂ 2H ₂ O	12.0 gr/litro
Urea	0.5 gr/litro
Na ₂ CO ₃	15.0 gr/litro
Na ₂ S 9H ₂ O	1.0 gr/litro

Para calcular la digestibilidad in vitro se utilizó la siguiente fórmula

$$\%DIV = 100 - ((W3 - (W1 * C1)) * 100 / W2)$$

$$\%DIV Ms = 100 - ((W3 - (W1 * C1)) * 100 / W2)$$

Dónde:

W1= peso de la bolsa tarada

W2= peso de la muestra

W3= peso final de la muestra después de la digestión in vitro

C1= corrección de la bolsa (blanco) (peso final / peso inicial)

Ms= materia seca total

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados del proyecto se dividieron en 6 etapas los cuales presentan a continuación:

Etapa I:

4.1 Aislamiento y caracterización de hongos filamentosos obtenidos del semi desierto de Coahuila:

4.1.1 Aislamiento de microorganismos

Se obtuvieron 7 cepas diferentes, las cuales se codificaron como M1, M2, M3, M4, M5, M6 y M7 (Santos-Orozco, 2014). Cada cepa fue conservada en leche descremada-glicerol como lio protector y congeladas a -20°C. Esto con el fin de preservar sus características, su viabilidad y repetitividad. (Burguet, 2012) concluye en un ensayo que preservando los microorganismo en estos medios las colonias mostraron que el comportamiento de las características culturales, morfológico-tintoriales y fisiológico-bioquímicas ensayadas se mantuvieron de acuerdo con la descripción de las especies

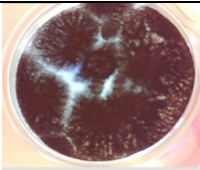

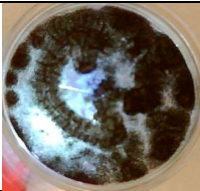
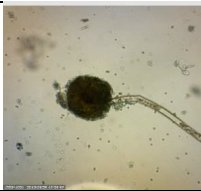
4.1.2 Identificación macro y microscópica de microorganismos filamentosos

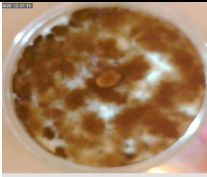

En el cuadro 12 se muestra la morfología macro y microscópica de las cepas obtenidas, donde se pueda apreciar que las cepas M1, M2, M3, M4 Y M5 presentan una tonalidad negra, lo cual es una característica macroscópica del grupo *Aspergillus*; la morfología microscópica indica que los microorganismos de éste género presentan cabezas conidiales de tonos negro a negro grisáceo, negro café, negro púrpura o negro carbón, son globosas, radiadas o divididas formando columnas de cadenas de conidios irregulares o bien definidos. Los conidióforos son de color hialino a café

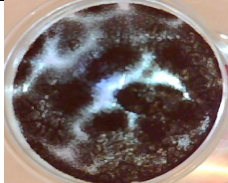

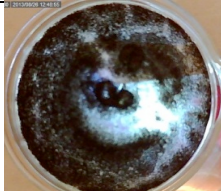



típicamente lisos o en pocas especies ligeramente granulares, de paredes robustas y quebradizas (Vega-Sáez, 2002).



Penicillium y *Aspergillus* crecen de manera adecuada en agar PDA, aplicando temperatura de 30 °C de acuerdo con estudios realizados por Pérez *et al* (2010) quien aisló e identificó estos géneros a partir de residuos orgánicos.

Cuadro 12. Descripción macro- y microscópica de las cepas aisladas de material vegetal del semi-desierto de Coahuila.

CEPA (CODIGO)	MORFOLOGIA MACROSCOPICA	MORFOLOGIA MICROSCOPICA	DESCRIPCION
M1			Conidiales de tono negro, son globosas, radiadas o divididas formando columnas de cadenas de conidios irregulares o bien definidos. Los conidióforos son de color hialino a café típicamente lisos o en pocas especies ligeramente granulares, de paredes robustas y quebradizas
M2			Conidiales de tono negro, son globosas, radiadas o

			<p>divididas formando columnas de cadenas de conidios irregulares o bien definidos. Los conidióforos son de color hialino a café típicamente lisos o en pocas especies ligeramente granulares, de paredes robustas y quebradizas</p>
M3			<p>Conidiales de tono negro- grisaseo, son globosas, radiadas o divididas formando columnas de cadenas de conidios irregulares o bien definidos. Los conidióforos son de color hialino a café típicamente lisos o en pocas especies</p>

			ligeramente granulares, de paredes robustas y quebradizas
M4			Conidiales de tono negro-café, son globosas, radiadas o divididas formando columnas de cadenas de conidios irregulares o bien definidos. Los conidióforos son de color hialino a café típicamente lisos o en pocas especies ligeramente granulares, de paredes robustas y quebradizas
M5			
M6			Conidiales de tono negro-café, son globosas,

			radiadas o divididas formando columnas de cadenas de conidios irregulares o bien definidos. Los conidióforos son de color hialino a café típicamente lisos o en pocas especies ligeramente granulares, de paredes robustas y quebradizas
M7			

(Fuente: Santos-Orozco, 2014)

4.1.2 Selección de una cepa en base al crecimiento radial en PDA:

De las 7 cepas aisladas se seleccionaron las cepas M₄ y M₅ debido a que presentaron mayor crecimiento radial en menor tiempo (figura 6 y figura 7, respectivamente). El crecimiento radial de la cepa M₄ presentó una velocidad específica de crecimiento de 0.1067 cm/h, mientras que para la cepa M₅ la velocidad específica de crecimiento fue de 0.0998 cm/h (cuadro 11); no mostrando diferencias significativas entre ellas (P>0.05).

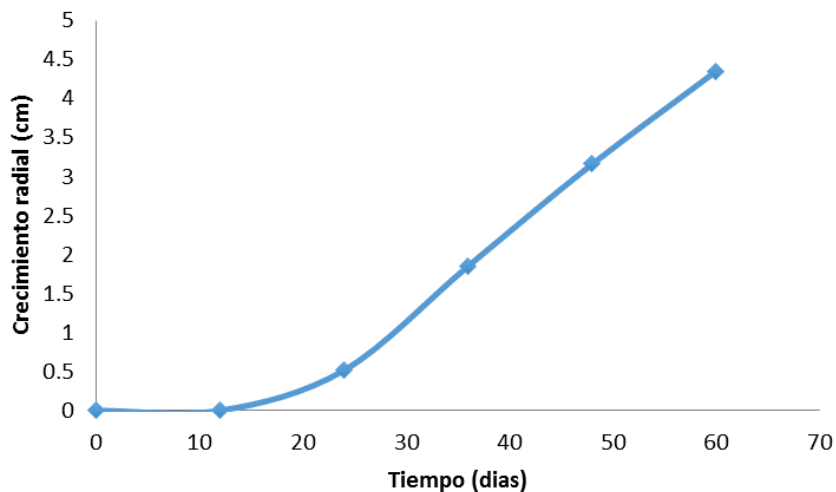


Figura 6. Crecimiento radial de la cepa M₄ en PDA a 30 C.

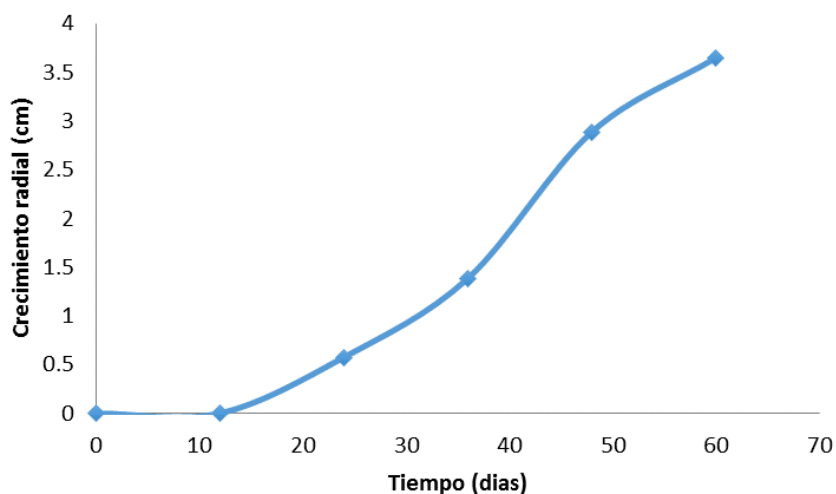


Figura 7. Crecimiento radial de la cepa M₅ en PDA a 30 C.

Dado que la velocidad específica de crecimiento en sustrato dado, significa la afinidad que tiene el microorganismo con el sustrato que se encuentra en evaluación (Serna, 2010) se encontró que, como muestra el cuadro 13. M4 tiene una diferencia significativa para el valor de μ (cm/h). Por lo cual se seleccionó a M4 como la cepa a reproducirse y emplearse en la evaluación de los sustratos que serán sometidos a fermentación en medio sólido.

Cuadro 13. Velocidades específicas de crecimiento de las cepas M4 y M5 en PDA.

Cepa	μ (cm/h)
M ₄	0.1067 _a
M ₅	0.0998 _a

Etapa II:**4.2 Caracterización fisicoquímica de las materias primas:**

El análisis proximal de los sustratos empleados en este estudio para utilizarse como soporte para la fermentación en medio sólido (FMS); se muestran en el cuadro 15 en el que se puede observar que en el caso del R₁ o guishe contiene el mayor contenido de fibra cruda (36%); este residuo representa el 85% del volumen total de producción de desechos a partir de *Agave lechuguilla*, por lo se podría posicionar como una innovadora alternativa de recurso para la generación de enzimas, aportando al aprovechamiento de residuos agrícolas que conforman del 30-42% de celulosa de la biomasa existente en la biosfera (Wang, 2002).

Cuadro 15. Análisis proximal de la materia prima empleada como soporte para la FMS

COMPONENTE	GUISHE	BAGAZO DE UVA	NOPAL
MS (%)	21.58	1.1	10.82
Humedad (%)	78.42	98.9	89.17
Cenizas (%)	3.93	4.03	17.90
Fibra cruda (%)	36.7	19.73	11.48
Extracto etéreo (%)	0.5	3.35	1.53
Proteínas (%)	0.57	8.20	7.87
Azúcares totales (g/L)	248.82	200.0	38.0
Azúcares reductores (g/L)	102.05	80.04	45.17

El cuadro 16 muestra los resultados obtenidos de actividad acuosa para la materia prima empleada como soporte para la FMS donde se puede observar la actividad de agua promedio de cada uno de los sustratos, según (Carrillo, 2007) evaluó crecimiento de *Rhizopus oryzae*, hongo deteriorativo de alimentos, en función de la temperatura, la actividad de agua (a_w) y el pH. Las curvas de crecimiento de *Rhizopus oryzae* se generaron a las condiciones de temperatura (20 y 30 °C), a_w (0.695 y 0.654) y pH (3 y 5) dadas por un diseño factorial completo. Dichas curvas se obtuvieron al graficar el diámetro de las colonias contra el tiempo y se ajustaron con el modelo de Baranyi para obtener los parámetros de crecimiento (velocidad específica de crecimiento, tiempo de latencia y crecimiento máximo), a partir de los cuales se generó un modelo polinomial. El análisis estadístico indicó que todos los factores ejercen un efecto significativo ($p < 0.001$) sobre el crecimiento del hongo.

Cuadro 16. Determinación de A_w en la materia prima empleada como soporte

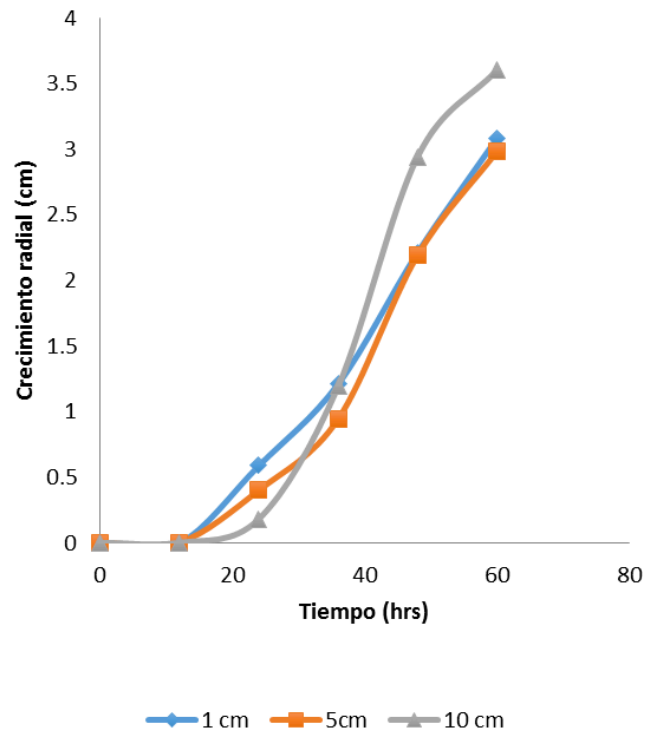
MUESTRA	A_w	Temperatura (C)
Guishe	0.530	25.5
Bagazo de uva	0.547	25.9
Nopal	0.553	25.6

Etapa III

4.3 Selección de una cepa en base al crecimiento radial sobre la materia prima:

4.3.1 Crecimiento radial de microorganismos en guishe (R_1)

Los resultados obtenidos sobre el crecimiento radial se muestran en la figura 8 observado en la cepa M_4 empleando guishe como sustrato en 3 tamaños de partícula, donde se observa que a partir de las 12 h el microorganismo entra en fase exponencial observándose diferencias significativas entre el tamaño de partícula de 10 cm con respecto a los de 5 y 1 cm.



En la figura 9 se muestran los resultados obtenidos del crecimiento radial de la cepa M_5 sobre el guishe con tres tamaños de partícula donde se observa que a partir de las 24 h el hongo entra en fase exponencial sin observarse diferencias significativas entre los tamaños de partícula evaluados. Es importante mencionar que el desarrollo fúngico solo ocurre en condiciones favorables, ya que se necesitan de varios nutrientes para hacer frente a sus requerimientos energéticos y para formar macromoléculas tales como proteínas y ADN, además son incapaces de sintetizar carbohidratos (Parra, 2004).

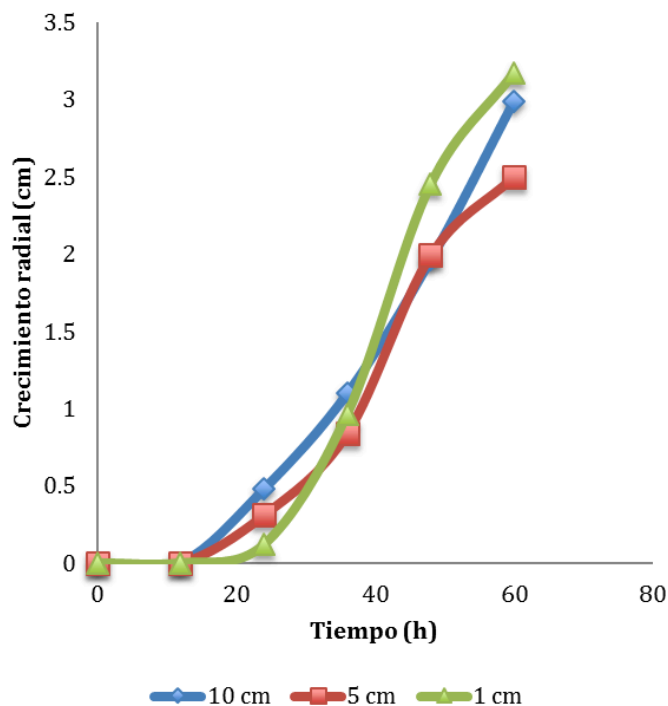


Figura 9. Crecimiento radial de la cepa M_5 sobre guishe empleando 3 tamaños de partícula

El cuadro 17 presenta las velocidades específicas de crecimiento empleando el guishe como sustrato en placa, donde la máxima velocidad se obtiene empleando la cepa M_4 con un valor de 0.1001 cm/h con guishe de un tamaño de 10 cm, observando una diferencia significativa entre los distintos tamaños de partícula; mientras que en el M_5 la máxima velocidad de crecimiento se observa empleando un tamaño de partícula de 1 cm. El rápido crecimiento radial puede ser debido a la cantidad de azúcares reductores disponibles en el guishe el cual es de 102 g/L.

Cuadro 17. Velocidades específicas de crecimiento de las diferentes cepas empleando guishe como sustrato

Tamaño de partícula (cm)	M_4 (cm/h)	M_5 (cm/h)
10	0.1001 _b	0.0699 _a
5	0.0749 _a	0.0642 _a
1	0.0706 _a	0.0886 _b

4.3.2 Crecimiento radial de microorganismos en bagazo de uva (R₂)

La figura 10 muestra el crecimiento radial del hongo M₄ empleando bagazo de uva como sustrato, en el que se observa que a mayor tamaño de partícula mayor velocidad de crecimiento presenta el microorganismo con valores de 0.0786 cm/h; Grau (2007) estudia el crecimiento microbiano de *Aspergillus terreus* empleando extracto de malta como sustrato observando velocidades de crecimiento de 0.235 mm/h. Cabe señalar que al considerar las distintas fases de la curva de crecimiento de los microorganismos estudiados (M₄ y M₅), no muestran una marcada diferencia en los periodos de adaptación o preparación a las condiciones medio ambientales (fase lag). Después de alcanzar el máximo crecimiento el hongo debe entrar en una fase estacionaria, la cual no se observa en los gráficos; sin embargo, es importante señalar que el crecimiento de los hongos filamentosos es un fenómeno muy complejo que involucra cambios morfológicos, moleculares y celulares, que dependen en gran parte de las condiciones ambientales (Koneman, 1996). Sin embargo, en las especies estudiadas no se observaron cambios en las estructuras celulares.

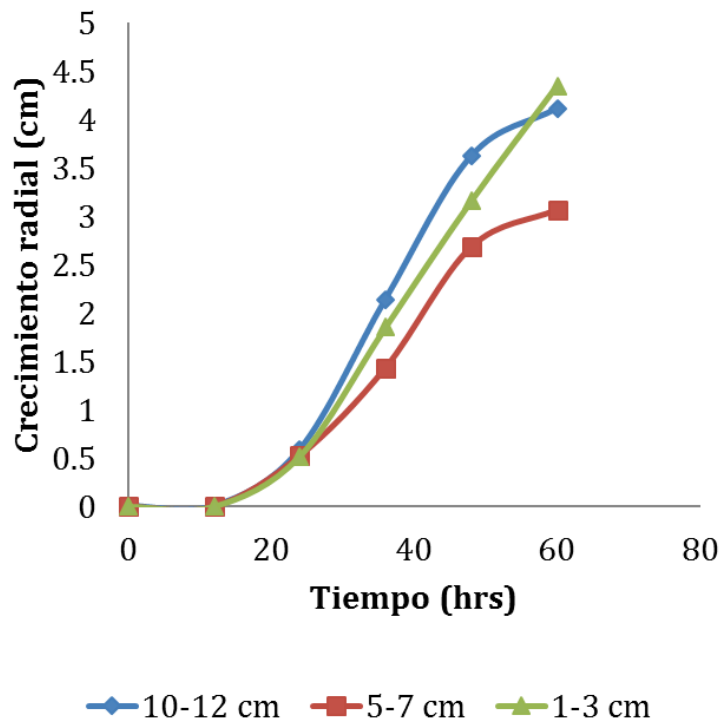


Figura 10. Crecimiento radial de la cepa M_4 sobre bagazo de uva empleando 3 tamaños de partícula

El crecimiento fúngico es influenciado por una variedad de interacciones de factores intrínsecos y extrínsecos. La temperatura, el tiempo, la humedad, consumo de gases, agentes antimicrobianos son algunos de los factores que pueden ser evaluados en un sistema de crecimiento. (Lopez-Malo, 2002). La figura 11 muestra el comportamiento de crecimiento del hongo M_5 empleando bagazo de uva como sustrato mostrando una velocidad específica de crecimiento mayor con un tamaño de partícula de 5 cm de 0.0786 cm/h. López-Malo (2005) evaluó el crecimiento de *Aspergillus flavus* en PDA obteniendo un crecimiento radial de 0.285 mm/h a un pH de 4.5.

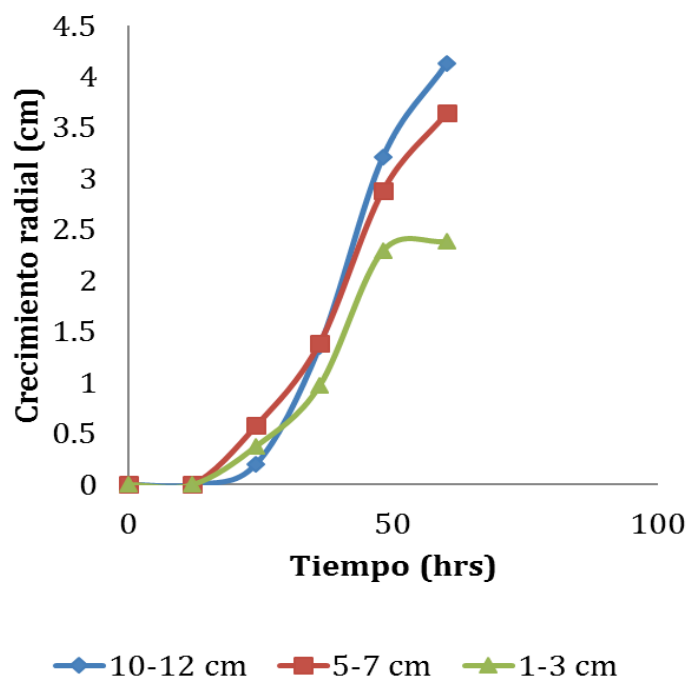


Figura 11. Crecimiento radial de la cepa M₅ sobre bagazo de uva empleando 3 tamaños de partícula

El cuadro 18 muestra las velocidades específicas de crecimiento de las cepas M₄ y M₅ empleando bagazo de uva como sustrato, encontrando que a mayor tamaño de partícula existe una mayor velocidad de crecimiento del hongo. Empleando un tamaño de partícula de 5 cm el crecimiento radial del hongo es estadísticamente diferente ($P > 0.05$) al crecimiento empleando un tamaño de partícula de 1 y 0.5 cm.

Cuadro 18. Velocidades específicas de crecimiento de las diferentes cepas empleando bagazo de uva como sustrato

Tamaño de partícula (cm)	M ₄ (cm/h)	M ₅ (cm/h)
5	0.0786 _b	0.0831 _b
1	0.0678 _a	0.0658 _a
0.5	0.0775 _a	0.0692 _a

4.3.3 Crecimiento radial de microorganismos en nopal (R₃)

Gran parte de la productividad de los cultivos está determinada por la fertilidad del suelo (Barea, 1991). Esa fertilidad puede ser evaluada con base en sus características físicas (densidad, estructura, porosidad, etc.), químicas (actividad de las arcillas, potenciales de óxido-reducción, materia orgánica, etc.) y biológicas (microorganismos que conforman la microflora y microfauna, además de la meso y macrofauna). Las interacciones que se derivan de estas tres características producen cambios significativos en los ciclos biogeoquímicos del suelo y en la disponibilidad de nutrientes para las plantas. Además, estas interacciones permiten que las comunidades vegetales también contribuyan a la estabilidad del suelo como componente integral del ecosistema o agroecosistema en cuestión. Con base a lo anterior, no se observó crecimiento microbiano sobre *Opuntia ficus indica* empelando 3 tamaños de partícula, lo que hace suponer que el microorganismo requiere de un proceso de inducción para poder producir la enzima celulasa y degradar la pared celular del nopal para metabolizarlo y de esta forma crecer.

Etapa IV

4.4. Determinación de la actividad enzimática en cada uno de los sustratos:

La cinética enzimática estudia la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas. (Yegres, 2011) Estos estudios proporcionan información directa acerca del mecanismo de la reacción catalítica y de la especificidad del enzima. La velocidad de una reacción catalizada por un enzima puede medirse con relativa facilidad, ya que en muchos casos no es necesario purificar o aislar el enzima. La medida se realiza siempre en las condiciones óptimas de pH, temperatura, presencia de cofactores, etc., y se utilizan concentraciones saturantes de sustrato. (Araujo, 2009) En estas condiciones, la velocidad de reacción observada es la velocidad máxima (V_{max}). La velocidad puede determinarse bien midiendo la aparición de los productos o la desaparición de los reactivos.

4.4.1 Determinación de actividad endo-glucanasa en Guishe

la actividad enzimática es la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 μmol de sustrato en un minuto, esta actividad está dada por el complejo enzimático que cataliza la reacción. En la figura 11 se cuantifica la actividad endo-glucanasa en FMS. Utilizando guishe como soporte

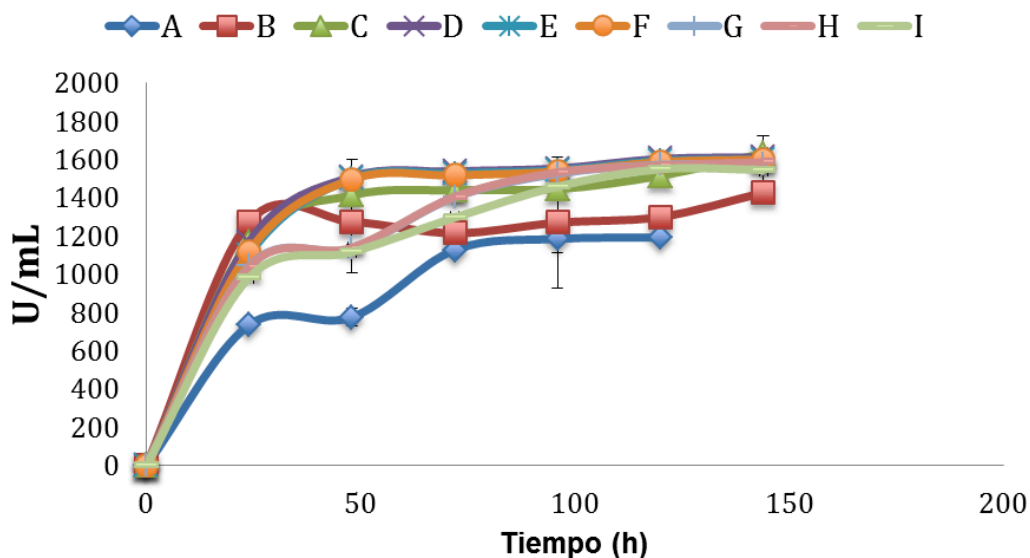


Figura 11. Cuantificación de actividad endo-glucanasa en FMS empleando guishe como soporte bajo diversas condiciones de estudio.

La fermentación "F" muestra una mayor actividad enzimática con un valor de 1600.8 U/ml. en las siguientes condiciones. Un tamiz de 3.5 cm, un empaque de 100g/l, una relación de C:N de 8 g/l, y una aireación de 0.8 l/min. En cuanto este tipo de actividad Rodríguez 2007 realizó una investigación donde se evalúa la producción de celulasas mediante el cultivo de *Trichoderma viride* sobre los racimos vacíos. Los residuos se someten a pretratamientos químicos (HNO_3 0,5% y 1%) y biológicos (precultivo con *P. ostreatus* durante 10 y 20 días), con el fin de designificarlos y favorecer la producción de celulasas. La evaluación de las actividades celulasa total (FPasa) y endoglucanasa (CMCasa), se realiza a los ocho días de cultivo en fermentación en fase sólida utilizando los residuos pretratados como sustrato, suplementando con dos fuentes de nitrógeno inorgánicas

($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ y NaNO_3). Las mayores actividades celulolíticas se encuentran en cultivos realizados con pretratamiento biológico y NaNO_3 como fuente de nitrógeno, con valores de 0,374 U/mL de FPasa y 0,776 U/mL de CMCasa; una unidad (U) de actividad es la cantidad en μmoles de azúcares reductores (glucosa) producidos por minuto.

4.4.2 Modelado con Luederking y Piret de la actividad endo-glucanasa en Guishe.

Los modelos matemáticos son utilizados frecuentemente para describir procesos químicos, físicos o biológicos. El comportamiento de la mayoría de estos procesos pueden ser descrito en general por un sistema de ecuaciones diferenciales algebraicas. En las figuras siguientes se muestran los modelos para la actividad endo-glucanasa para cada una de las fermentaciones propuestas (ver cuadro 10)

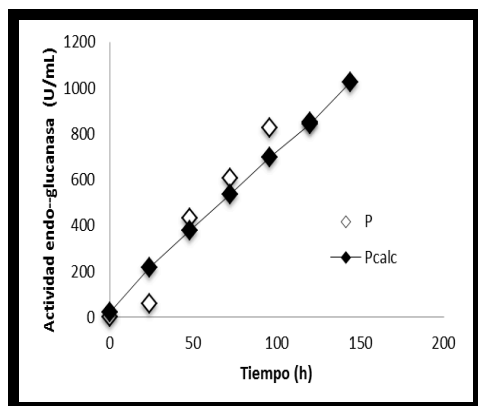


Figura 11. Modelado de la actividad endo-glucanasa fermentación "A"

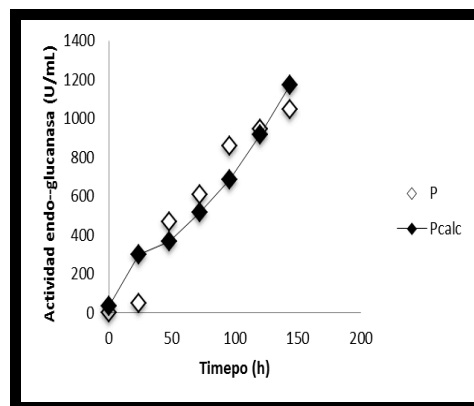


Figura 12. Modelado de la actividad endo-glucanasa fermentación "B"

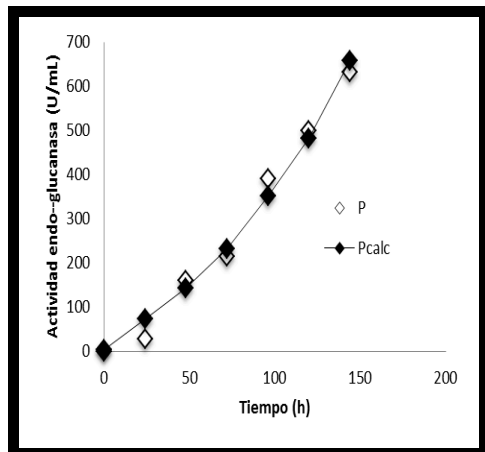


Figura13. Modelado de la actividad endo-glucanasa fermentación "C"

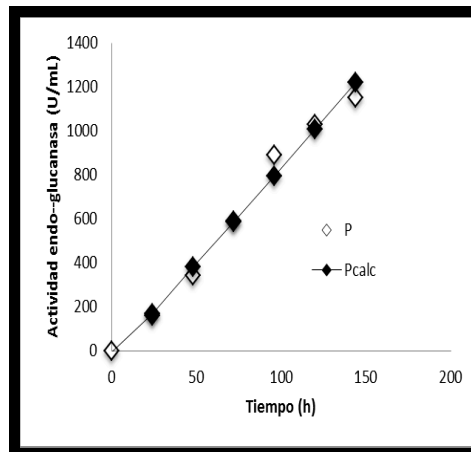


Figura14. Modelado de la actividad endo-glucanasa fermentación "D"

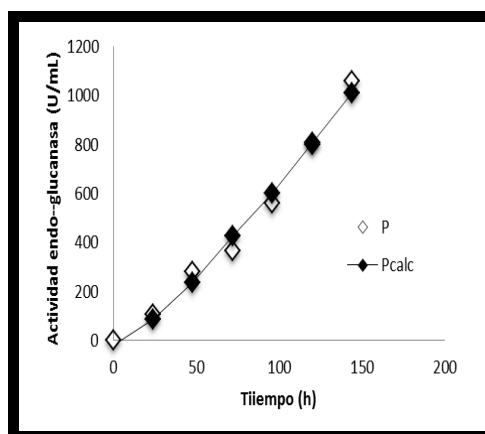


Figura15. Modelado de la actividad endo-glucanasa fermentación "E"

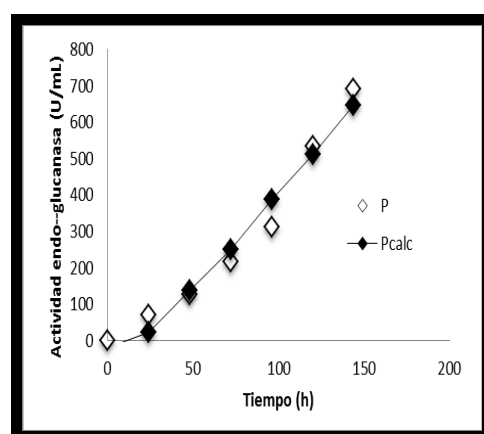


Figura16. Modelado de la actividad endo-glucanasa fermentación "F"

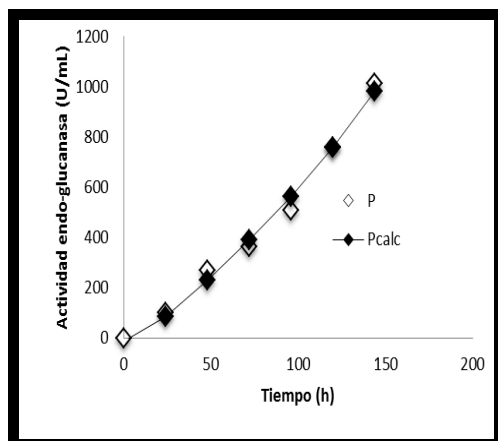


Figura17. Modelado de la actividad endo-glucanasa fermentación "G"

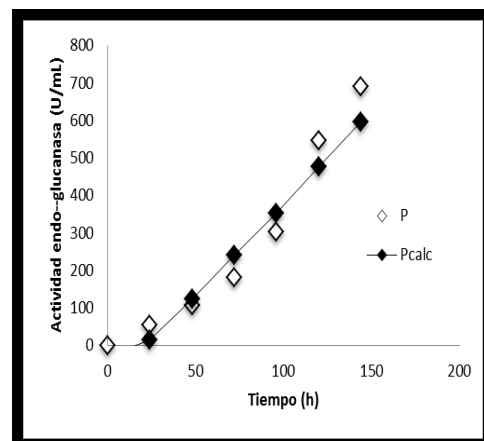


Figura18. Modelado de la actividad endo-glucanasa fermentación "H"

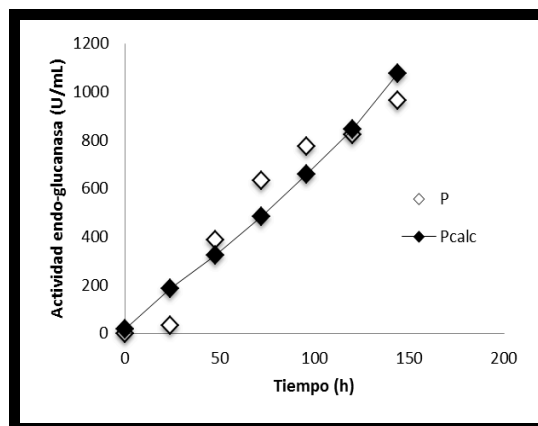


Figura 19. Modelado de la actividad endo-glucanasa fermentación "I"

Los resultados obtenidos mediante el modelado de **Luederking y Piret** como muestran cada una de las figuras son similares al de la actividad endo-glucanasa real que se obtuvo en cada una de las fermentaciones tal como muestra el cuadro 19. El cual arroja a la fermentación B como las mejores condiciones para la expresión de la actividad endo-glucanasa relacionando la mayor velocidad de crecimiento y la mayor formación de producto. Y referenciando sobre la importancia de los modelos (Montoya, 2015) realizo una investigación donde se cultivó *Coriolus versicolor* sobre 12 formulaciones de sustrato en estado sólido empleando mezclas de materiales lignocelulósicos, carbonato de calcio y dos niveles de sulfato de cobre (II). El objetivo de este trabajo fue proponer un modelo matemático compuesto de ocho ecuaciones diferenciales para la descripción de los datos experimentales de todas las combinaciones resultantes para *C. versicolor* durante 49 días de fermentación: producción de biomasa, producción y consumo de azúcares reductores, consumo de celulosa y degradación de lignina, producción de las enzimas: lacasa (LAC), manganeso peroxidasa (MnP), endoglucanasa (ENG), exoglucanasa (EXG), β -glucosidasa (BG). *C. versicolor* creció adecuadamente sobre todas las formulaciones de sustrato y los títulos enzimáticos mostraron variación con las formulaciones de sustrato. El ajuste del modelo a los datos experimentales se realizó planteando una prueba F de una cola. En este trabajo se presentan comparaciones entre los resultados del modelamiento para las formulaciones F2 y F3 en producción de LAC y MnP y degradación de lignina; así también se compararon las formulaciones F5 y F8 para el

consumo de celulosa y los títulos enzimáticos de ENG, EXG y BG. Igualmente, se muestran los resultados del modelamiento matemático para la formulación F9, ya que sobre ésta el hongo exhibió la mayor capacidad de degradación de celulosa y lignina en los 49 días de fermentación en fase sólida

Cuadro 19. parámetros cinéticos de la actividad endo-glucanasa en Guishe.

FERMENTACION	m max	Xo	Xmax	Y p/x	β	qp
A	0.0018	0.001	0.67	74.0135	16.7450	0.1332
B	0.0145	0.001	1.17	114.5551	29.9449	1.6610
C	0.0129	0.001	1.21	17.0955	18.8915	0.2205
D	0.0016	0.001	1.54	11.9703	8.6819	0.0191
E	0.003	0.001	1.09	77.0258	19.2720	0.2310
F	0.0032	0.001	1.528	60.7128	10.1107	0.1942
G	0.0056	0.001	1.692	43.1699	18.4388	0.2417
H	0.0031	0.001	0.983	100.8462	14.4468	0.3126
I	0.0055	0.001	0.941	71.6955	28.3080	0.3943

4.4.3. Cuantificación de la actividad exo-glucanasa en guishe (S1)

La actividad de exoglucanasas cliva los extremos accesibles de la molécula de celulosa para liberar glucosa y celobiosa. La celulosa microcristalina es un sustrato adecuado para la medición de la actividad por tener bajo grado de polimerización y una baja accesibilidad (Lynd et. al 2005). La figura 19 muestra la actividad exoglucanasa usando guishe como soporte, y en él se

puede apreciar que la fermentación “F” muestra una mayor actividad enzimática con 1589 U/ml en 144 horas.

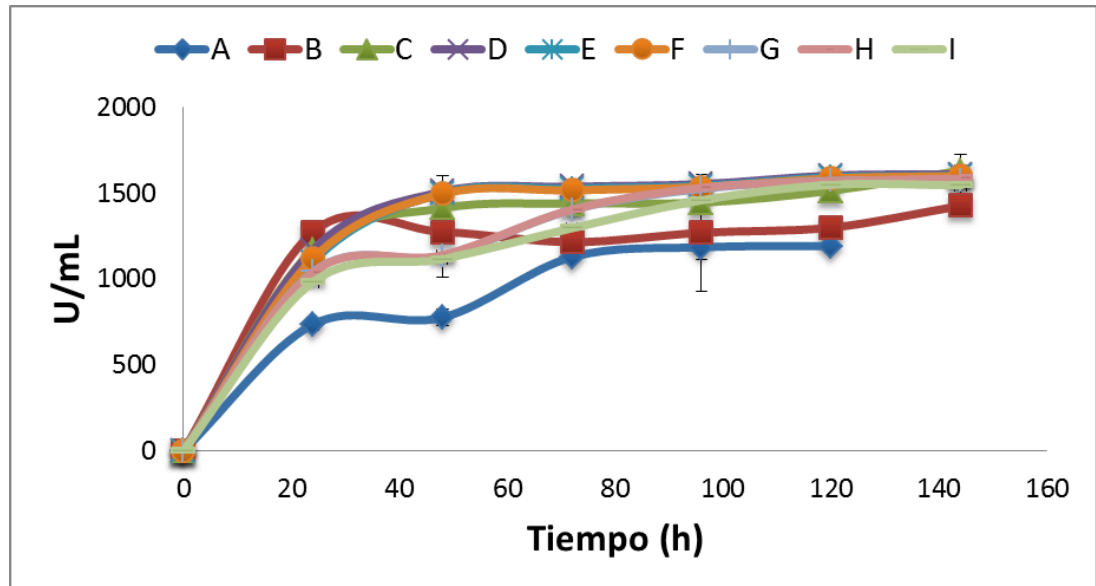


Figura 19. Actividad exo-glucanasa en cada una de las fermentaciones

4.4.4 Modelado con Luederking y Piret de la actividad exo-glucanasa en Guishe.

La importancia de la actividad exoglucanasas es que hidrolizan los enlaces glicosídicos interiores de las cadenas de celulosa, iniciando la hidrolisis en zonas amorfas y tienen como producto cadenas de celulosa con menor grado de polimerización. En las figuras siguientes se muestra el modelado de dicha actividad para cada una de las diferentes fermentaciones.

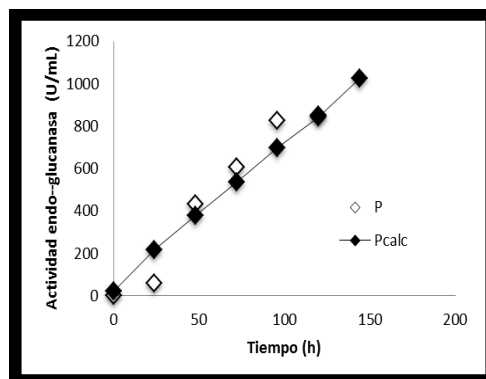


Figura 20. Modelado de la actividad exo-glucanasa fermentación “A”

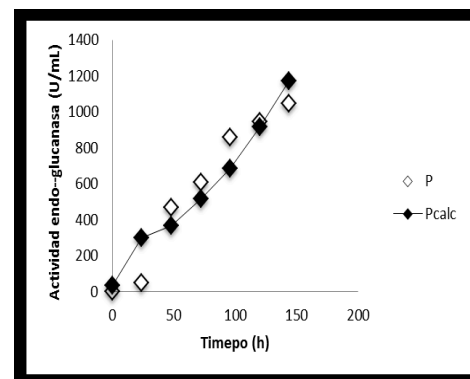


Figura 21. Modelado de la actividad exo-glucanasa fermentación “B”

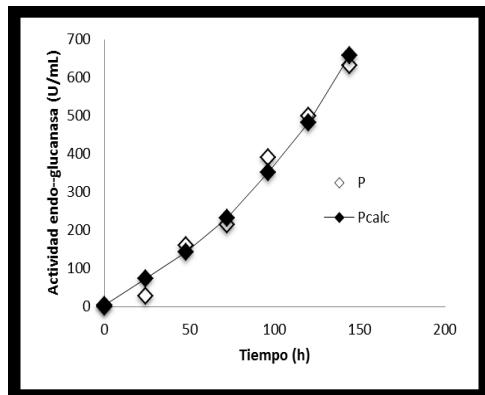


Figura 22. Modelado de la actividad exo-glucanasa fermentación "C"

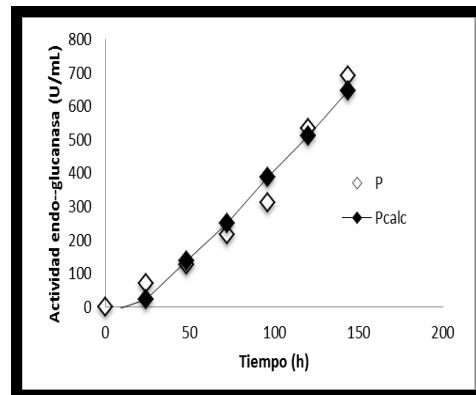


Figura 23. Modelado de la actividad exo-glucanasa fermentación "D"

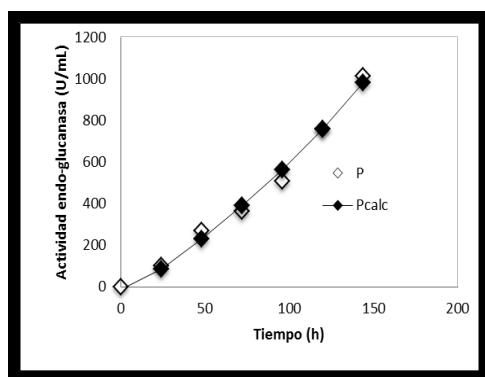


Figura 24. Modelado de la actividad exo-glucanasa fermentación "E"

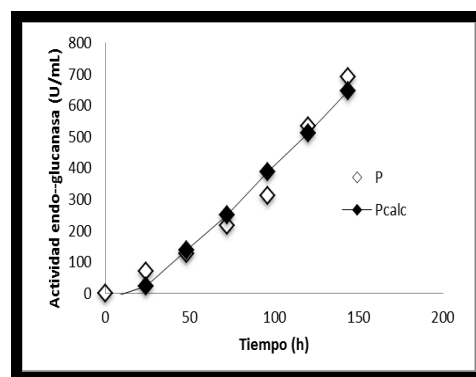


Figura 25. Modelado de la actividad exo-glucanasa fermentación "F"

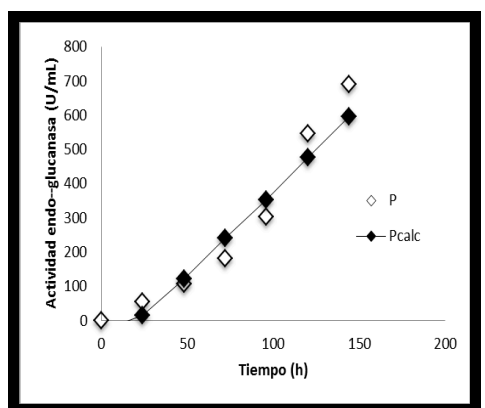


Figura 26. Modelado de la actividad exo-glucanasa fermentación "G"

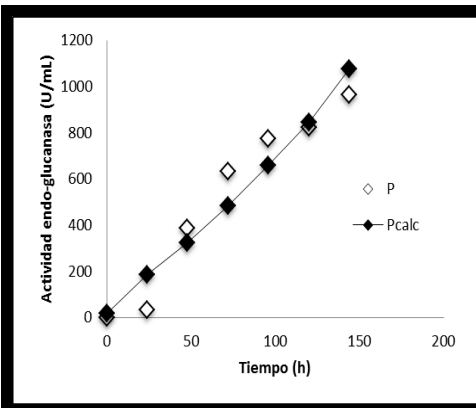


Figura 27. Modelado de la actividad exo-glucanasa fermentación "H"

Según los resultados expresados la fermentación “H” presenta una mayor actividad endoglucanasa con 1210 U/ml. (Madamwar, 2002) investigaron un sistema celulasa con alta actividad hidrolítica, obtenido por *Trichoderma reesei* y *Aspergillus niger* el cultivo fue desarrollado en medios de bagazo, mazorcas de maíz y aserrín como sustratos celulósicos, resultando el cultivo con bagazo con la mayor actividad y el cultivo con aserrín con menor actividad, esto quizás relacionado con el grado de polimerización y las condiciones de las fermentaciones a las que estuvo expuesto el sustrato. (Patel, 2002)

Los modelos relacionan adecuadamente el crecimiento del hongo y las actividades endoglucanasas en el proceso fermentativo por lo que se considera adecuado evaluar procesos de producción enzimática en sistemas solidos a semiescala.

4.4.6 Cuantificación de la actividad exo-glucanasa en bagazo de uva (S2)

En el caso de los resultados de la actividad exo-glucanasa en el bagazo de uva se puede observar que la mayor cantidad de actividad enzimática es dada por la fermentación “E” 2005 U/ml.y sus condiciones en particular pueden observarse en el cuadro 10.

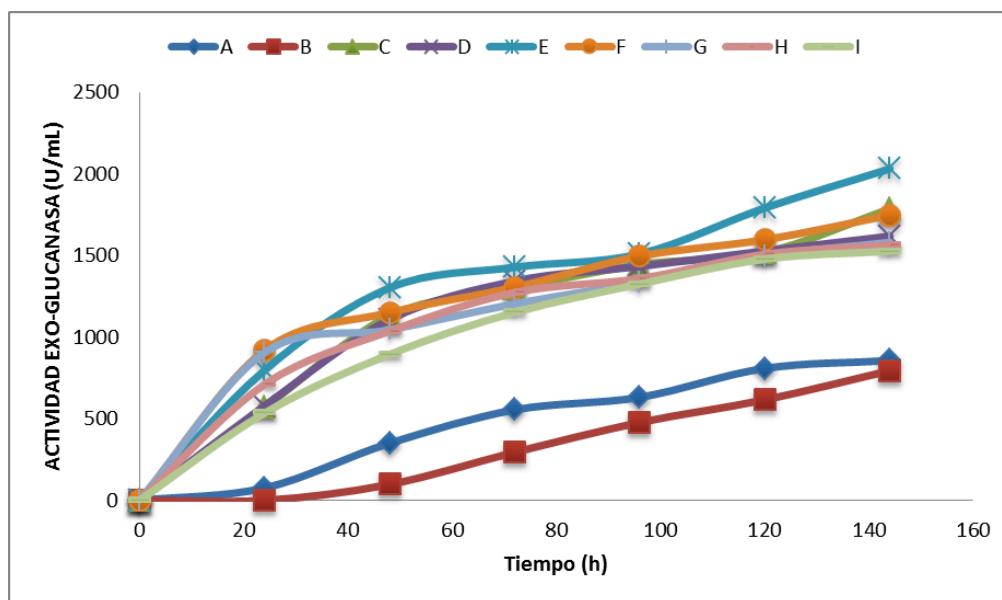


Figura 28. Actividad exo-glucanasa en bagazo de uva.

4.4.7 Modelado con Luederking y Piret de la actividad exo-glucanasa en S2

a continuación, se muestra una serie de figuras 29 – 37 respectivamente de cada una de las fermentaciones y los valores de cada uno de los modelos y se puede observar que el modelo propuesto se ajusta correctamente a los resultados obtenidos. El modelo preferido para la interacción enzima sustrato es el de ajuste inducido, este modelo propone que la interacción inicial entre la enzima y el sustrato es relativamente débil, pero que estas interacciones débiles rápidamente inducen cambios conformacionales que fortalecen la unión (García, 2007)

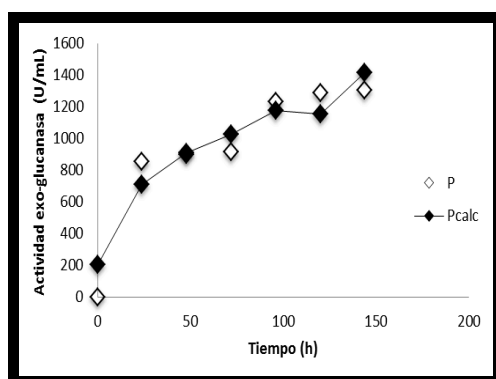


Figura 29. Modelado de la actividad exo-glucanasa fermentación "A"

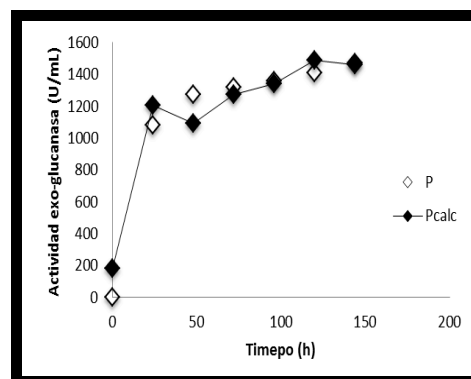


Figura 30. Modelado de la actividad exo-glucanasa fermentación "B"

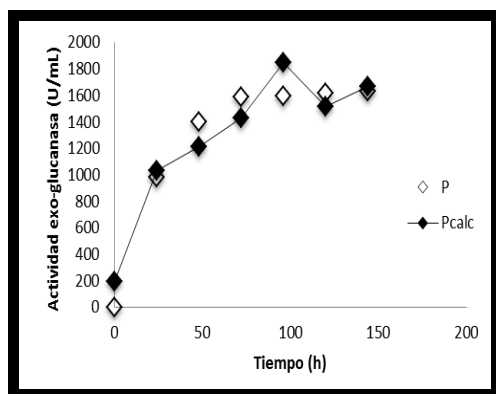


Figura 31. Modelado de la actividad exo-glucanasa fermentación "C"

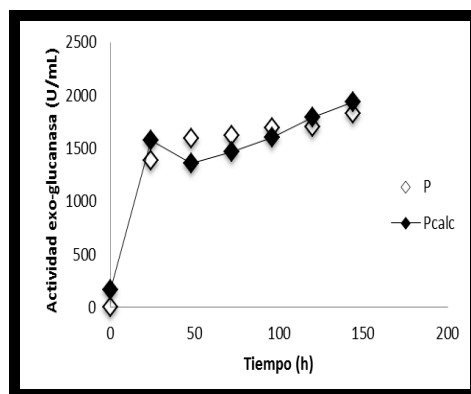


Figura 32. Modelado de la actividad exo-glucanasa fermentación "D"

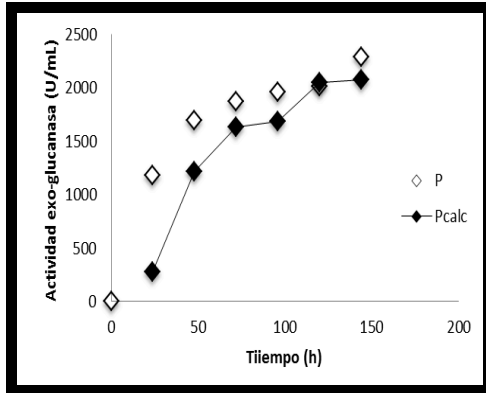


Figura 33. Modelado de la actividad exo-glucanasa fermentación "E"

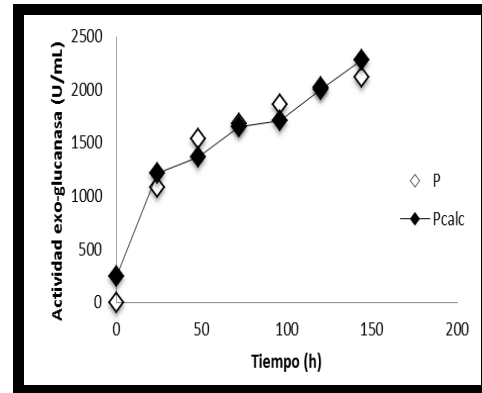


Figura 34. Modelado de la actividad exo-glucanasa fermentación "F"

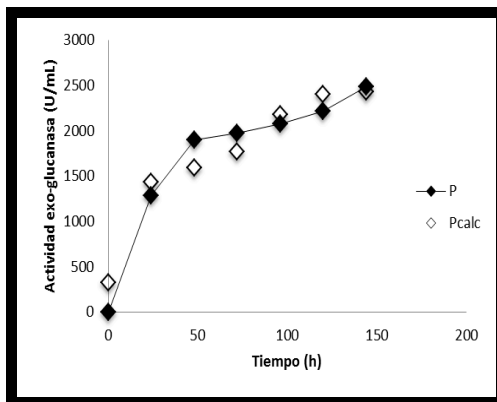


Figura 35. Modelado de la actividad exo-glucanasa fermentación "G"

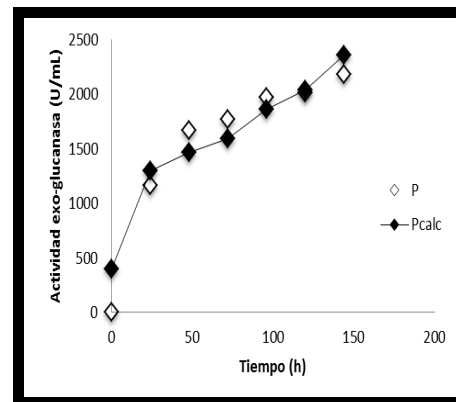


Figura 36. Modelado de la actividad exo-glucanasa fermentación "H"

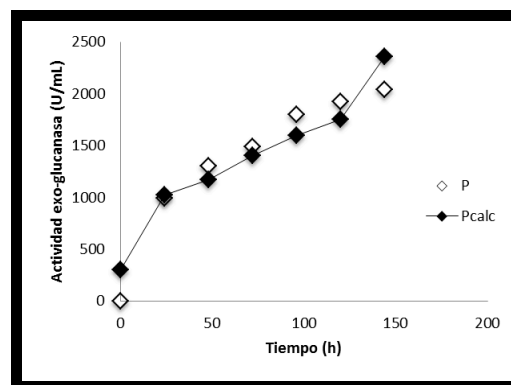


Figura 37. Modelado de la actividad exo-glucanasa fermentación "I"

4.4.7 Parámetros cinéticos de la actividad exo-glucanasa en bagazo de uva (S2)

Como muestra el cuadro 20. La mayor velocidad de crecimiento 0.0145 cm/h. está dada por la fermentación “B” y la mayor formación de producto por la fermentación “H” con un valor de 1312.9705 U. y la más alta formación de biomasa 1.692 g/L se expresa en la fermentación “G” esto dado a las diferentes condiciones a los que se sometieron los sustratos. Steiner et al 1994 estudiaron algunos de los parámetros como fuente de carbono y nitrógeno y los efectos de la temperatura y el pH sobre la estabilidad de las enzimas celulolíticas producidas por una cepa de *Aspergillus sp.* Los resultados que se obtuvieron mostraron que las enzimas son estables con una temperatura de 50 °C. y pH de 4.4 y 5.6. Durante 48 horas empleando como fuente de carbono paja de trigo y trigo integral, siendo la primera la de mayor actividad enzimática. (Levin y Forchiassiin 2006) investigaron la capacidad celulolítica de *Trametes trogii* en relación con la variación de la fuentes carbonadas y nitrogenadas presentes en el medio de cultivo. Entre las fuentes de carbono la celulosa cristalina, la celobiosa y una mezcla de CMC y celobiosa resultaron en la mayor producción enzimática. La concentración óptica de la fuente de carbono fue de 10g/L

Cuadro 20. Parámetros cinéticos de la actividad exoglucanasa en bagazo de uva

FERMENTACION	μ_{max}	Xo	Xmax	Y p/x	β	qp
A	0.0018	0.001	0.67	673.1743	12.8740	1.2117
B	0.0145	0.001	1.17	580.5168	12.1225	8.4174
C	0.0129	0.001	1.21	683.6309	6.0943	8.8188
D	0.0016	0.001	1.54	537.5679	3.0399	0.8601
E	0.003	0.001	1.09	1038.2880	4.9462	3.1148
F	0.0032	0.001	1.528	741.6343	3.2257	2.3732
G	0.0056	0.001	1.692	1210.6376	-22.1774	6.7795
H	0.0031	0.001	0.983	1312.9705	3.3015	4.0702
I	0.0055	0.001	0.941	1122.2709	16.2408	6.1724

4.4.8. Cuantificación de la actividad endo-glucanasa en bagazo de uva (S2)

Al igual como muestra la gráfica de actividad endo-glucanasa en guishe la fermentación "H" FIGURA 38. Tiene la mayor actividad con 2312 U/ml. Confirmando que son las condiciones de tamiz 1.8cm, empaque 80g/L. relación C:N de 8 g/L y una aireación de 1.2 L/min las que permiten una mejor actividad endoglucanasa. Esto debido al menor tamaño de partícula que se utilizó dado que se amplía el área de contacto entre el microorganismo y el sustrato. (Ibarra, 2002) realizó un experimento donde determino la influencia de la aireación en la biotransformación del bagazo de caña por la cepa *Trichoderma viride* M5-2 en un biorreactor estático de fermentación sólida, se utilizó un modelo lineal jerarquizado con dos factores: flujo de aire y tiempo. Este modelo estudió el comportamiento de las actividades CMCasa, PFasa y la proteína soluble. Los indicadores bromatológicos fibra neutra detergente (FND), fibra ácida detergente(FAD), proteína verdadera, celulosa y lignina se analizaron con respecto al tiempo de fermentación para los dos flujos de aire (20 y 30 L/min) mediante un diseño completamente aleatorizado con arreglo factorial de 2 x 2 con tres repeticiones. Además, se utilizó la comparación de Duncan para comparar las medias. Las mayores expresiones enzimáticas se obtuvieron a las 72 h de fermentación para ambos flujos de aire. Se alcanzaron valores de 42.58 UI/g MS de CMCasa y 11.26 UI/g MS de PFasa para un flujo de 20 L/min ($P < 0.001$) y 54.82 UI/g MS de CMCasa y 19.21 UI/g MS de PFasa para 30 L/min ($P < 0.001$) El contenido de celulosa del bagazo disminuyó en 5 unidades porcentuales y la proteína verdadera se incrementó en 6 unidades porcentuales cuando se utilizó una aireación de 30 L/min El pH alcanzó valores superiores a 7 después de las 72 h. La humedad también aumentó y varió de 65 a 73 %. Según los resultados se puede concluir que la utilización de un flujo de aire de 30 L/min, en la variante estática, favorece la eficiencia del proceso fermentativo. Se recomienda esta variante como una metodología para la producción de alimento animal a partir de desechos agroindustriales

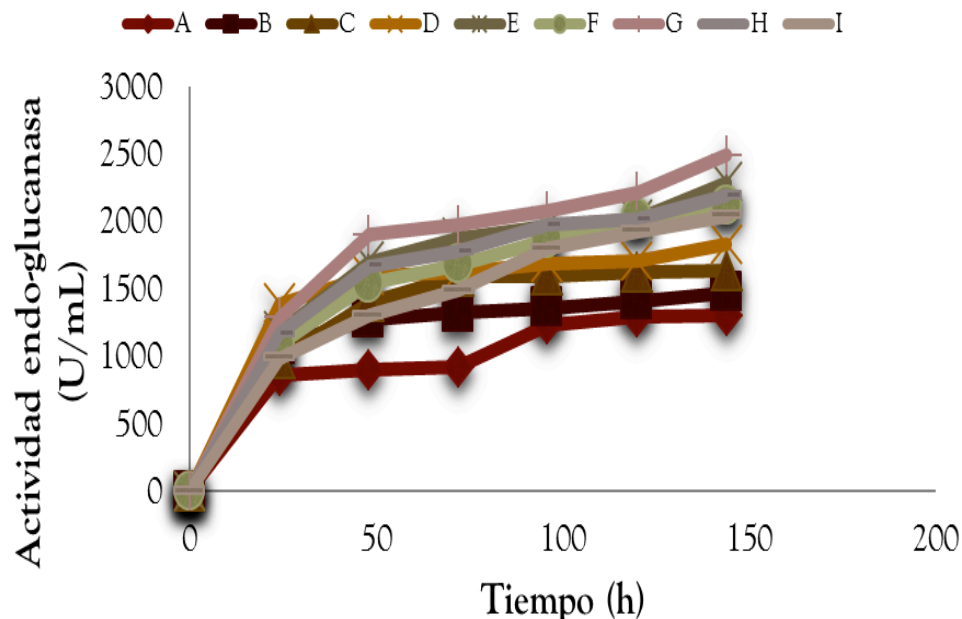


Figura 38. Actividad endoglucanasa en bagazo de uva

4.4.10. Modelado con Luederking y Piret de la actividad endo-glucanasa en S2

Los trabajos de laboratorio tienen como objetivo mejorar el valor nutritivo del producto y se realizan en frascos Roux (Ramos et al. 2006 y Ramos et al. 2007). Las investigaciones en piso se centran en estudios acerca de la altura de la cama de sólidos (Rodríguez et al. 2006 y Carrasco et al. 1997), el volteo del sustrato (Carrasco et al. 1997) y el tiempo de fermentación (Lezcano y Marti 1997). Las FES rústicas no solo se aplican en el ICA, sino que se utilizan en unidades de producción pecuaria (Lezcano et al. 1994). Así el desarrollo de modelos para describir los fenómenos biológicos y de transporte durante el proceso fermentativo mejoró la comprensión de muchos aspectos de la FES (Pandey 2003): la bioquímica, la ingeniería de procesos (Raghavarao et al. 2003), el diseño y la operación y escala de los biorreactores (Mitchell et al. 2003). La serie de figuras que se enlistan (39-47) a continuación muestran el modelo de la actividad endoglucanasa y reducida diferencia que existe entre los valores experimentales y los valores calculados.

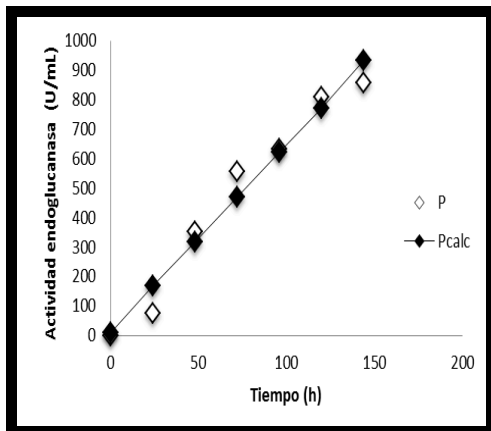


Figura 39. Modelado de la actividad endoglucanasa fermentación "A"

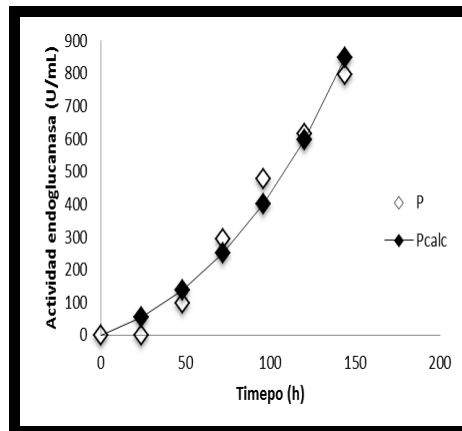


Figura 40. Modelado de la actividad endoglucanasa fermentación "B"

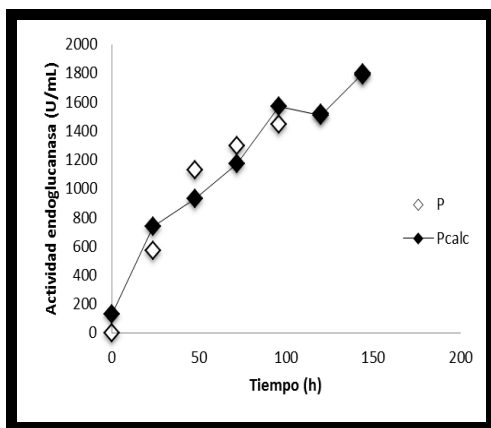


Figura 41. Modelado de la actividad endoglucanasa fermentación "C"

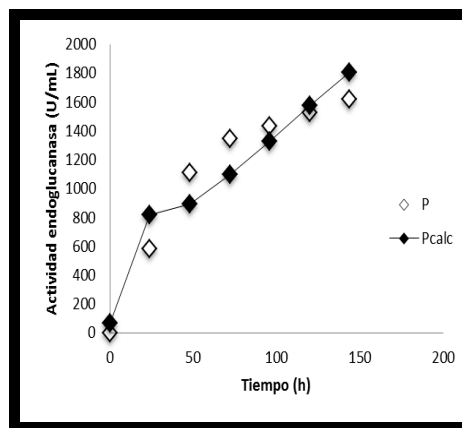


Figura 42. Modelado de la actividad endoglucanasa fermentación "D"

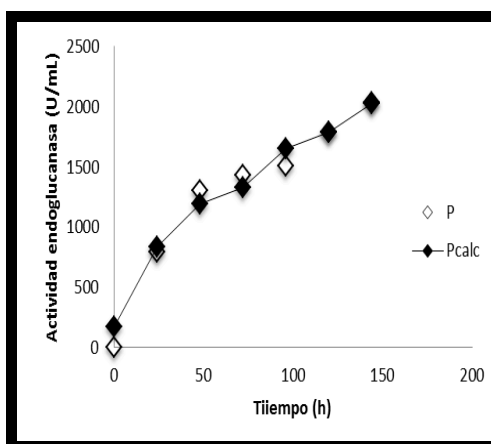


Figura 43. Modelado de la actividad endoglucanasa fermentación "E"

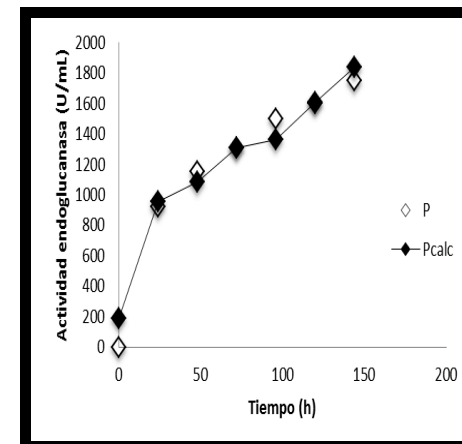


Figura 44. Modelado de la actividad endoglucanasa fermentación "F"

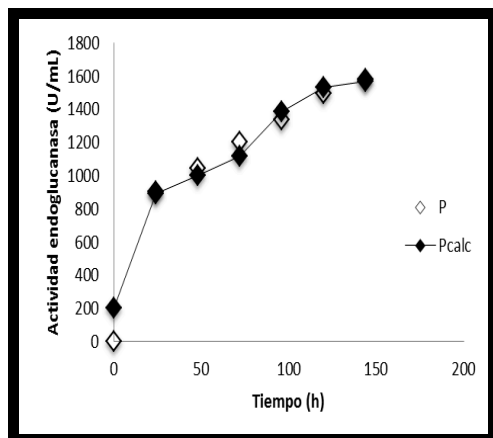


Figura 45. Modelado de la actividad endo-glucanasa fermentación "G"

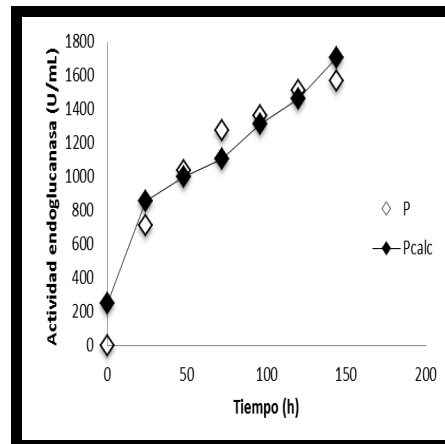


Figura 46. Modelado de la actividad endo-glucanasa fermentación "H"

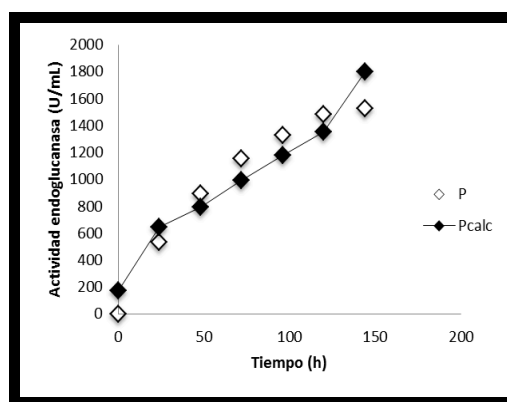


Figura 47. Modelado de la actividad endo-glucanasa fermentación "I"

4.4.11 Parámetros cinéticos:

4.4.11.1 cinética de formación de biomasa usando guishe:

El crecimiento celular es el resultado de las numerosas interacciones entre todas reacciones bioquímicas y fenómenos de transporte con múltiples fases y sistemas de otros componentes. En algunas ocasiones los medios se formulan de manera que solo un componente sea limitante de la velocidad de reacción (Raghavarao, 2003) La figura 48 se muestra el comportamiento de la producción de la biomasa en las diferentes fermentaciones en el cual se pueden observar dos fenómenos muy importantes el primero es el crecimiento acelerado de los microorganismos en la fermentación D, alcanzado 1.58 g de biomasa en medios de 48 horas pero su descenso es

prematureo quizás debido a una interacción con otro de los factores como la disponibilidad de sustrato.

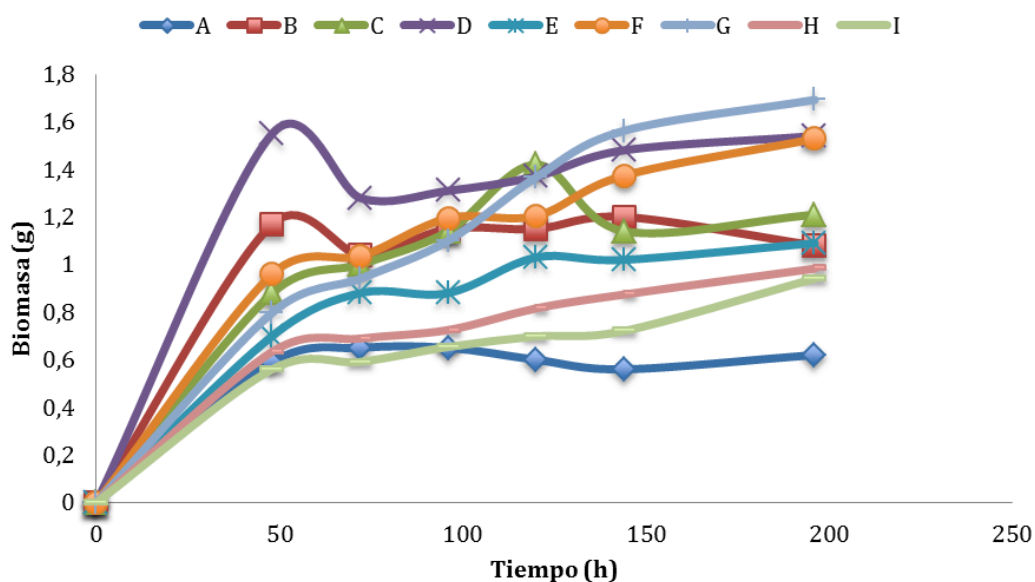


Figura 48. Cinética de formación de biomasa empleando guishe como Soporte en FMS

En el cuadro 22 se puede observar las distintas velocidades de crecimiento para cada una de las fermentaciones propuestas, la fermentación B tiene una mayor velocidad con 0.0244 g/h. La velocidad de crecimiento de los hongos filamentosos indica la capacidad del microorganismo para colonizar algún sustrato empleando procesos de fermentación en medio sólido. (Orzua, 2010) selecciono diez diferentes sustratos agroindustriales: barbas de coco, cascara de limón, cascara de naranja, bagazo de manzana, rastrojos de la vaina de frijol, residuos de lechuguilla, gobernadora, salvado de trigo, cascara de nuez, cascara de pistache. Realizando pruebas de humedad y curvas de secado en fermentación de medio sólido de *A. niger* el soporte fue evaluado en cajas Petri donde se colocó el soporte humedecido con el 70% adicionado con un medio rico en glucosa para posteriormente inocular las esporas 2×10^7 . Con los resultados obtenidos la cascara de manzana, limón y naranja son los soportes que mejor le permiten al hongo adaptarse y

crecer rápidamente ya que contiene gran cantidad de nutrientes, en cascara de coco y gobernadora el crecimiento es lento y en lechuguilla es nula quizá por los valores de humedad

Cuadro 22. Velocidades específicas de crecimiento de la cepa M4
Sobre guishe en FMS

Fermentación	μ (g/h)
A	0.0095
B	0.0244
C	0.0041
D	0.0095
E	0.005
F	0.0028
G	0.0085
H	0.0044

en la cinética de formación de biomasa en bagazo de uva figura 49. Se puede observar que en la fermentación A se cuantifica una mayor cantidad de biomasa 0.0113 g/h. sin embargo la fermentación F. cuadro 23, muestra un menor crecimiento al igual que el sustrato de guishe. Podría atribuirse a las condiciones que representa esta fermentación que no permite que el hongo puede crecer y colonizar el sustrato.

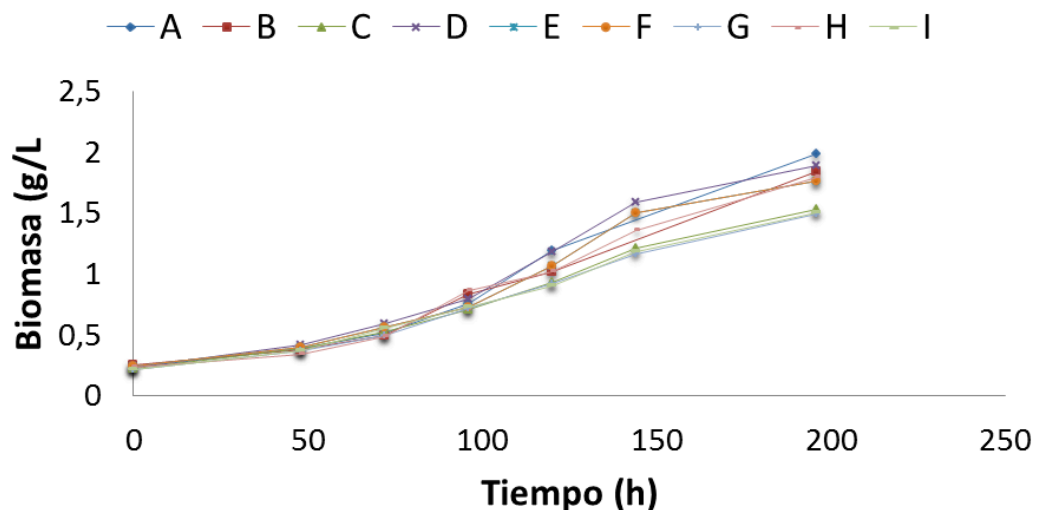


Figura 49. Cinética de formación de biomasa empleando bagazo de uva
Como soporte en FMS.

El hongo *Ganoderma lucidum*, en los constituyentes de su biomasa, tiene compuestos con propiedades benéficas; es por esto que el conocimiento de las condiciones nutricionales adecuadas para su crecimiento permitirá su producción industrial y a bajo costo. (Torres, 2011) evaluó a nivel de matraz el efecto de la relación C/N, y la presencia de diferentes fuentes de carbono, nitrógeno y micronutrientes sobre la producción de biomasa. Empleando glucosa y peptona como fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente, se encontró una relación C/N óptima de 16,7:1 para la cual la máxima producción de biomasa fue de 25 g/L. Manteniendo esta relación C/N, y sustituyendo la glucosa por lactosa o harina de cebada y la peptona por extracto de levadura, la producción de biomasa se incrementó a 35 g/L. En presencia de harina de cebada la adición al medio de cultivo de sales de Mg y K, y de tiamina, no generó un mayor incremento en la producción de biomasa. La producción de biomasa de *G. lucidum* se ve favorecida por la presencia en el medio de cultivo de relaciones C/N cercanas a las reportadas conforme a la composición típica de los hongos, así como por la presencia de sustratos complejos como la harina de cebada que le aportan

además de la fuente de carbono micronutrientes necesarios para su desarrollo.

Fermentación	μ (g/h)
A	0.0113
B	0.0101
C	0.0071
D	0.0108
E	0.0086
F	0.007
G	0.0098
H	0.0102
I	0.007

Cuadro 23. Velocidades específicas de crecimiento de la cepa M4 sobre uva en FMS

4.5. Análisis estadístico

4.5.1. Optimización de la producción de la enzima celulasa mediante FMS en al menos un sustrato. Actividad exo-glucanasa en guishe

El análisis de la varianza permite contrastar la hipótesis nula de que las medias de K poblaciones ($K > 2$) son iguales, frente a la hipótesis alternativa de que por lo menos una de las poblaciones difiere de las demás en cuanto a su valor esperado. Este contraste es fundamental en el análisis de resultados experimentales, en los que interesa comparar los resultados de K 'tratamientos' o 'factores' con respecto a la variable dependiente o de interés. En el cuadro 24 podemos observar que el factor que tiene un mayor porcentaje de varianza es la aireación 53.606%, y con ello podemos inferir que el factor más determinante para la actividad de endoglucanasas en el

guishe es el aire. Figura 50. El nivel de contribución para la actividad se encuentra expresado en el cuadro 25. Donde un nivel de 0.8 L/min de aire resulto ser el mejor nivel de todos los evaluados, la relación C: N de 0.048 g/L. es quien tiene el menor nivel de contribución para la expresión de actividad exoglucanasa

Cuadro 24. Análisis de varianza para actividad exo-glucanasa en guishe.

Colm/factor	DOF (F)	Sum of sqrs	Variance	f- radio	Pure sum	Porcent
AIRE	2	260184.96668	130092.493	-	130092.493	53.606
TAMIZ	2	69007.5585	34503.514	-	34503.514	14.217
C:N	2	74074.824	37037.412	-	37037.412	15.271
EMPAQUE	2	82.097	410.48.53	-	410.48.53	16.914

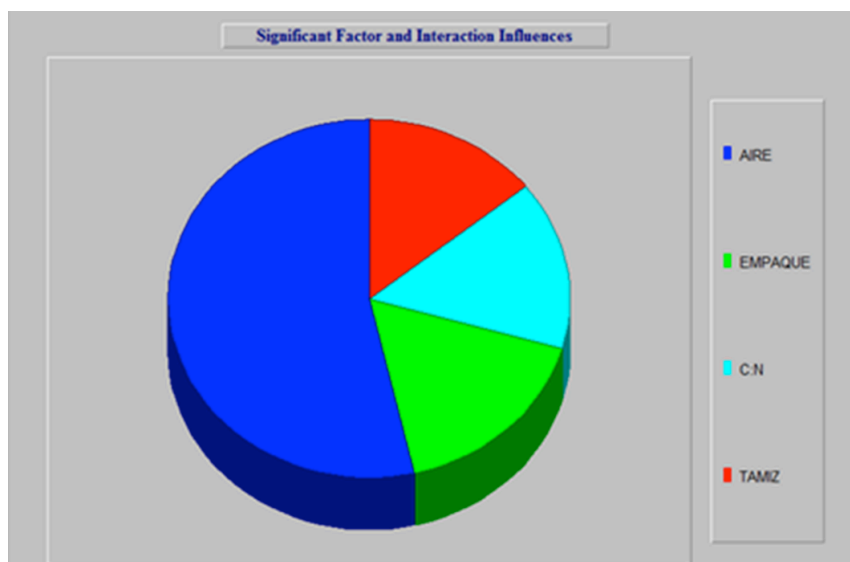


Figura 50. Actividad exo-glucanasa en guishe

Trujillo, 2016 realizo un estudio para optimizar parámetros para la producción de xilanasas. A partir de la cepa de *Rh pusillus* en fermentación en medios solido aplicando un diseño experimental Taguchi L9. Obteniendo datos estadísticos que demostró que el mayor valor fue de (83.69 U/gss) teniendo datos que registro con las condiciones de aire: 0.4 LPM, empaque

60 g/L. relación de C:N 8 y tamaños de la partícula de 0.5 mm siendo estos parámetros los más adecuados. (Figueroa, 2003) realizó un estudio para la estimación del coeficiente global de transferencia de calor en un reactor de charolas para fermentación en medios sólidos. Los resultados obtenidos muestran que el aumento de la altura del lecho disminuye el coeficiente de transferencia de calor (U), aumentando la acumulación de calor en el mismo. Aumentar el NRe de 1.5 a 4330 aumenta el valor de U en aproximadamente el doble, sin embargo, aumentar NRe de 4330 a 8630 reduce el valor de U, posiblemente por la formación de remolinos. La sobresaturación con agua del aire en el reactor aumentó el valor de U entre un 20 y 25 % respecto a experimentos similares sin sobresaturación. El aumento en U tiene un efecto positivo en la remoción de calor metabólico en el lecho de fermentación, ya que en el experimento que se realizó se observa una disminución en la acumulación de calor.

Cuadro 25. Optimización de parámetros de parámetros para producción de exoglucanasas en guishe

Column/factor	Level descripción	Level	Contribution
AIRE	0.8	2	240.55
TAMIZ	1	3	79.604
C:N	0.048	3	87.295
EMPAQUE	2.5	3	91.863

4.5.2. Optimización de la producción de la enzima celulasa mediante FMS en al menos un sustrato Actividad endo-glucanasa en guishe

la optimización de la producción de la enzima muestra como resultado del análisis de varianzas que para actividades endoglucanasas en el guishe la relación C: N (Cuadro 26) muestra un mayor porcentaje (47.397%) y la cantidad de empaque con (27.721%). Esto debido a la disponibilidad de la materia orgánica presente en el sustrato. Si el residuo de partida es rico en carbono y pobre en nitrógeno, la fermentación será lenta, las temperaturas no serán altas y el carbono se perderá en forma de dióxido de carbono. Para

el caso contrario, en altas concentraciones relativas de nitrógeno, éste se transformará en amoníaco, impidiendo la correcta actividad biológica.

(Figuroa, 2003) determino algunos valores de relación C/N para diversos residuos orgánicos. (datos de Nitrógeno y Carbono total de la fracción seca). Según el tipo de residuo orgánico, el cálculo de la relación C/N no es muy fiable ya que, aunque todo el Nitrógeno esté disponible, o sea biodegradable, solamente una fracción de Carbono puede serlo. De este modo, la relación C/N puede variar (incluso duplicarse) según se considere el Carbono Orgánico Total o el Carbono Orgánico Disponible. En la figura 48 se muestra la proporción del efecto de la relación C:N de la actividad endoglucanasa junto con los otros factores como el tamiz, la aireación y la cantidad de empaque.

Cuadro 26. Análisis de varianza para actividad endoglucanasas en guishe

Colm/factor	DOF (F)	Sum of sqrs	Variance	f-radio	Pure sum	Porcent
AIRE	2	21191.597	10595.798	-	21191.597	14.779
TAMIZ	2	23100.518	11550.259	-	23100.518	16.111
C:N	2	59357.14	29698.57	-	59357.14	41.397
EMPAQUE	2	39733.548	19866.774	-	39733.548	27.721

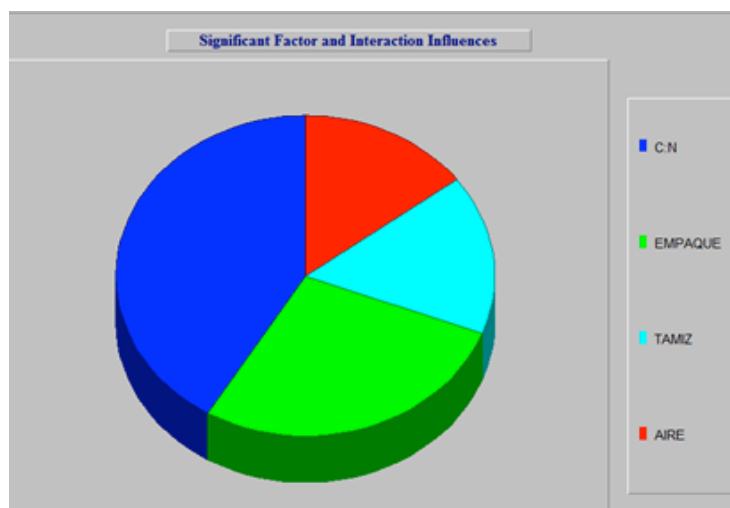


Figura 51. Proporción de los factores en la actividad endoglucanasa

Mediante un Taguchi L9 se realizó la optimización de los factores para las mejores condiciones de la producción del complejo enzimático (cuadro 27) mostrando una mayor contribución de la relación de C:N 114.596 u. y menor contribución atribuida al tamaño de la partícula sometida a la fermentación. Godínez *et al.* obtuvieron una productividad pectinasa de 1911 U/l, utilizando poliuretano como soporte y sacarosa como fuente de carbono, y en otro estudio Huerta *et al.*, obtuvieron una actividad pectinasa de 790 U/mg de proteína en el biorreactor Zymotis. Las constantes de la ecuación de Michaelis-Menten fueron V_{max} de 38.84 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$ y K_m de 0.155 $\mu\text{mol}/\text{L}$. Para 0.4 g/L de APG la reacción fue de orden uno y a partir de 0.8, 1.6 y 3.2 fue de orden cero.

Cuadro. 27 Optimización de parámetros de parámetros para producción de endoglucanasa en guishe

Column/factor	Level descripción	Level	Contribution
AIRE	0.4	1	68.586
TAMIZ	10	1	62.378
C:N	0.078	2	114.596
EMPAQUE	1.19	1	80.286

4.5.3. Optimización de la producción de la enzima celulasa mediante FMS en al menos un sustrato Actividad exo-glucanasa en bagazo de uva

La optimización de medios de cultivo está íntimamente relacionada con su diseño y formulación. El diseño incluye la elección de los componentes necesarios para lograr el crecimiento y la formación de productos, y en la formulación se establecen las concentraciones de cada componente (Julián, 2008). En el cuadro 28. Se observa el análisis de varianza que muestra un porcentaje de 52.123% para la aplicación del nivel de aire este resultado coincide con la actividad exoglucanasa calculada para el guishe. En la figura

52. se muestran las proporciones para los demás factores que también son similares a la actividad mencionada. Varios son los factores que influyen en el crecimiento microbiano y en su actividad enzimática, y todos cobran gran importancia en el momento de la optimización de medios de cultivo en estado sólido, (Pandey *et al*, 2000) señalan que el tamaño de la partícula y nivel de humedad son los más críticos, otros factores muy estudiados han sido la temperatura, el pH, la concentración, disponibilidad del sustrato, la aireación y la forma de inoculación entre otros.

Cuadro 28. Análisis de varianza para actividad exoglucanasas en bagazo de uva

Colm/factor	DOF (F)	Sum of sqrs	Variance	f- radio	Pure sum	Porcent
AIRE	2	362084.417	181042.208	-	362084.417	52.153
TAMIZ	2	28094.229	14047.114	-	28094.229	4.046
C:N	2	164822.759	82411.379	-	164822.759	23.74
EMPAQUE	2	139270.216	69635	-	139270.216	20.059

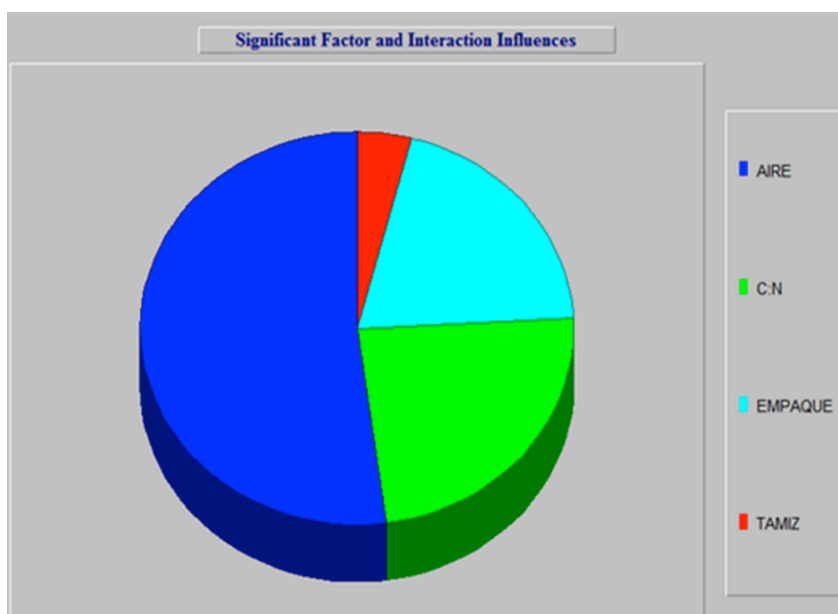


Figura 52. Proporción de los factores en la actividad exoglucanasa

El cuadro 29. Muestra los valores óptimos para la FMS de bagazo de uva donde la mayor contribución está dada por la relación de C:N, seguida de la aireación, para este tipo de actividad en estos tipos de sustrato las condiciones óptimas son los siguientes niveles: aire 1.2 L/min, tamiz 5 cm, la relación de C:N de 0.048 gr/L y empaque 3.1 gr. Estas serían las mejores condiciones en la que la actividad enzimática podría expresarse con mayor vigor. Ramos desarrolló un método general para la formulación de medios de cultivo, donde se combinan las técnicas de optimización estadística con la programación lineal para encontrando una relación estrecha técnico-económico entre los elementos principales del diseño: los microorganismos, los consumidores del producto y el proceso tecnológico. A partir del método general propuesto, dedujo un modelo para diseñar medios con el objetivo de obtener alimentos enriquecidos con proteína unicelular mediante FES. Partiendo de los residuos de la industria azucarera.

Cuadro. 29 Optimización de parámetros de parámetros para producción de exoglucanasa bagazo de uva.

Column/factor	Level descripción	Level	Contribution
AIRE	1.2	3	147.782
TAMIZ	5	2	73.245
C:N	0.048	3	191.025
EMPAQUE	3.1	2	96.578

4.5.4. Optimización de la producción de la enzima celulasa mediante FMS en al menos un sustrato Actividad endo-glucanasa en bagazo de uva

Actualmente la fermentación en estado sólido constituye un proceso que ofrece muchas ventajas para el desarrollo de bioprocesos, productos derivados de subproductos, siendo la optimización de medios de cultivo una etapa fundamental para alcanzar resultados exitosos proporcionando un

valor agregado o resolviendo problemas de los desechos orgánicos. El cuadro 30. Representa el análisis de varianza para la actividad endoglucanasa en bagazo de uva, el valor con mayor porcentaje lo obtiene el aire con 52.948%. la figura 53 muestra la proporción de cada uno de los factores y el cuadro 31 refleja el nivel de contribución mostrando los valores óptimos a utilizar en la fermentación. Donde los datos coinciden con todos los anteriores, la importancia del nivel de aire en el proceso está ligado a la cantidad de azúcares fermentados y a la conservación de la temperatura para que los microorganismos se desarrollen en las mejores condiciones.

Cuadro 30. Análisis de varianza para actividad endoglucanasas en bagazo de uva

Colm/factor	DOF (F)	Sum of sqrs	Variance	f- radio	Pure sum	Porcent %
AIRE	2	692667.424	346333.712	-	692667.424	52.948
TAMIZ	2	111396.876	55698.438	-	111396.876	8.515
C:N	2	33.516.58	165258.29	-	33.516.58	25.265
EMPAQUE	2	173611.767	86805.883	-	173611.767	13.271

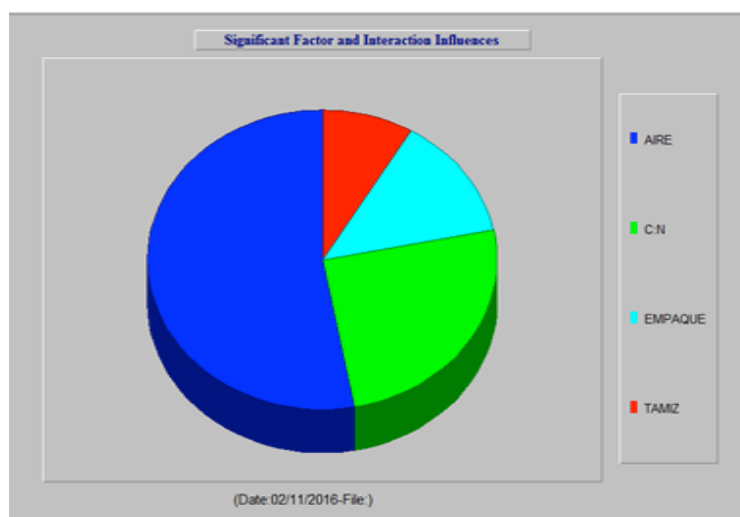


Figura 53. Proporción de los factores en la actividad endoglucanasa en bagazo de uva

Cuadro 31. Optimización de parámetros para producción de endo-glucanasa en bagazo de uva

Column/factor	Level descripción	Level	Contribution
AIRE	0.8	2	285.319
TAMIZ	1	3	156.826
C:N	0.048	3	257.58
EMPAQUE	2.5	3	190.226

(Dustet,2006) realizo un trabajo para optimizar la actividad enzimática de lipasas obtenidas por fermentación sólida, hacen uso del método de BoxBehnken de superficies de respuestas, estudiando los factores humedad, concentración de glucosa y de aire a tres niveles, y utilizando tres fuentes de nitrógeno, realizando la optimización para cada una de las fuentes de nitrógeno, en función solamente de la actividad enzimática. Concluyendo que la humedad y la aireación son factores importantes y limitantes en el desarrollo de microorganismo.

Etapas V

3.6 Caracterización físico-química del material degradado obtenido por FMS

La potencialidad de los residuos de la cosecha, así como el aprovechamiento de las plantas comunes del desierto del norte de México como fuente de energía y alimento animal ha dado lugar, a numerosos estudios dirigidos a incrementar el atractivo económico de estos sustratos, mediante el uso de tratamientos físico -químicos que permiten la delignificación del material y mejoran el acceso a la celulosa produciendo un aumento de la digestibilidad. En los últimos años se han desarrollado procesos de bioconversión empleando cultivo de hongos. (Arias. 2005) el cuadro 32 concentra los datos del análisis de fibra a las 24 horas y 96 horas después de instalada la fermentación en guishe. Las condiciones de la

fermentación F muestran una mayor porcentaje 60.79% contra 46.19% a las 24 horas, lo cual refleja la disponibilidad y un considerable aumento de fibra. La potencialidad de estos residuos como fuente de energía y alimento animal darán lugar, a numerosos estudios dirigidos a incrementar el atractivo económico de estos sustratos, mediante el uso de tratamientos físico - químicos que permiten la delignificación del material y mejoran el acceso a la celulosa produciendo un aumento de la digestibilidad. (Rao, 1997) En los últimos años se han desarrollado procesos de bioconversión y biotransformación empleando cultivo de hongos. Numerosos microorganismos capaces de degradar los componentes del complejo lignocelulósicos, han sido considerados como agentes degradadores de la lignina en la naturaleza. (Arias 2005)

Cuadro 32. Análisis de fibra de guishe después de la FMS

Muestra	Fermentado t_{24h}	Fermentado t_{96h}
A	35.07	45.27
B	49.95	53.89
C	49.71	55.19
D	47.26	59.88
E	41.95	43.39
F	46.19	60.79
G	48.76	54.16
H	49.08	54.36
I	47.26	50.19

En la figura 54 se observa las variaciones que existen al someter al sustrato a una fermentación de 24 y 96 horas comparadas con un control como testigo la importancia de incluir cualquier materia prima alternativa en la práctica productiva es necesario conocer las características analíticas del producto, su repercusión en la fisiología digestiva del animal y mediante

técnicas adecuadas evaluar, interactuar, modificar y reevaluar el producto sucesivamente hasta lograr que se aproveche óptimamente. La evaluación de una fuente alta en fibra comprende la determinación de su valor nutritivo y la caracterización de su fracción fibrosa. El valor nutritivo de un alimento depende del consumo del alimento en cuestión y del grado en que la materia seca suministrada por éste proporcione en cantidades de energía, proteína, minerales y vitaminas a la dieta, para cubrir las necesidades del animal

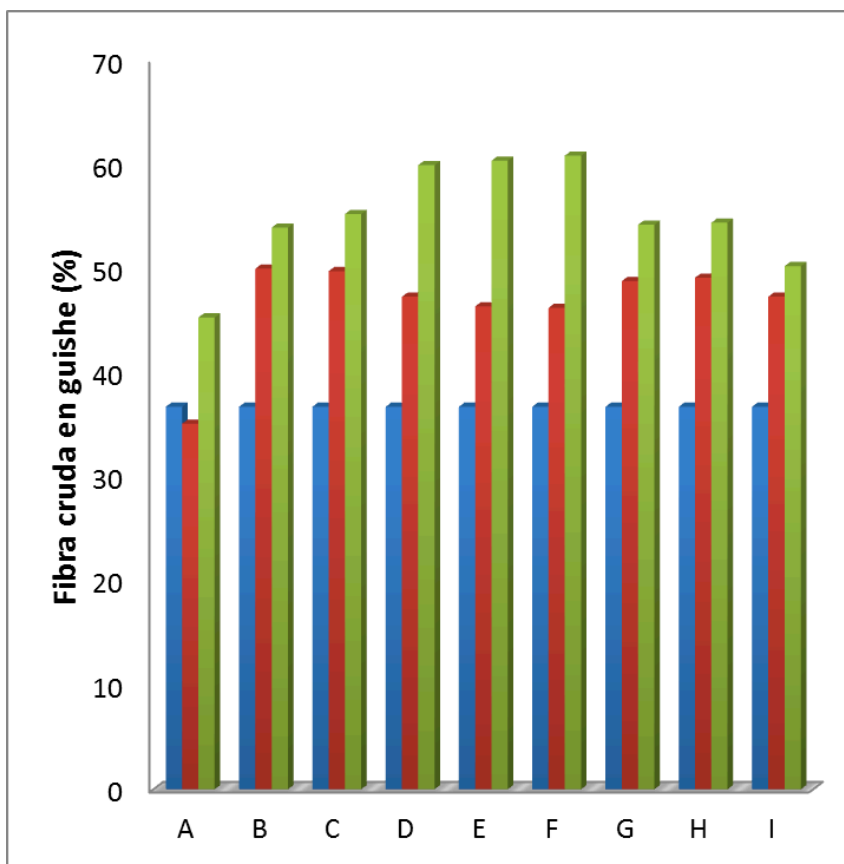


Figura 54. Análisis de fibra cruda en Guishe. En un control 24 y 96 horas respectivamente

Las concentraciones de fibra y sus variaciones también dependen del sustrato en evaluación como muestra el cuadro 33. Donde también se observa el análisis de fibra pero ahora para bagazo de uva. La fermentación "F" confiere las mejores condiciones para lograr un mayor aumento 43.83% a las 96 horas. Como es predecible el porcentaje de fibra es menor que el guishe, esto debido al grado de lignificación de cada uno de los sustratos usados. La comparación entre los tiempos de fermentación es apreciada en

una mejor manera en la figura 55. Mastrapa et al.(1996) y Savón et al.(1999) afirman que la composición química de la pared celular puede variar según la naturaleza y origen de la fibra. Estos últimos caracterizaron la pared celular de las harinas de follajes tropicales, las compararon con el maíz y la alfalfa y encontraron que la fibra dietética total de las harinas del follaje de plátano y canavalia duplicó el valor informado para la alfalfa.

Cuadro 33. Análisis de fibra en bagazo de uva en %

Muestra	Fermentado t_{24h}	Fermentado t_{96h}
A	23.18	29.36
B	23.99	36.84
C	25.1	37.06
D	25.4	39.02
E	25.6	41.44
F	26.08	43.83
G	25.36	39.45
H	26.1	36.84
I	25.3	36.19

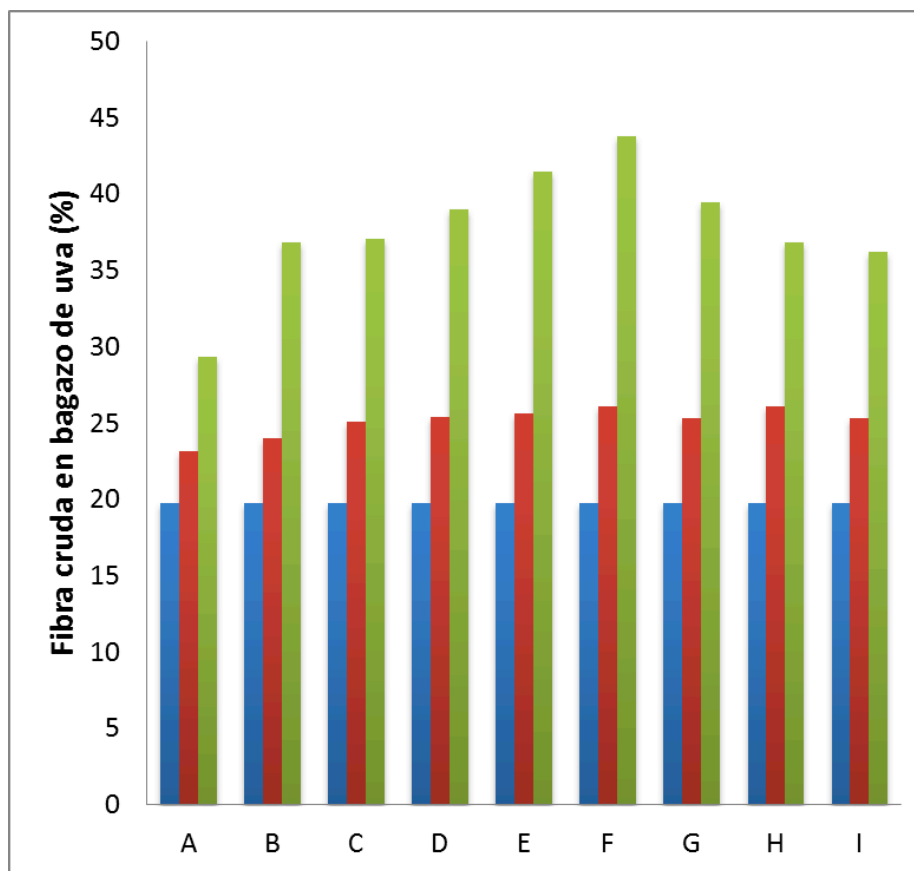


Figura 55. Cuantificación de fibra cruda en guishe fermentado a diferentes tiempos.

Etapa VI

4.6 Digestibilidad *in vitro* de sustratos:

El valor nutritivo de los alimentos está determinado por la biodisponibilidad de nutrientes y la dinámica de los procesos de solubilización e hidrólisis en el tracto gastro-intestinal. Los parámetros de la cinética de fermentación describen la digestión y caracterizan propiedades intrínsecas del alimento que limitan su disponibilidad para el rumiante, determinan la proporción de nutrientes consumidos que pueden ser absorbidos y utilizados por el animal, y dependen de un activo crecimiento y desarrollo de la población microbiana del rumen (Bruni y Chilbroste, 2001). La figura 56 muestra la digestibilidad *in vitro* de los sustratos bagazo de uva y guishe donde se obtuvo un 83% y 33% de digestibilidad de la materia después de la digestión. La variación en los porcentajes está dada por el grado de lignificación de la pared celular del

sustrato empleado. Esto determina el grado de aprovechamiento en el animal, (Arce, 2003) realizó un estudio que consistió en estandarizar un método enzimático para medir la digestibilidad de forrajes empleando la enzima celulasa proveniente del hongo *Penicillium funiculosum* y compararlo con el método de digestibilidad in vitro de Tilley y Terry (1963). Para la estandarización de la técnica se utilizó como sustrato forrajes de digestibilidad in vitro conocida: alfalfa y paja de avena; y para la comparación entre métodos se utilizó forrajes de diferente calidad provenientes de varias zonas del Perú. La concentración óptima enzima-sustrato hallada fue de 200 y 250 mg, respectivamente. Los valores de digestibilidad del método enzimático fueron estadísticamente menores que los del método in vitro, y el coeficiente de correlación fue de 0.987 ($p < 0.001$). El método de digestibilidad enzimática demostró ser un procedimiento de laboratorio simple y rápido para la evaluación de los forrajes.

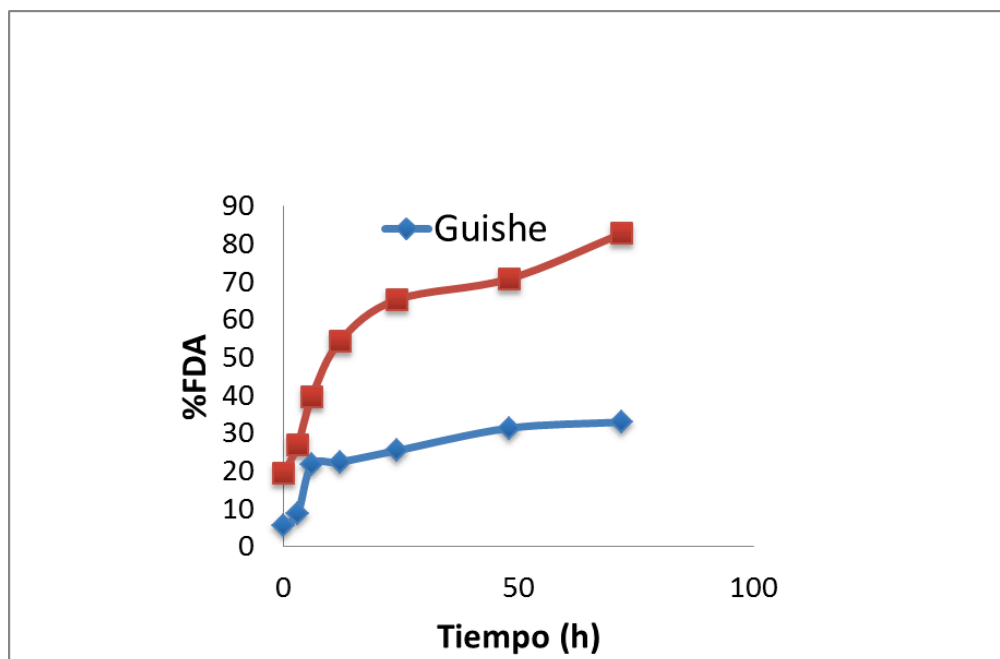


Figura 56. Cinética de digestibilidad in vitro de sustratos empleados en la FMS

Los complejos enzimáticos exógenos se han usado para poder incrementar la digestibilidad de la fibra contenida en los forrajes; sin embargo, no se conoce su efecto sobre otros ingredientes alimenticios que componen las raciones integrales para rumiantes. Por ello, (Pino-Rodríguez, 2005) realizó en un primer experimento el efecto de enzimas fibrolíticas en la degradación

ruminal in vitro de la materia seca (DIVMS) de ingredientes alimenticios energéticos (granos de maíz y sorgo), fibrosos (cascarilla de soya y ensilado maíz), proteínicos (pasta de soya y semilla de algodón), heno de alfalfa (7, 12, 21 y 28 días de rebrote) y de un concentrado, a las 3, 6, 12, 24, 48 y 72h de incubación. Las enzimas fibrolíticas mejoraron ($P < 0,10$) principalmente la DIVMS de los ingredientes fibrosos. En un segundo experimento se evaluó el efecto de las enzimas fibrolíticas en la producción de leche de vacas Holstein alimentadas con dietas integrales elaboradas con los ingredientes evaluados en el primer experimento. La producción de leche en la semana experimental 3, 4 y 8 ($P < 0,10$), y 5 y 16 ($P < 0,05$) fue incrementada por las enzimas fibrolíticas exógenas.

V. CONCLUSIONES

El Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos cuenta con 2 cepas que coinciden con las características macroscópicas presentadas por *Aspergillus* sp.

El bagazo de uva y el guishe representan una alternativa para la producción de la enzima celulasa por su alto contenido de fibra el cual puede beneficiar al ser empleados en la alimentación de rumiantes después de recibir una biotransformación.

La alta cantidad de FDA en bagazo de uva y guishe representa una alternativa para su inclusión en dietas para rumiantes, además de dar una utilización a de subproductos sin ningún valor

La cepa M4 y M5 son cepas capaces de emplear el bagazo de uva y guishe como sustrato, mostrando un crecimiento aceptable comparado con otras cepas estudiadas

La cepa M4 presentó mayor crecimiento radial empleando PDA y soportes (bagazo de uva y guishe) como sustrato.

El guishe y el bagazo de uva representan una alternativa para la producción de enzimas celulolíticas que pueden ser de interés en la alimentación de animales acelerado y mejorando los procesos de digestión.

Para producir la enzima celulasa sobre nopal (*Opuntia* sp.) es necesario llevar a cabo un proceso de inducción ya que los microorganismos estudiados presentan nulo crecimiento.

El análisis de fibra de los sustratos fermentados demuestra que los azúcares presentes en el tiempo de 96 h son más disponibles. Lo cual mejoraría la utilización de los sustratos y se reflejaría en las condiciones de los animales.

El análisis de fibra demuestra que las condiciones empleadas en la fermentación F son las óptimas para producir la enzima y degradar al sustrato.

La digestibilidad in vitro muestra que el 83% del bagazo de uva puede ser digerido por el animal, mientras que en el guishe es del 33%. Debido al grado de lignificación de cada uno de los sustratos.

La FMS es una alternativa para aprovechar residuos agroindustriales como lo son el guishe y el bagazo de uva. A través de la FMS se pueden obtener celulasas de gran utilidad a nivel industrial.

La producción de celulasa por *Aspergillus* sp se puede llevar a cabo de forma factible en guishe y bagazo de uva mediante FMS, siendo mayor la actividad endo-glucanasa en bagazo de uva.

La producción de celulasa no es proporcional a la producción de biomasa, por lo tanto, la mayor productividad puede deberse al tipo de sustrato utilizado.

La actividad endo-PG presenta represión catabólica cuando la concentración de azúcares es alta y su actividad crece cuando los azucares son consumidos.

Se optimizaron algunos parámetros de la FMS como: aireación, C:N, tamaño de partícula, empaque para la producción de celulasas mediante FMS empleando guishe y bagazo de uva.

REFERENCIAS.

- Aguilar, L., "Obtención de un preparado multienzimático con perspectivas de uso en alimentación animal", Memorias II Conferencia Internacional de Química, Santa Clara, 2003.
- Agüero, J. A. R., Rivera, J. R. A., & Valdivia, C. B. P. (2000). Biología y aprovechamiento de Agave lechuguilla Torrey. Boletín de la Sociedad Botánica de México, (67), 75-88.
- Aro N., T. Pakula & M. Penttilä, (2005). Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. FEMS Microbiol. Rev. 29: 719–739.
- Bastida López, A. R. (2007). Valoración nutritiva y fermentativa del ensilado de bagazo de caña de azúcar (pre-fermentado) con residuos de lechuga (*Lactuca sativa* L.).
- Burguet N, Sierra N, Trimiño JA. Estudio sobre la recuperación de la cepa microbiana *Escherichia coli* conservada en liofilización. VI Taller de Colecciones de cultivos microbianos y otros materiales biológicos. 2008; Ciudad de La Habana: Ediciones Finlay.
- Cárdenas-Díaz, D. I., Castro, E., Aguilar, C. N., & Cruz, O. S. FERMENTACIÓN DE SOTOL; TRATAMIENTO ENZIMÁTICO DE RESIDUOS.
- Corona-Castuera, F., Gómez-Lorence, F., & Gloria, E. ANALISIS QUIMICO PROXIMAL DE LA VAINA DEL MEZQUITE (*Prosopis glandulosa* var. *Torreyana*) EN ARBOLES PODADOS Y NO PODADOS, EN DIFERENTES ETAPAS DE FRUCTIFICACION.
- Córdoba A. 2005. Caracterización de Propiedades Relacionadas con la Textura de Suspensiones de Fibras Alimentarias. [Tesis de Doctorado]. Valencia. Universidad Politécnica de Valencia. Departamento de Tecnología de Alimentos. 205 p.
- Costa, M., Lerchundi, G., Villarroel, F., Torres, M., & Schöbitz, R. (2009). *Producción de enzima fitasa de Aspergillus ficuum con residuos agroindustriales en fermentación sumergida y sobre sustrato sólido*. Universidad Nacional de Colombia.
- Chamorro, R. A. M., & Mamani, E. C. (2015). Importancia de la fibra dietética, sus propiedades funcionales en la alimentación humana y en la industria alimentaria. *Revista de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 1(1).
- Cuervo, L., Folch, J.L., Quiroz, R.E. 2009. Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol. *Biotecnología*. 13(3):11-25.

- Bhat M. K., (2000). Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances* 18: 355-383.
- Burguet N, Sierra N, Trimiño JA. Estudio sobre la recuperación de la cepa microbiana *Escherichia coli* conservada en liofilización. VI Taller de Colecciones de cultivos microbianos y otros materiales biológicos. 2008; Ciudad de La Habana: Ediciones Finlay.
- Carrillo, M. L., Zavala, D., & Alvarado, B. (2007). Modelado del Efecto de la Temperatura, Actividad de Agua y pH sobre el Crecimiento de *Rhizopus oryzae*. *Información tecnológica*, 18(4), 57-62.
- Dustet, J.; Izquierdo E., “Enriquecimiento en proteína unicelular y obtención de celulosas: dos alternativas para la transformación del bagazo de caña de azúcar”, *Memorias II Conferencia Internacional de Química*, Santa Clara, 2003.
- Durand, A., Renaud, R., Almanza, S., Maratray, J., Diez, M., y Desgrangesm C. (1993). Solid- state fermentation reactors: from lab scale to pilot plant. *Biotechnology Advances* 11, 591- 597.
- Elias, A.; Lezcano, O., “Effect of the Inclusion of Levels of Maize Meal on the Fermentation of Sugar Cane”, *Cuban J. Agric. Sci.*, 28, No. 321, 1994.
- Estrada E., Villarreal J.A., Jurado E. 2005. Leguminosas del Norte del Estado de Nuevo León, México. *Acta Botánica Mexicana*, 7(3):1-18.
- Freyre, M. R., Bernardi, C. M. H., Baigorria, C. M., Rozycki, V. R., Piagentini, A. M., Presa, M., & Taher, H. A. (2010). Parámetros de Interés Nutricional en Semillas de Vinal (*Prosopis Ruscifolia*). *FAVE Sección Ciencias Agrarias*, 9(1/2), 89-96.
- Fredrickson E., Thilsted J., Estell R., Havstad K. 1994. Effect of chronic ingestion of tarbush (*Flourensia cernua*) on ewe lambs. *Veterinary and Human Toxicology*, 36 (5):409-415.
- Flores-Ortiz, M. A., & Reveles-Hernández, M. (2009). Producción de nopal forrajero de diferentes variedades y densidades de plantación. VIII Simposium-Taller Nacional y 1er. Internacional de “Producción y Aprovechamiento del Nopal”, 13-14.
- Godines G., Soriano Santos J., Augur C., Viniestra-González G. (2001). Exopectinases produced by *Aspergillus niger* in solid state and submerged fermentation: A comparative study. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 26 (5), 271-275.
- GÓMEZ, T. G. D., LOZANO, R. G. R., EDUARDO, A., CASTILLÓN, E., MORALES, L. M. S., & GONZÁLEZ, H. Importancia nutrimental en plantas forrajeras del matorral espinoso tamaulipeco.

- Grilli, D., Egea, V., Lama, S. P., Carcaño, D., Allegretti, L., Escudero, M. S., & Arenas, G. N. (2015). Degradación y utilización de la hemicelulosa contenida en especies forrajeras por *Pseudobutyrvibrio ruminis* y *Pseudobutyrvibrio xylanivorans*. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo*, 47(2), 231-243.
- Guevara-Escobar, A., González-Sosa, E., Suzán-Azpíri, H., Malda-Barrera, G., Martínez y Díaz, M., Gómez-Sánchez, M., ... & Olvera-Valerio, D. (2008). Distribución potencial de algunas leguminosas arbustivas en el altiplano central de México. *Agrociencia*, 42(6), 703-716.
- Gutiérrez M. Contribución al estudio del modelado matemático de la fermentación sólida de hongos filamentosos en soportes inertes. Tesis de Grado para Doctor en Ciencias, 1995, UAM, Izta-palapa, México.
- Hatakka A. Biodegradation of lignin. En: Hofrichter M, Steinbüchel A (eds.). *Biopolymers*, vol. 1 - Lignin, Humic Substances and Coal. Weinheim: Wiley-VCH; 2001. p.129-180
- Hernández-Castillo, F. D., Lira-Saldivar, R. H., Cruz-Chávez, L., Gallegos-Morales, G., Galindo-Cepeda, M. E., Padrón-Corral, E., & Hernández-Suárez, M. (2008). Potencial antifúngico de cepas de *Bacillus* spp. y extracto de *Larrea tridentata* contra *Rhizoctonia solani* en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.). *Rev. Int. Bot. Exp*, 77, 241-252.
- HUT - Helsinki University of Technology. Forest Products Chemistry. Chemistry of Cellulose Making: Module II - Basics of Wood Chemistry; 2006.
- Kar, B., Banerjee, R., Bhattacharyya, B.C. (1999). Microbial production of gallic acid by modified solid state fermentation. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 23, 173-177.
- Lambrakir, M.S. Marakis and S Roussos, *Micol. Neotrop. Apl.*, 7, 23 (1994).
- Lagunas, I. et al., "Production of Hemicellulolytic Enzymes through Solid Substrate Fermentation and Their Applications in the Production of Balanced Feed for Broilers", *Veterinarian México*, vol. XXXVII, No. 1, 2006, págs. 1 – 13.
- Lonsane, B . K . , G. Saucedo- Castañeda, M. Raimbault, S. ROUSSOS, G. Viniestra-Gonzalez, N. P Ghildhyal, M. Ramakrishna and M.M. Krishnaiah, *Process Biochem.*, 27, 259 (1992).

- Narcia Velasco, M., Castillo Quiroz, D., Vázquez Ramos, J. A., & Berlanga Reyes, C. A. (2012). Turno Técnico de la lechuguilla (Agave lechuguilla Torr.) en el noreste de México. *Revista mexicana de ciencias forestales*, 3(9), 81-88.
- Martínez, M. 1979. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas, Martínez, M. 1979. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas, 3^a. reimp. 1994. Ed. Fondo de Cultura Económica. México. pp. 9, 10,11, 834, 1101.
- Martínez-Anaya, C., Belcazar-López, E., DantanGonzález, E., Folch-Mallol, J.L. 2008. Celulasas fúngicas: Aspectos biológicos y aplicaciones en la industria energética. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 50(3-4):119-131.
- Martínez, A.T., Speranza, M., Ruiz-Deñás, F.J., Ferreira, P., Camarero, S., Guillén, F., Martínez, M.J., Gutiérrez, A., del Río, J.C. 2005. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical and enzymatic aspects of fungal attack of lignin. *Inter. Microbiol.* 8(3):195-204.
- Marmolejo, L., Pérez, A., Torres, P., Cajigas, Á., & Cruz, C. (2008). Aprovechamiento de los residuos sólidos generados en pequeñas industrias de almidón agrio de yuca. *Livestock Research for Rural Development*, 20(7).
- Meloni, D. A., Gulotta, M. R., & Martínez, C. A. (2008). *Prosopis ruscifolia* Griseb.(vinal) tolera concentraciones salinas equivalentes al agua de mar y excluye iones tóxicos de la parte aérea. *Quebracho*, 16, 32-40.
- Mendoza, J. C. D., & Kulich, E. I. (2006). Aplicación de balances de masa y energía al proceso de fermentación en estado sólido de bagazo de caña de azúcar con *Aspergillus niger*. *Biotechnología Aplicada*, 21(2), 85-91.
- Mitchell, D., Lonsane, B., Durand, R., Renaud, S., Maratray, J., Desgranges, C., Croke, P., Hong, K., Tanner, R., Malaney, G. (1992). General principles of reactor design and operation for solid substrate cultivation. In Rolz (Ed.), *Solid substrate cultivation*. Elsevier Applied Science. Amsterdam, pp. 115-139.
- Mitchell, D. A., von Meien, O. F. (1999). Mathematical modeling as a tool to investigate the design and operation of the zymotis packed-bed bio-reactor for solid-state fermentation. *Biotechnology and Bioengineering* 68: 127-135.
- Morán, J. (2008). Extracción de celulosa y obtención de nanocelulosa a partir de fibra de sisal-caracterización. *Asociación Argentina de Materiales*.

- Moreno-Limón, S., González-Solís, L. N., Salcedo-Martínez, S. M., Cárdenas-Avila, M. L., & Perales-Ramírez, A. (2011). Efecto antifúngico de extractos de gobernadora (*Larrea tridentata* L.) sobre la inhibición in vitro de *Aspergillus flavus* y *Penicillium* sp. *Polibotánica*, (32), 193-205.
- Molina G.M., Ramos M.C., Vargas J., Mata B.D., Becerril P., Said S. 2006. Bactericidal activity of organic extracts for *Flourensia cernua* DC against strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Archives of Medical Research*, 37(1):47-49.
- Moo-Young M, Moreira AR, Tengerdy RP. Principles of solid substrate fermentation. The Filamentous fungi 4. Ed. JE Smith, DR Berry and B Kristianse, E Arnold, London; 1983:117-44. experience. *Biochemical Engineering Journal*. 13, 189-195.
- Ogbonna, J. C., Mashima, H., Tanaka, H. (2001). Scale up of fuel ethanol production from gar beet juice using loofa sponge immobilized bioreactor. *Bioresource Technology* 76, 1-8.
- Oriol, E., These de doctorat, INSA-Toulouse, France, 133p (1987)
- Oriol, E., B. Schettino, G. Viniegra-Gonzalez and M. Raimbault, J. *Ferment. Technol.*, 66,56(1988).
- Palacios, R. A., & M. M. Brizuela. 2005. Fabaceae, parte 13. Subfam. II. Mimosoideae, parte 4. Tribu VI. Mimoseae, parte B. *Prosopis* L, En A. M. Anton and F. O. Zuloaga, eds. *Fl. Fanerog. Argent.*, Vol. 92, 3- 25.
- Pinos Rodríguez, J. M., González, S., Mendoza, G., García López, J. C., Miranda, L., De La Cruz, G. A., & De Lerma, V. (2005). Efecto de enzimas fibrolíticas exógenas en la degradación in vitro de ingredientes alimenticios, y en la producción de leche de vacas Holstein. *Interciencia*, 30(12).
- Raimbault, M. These d'Etat. Univ Paul Sabatier, Toulouse, France, 291 p (1980).
- Raimbault M., S. ROUSSOS, E. Oriol, J. Barrios, M. Gutierrez-Rojas and G. Viniegra-Gonzalez, Brevet Français no 89. 06 558 (1989).
- Ramos, J. A., Elías, A., & Herrera, F. (2006). Procesos para la producción de un alimento energético-proteico para animales. Efecto de cuatro fuentes energéticas en la fermentación en estado sólido (FES) de la caña de azúcar.
- Roche, N. , A. Venague, C. Desgranges and A. Durand, *Biotechnol Advanc*, 11, 677 (1993).
- Roura, G. et al., "Proceso para la producción de un forraje enriquecido en proteína a partir de la fermentación en estado sólido de la

caña de azúcar”, Patente cubana A23J 1/14, A23K 1/14, La Habana, Cuba, 1992.

- RODRÍGUEZ G, I., & PIÑEROS C, Y. (2007). Producción de complejos enzimáticos celulolíticos mediante el cultivo en fase sólida de *Trichoderma* sp. sobre los racimos vacíos de palma de aceite como sustrato. *Vitae*, 14(2), 35-42.
- Roussos, S . , E. Bresson, G . Saucedo-Castañeda,P. Martinez,J.M. Olivier and J. Guymberteau, i n : Advances in S S F , ROUSSOS, Lonsane, Raimbault & Viniegra (E d s) , in press (1995).
- Roussos, S., M.A. Aquihuatl, M.A. Brizuela and A. Olmos, Micol. Neotrop. Aplic., 2,3 (1989).
- Rojas-Rodríguez, F., & Torres-Córdoba, G. (2012). Árboles del Valle Central de Costa Rica: reproducción Aromo (*Acacia farnesiana*). *Revista Forestal Mesoamericana Kurú*, 9(22), 66-67.
- Ruiz, E. B., Campos, S. Á., Pérez, Á. G., & Valiente-Banuet, A. (2008). Nuevos recursos naturales como complemento de la dieta de caprinos durante la época seca, en el Valle de Tehuacán, México. *Interciencia: Revista de ciencia y tecnología de América*, 33(12), 891-896.
- Ruiz- Leza, H. A. (2004). Desarrollo de un bioproceso para la producción de pectinasa fúngica en medio sólido utilizado pomaza de limón. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Coahuila. Saltillo, Coahuila.
- Saucedo-Castañeda1G., M. Gutierrez- Rojas,G. Bâcquet,RaimbaultM.andG. Viniegra-Gonzalez, *Biotechnol. Bioeng.* 35, 802 (1990).
- Saucedo-Castañeda1G., B.K. Lonsane, J.M. Navarro, S . Roussos and M. Raimbault. *Appl-Biotechnol.*, 15, 164 (1992).
- Sánchez, J; Royse, D. 2002. La biología y el cultivo de *Pleurotus* spp. Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), Chiapas, México, D. F., MX, Editorial Limusa, S.A. 290 p.
- Scheller H. and Ulvskov P. (2010). Hemicelluloses, Review in Advance first posted online on January 28, 2010. *Annual Review of Plant Physiology*. 61. Downloaded from arjournals.annualreviews.org by Universidad de Concepcion.
- Scull, I., Savón, L., Valiño, E., & Ramos, Y. (2016). Composición fitoquímica de la harina de forraje de mucuna (*Stylobium Aterrimum*) fermentada con el hongo *Trichoderma Viride*. *Multiciencias*, 15(3)

- Siller Juárez, d. f. (2014). Extracción y purificación de saponinas del residuo del tallado del agave lechuguilla torrey (guishe) y su aplicación potencial.
- Serna Cock, L., Valencia Hernández, L., & Campos Gaona, R. (2010). Kinetic of fermentation and antimicrobial activity of *Weissella confusa* against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*. *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia*, (55), 55-65.
- Suryanarayan, S. (2000). Current industrial practice in solid state fermentations for secondary metabolite production: the Biocon India
- Trujillo Trujillo, H. E. R. N. A. N., ROBLEDO OLIVO, A. D. A., MARTÍNEZ VÁZQUEZ, D. G. D., CRUZ HERNANDEZ, M. A. D., & RUIZ LEZA, H. A. D. (2016). Producción de xilanasa a partir de la cepa *Rh. pusillus* en fermentación en medio sólido aplicando un diseño experimental Taguchi L9.
- Valiño E, Elías A, Alvarez E, Albelo N. Caracterización del funcionamiento de la cámara de fermentación para la producción de Saccharina. *Revista Cubana de Ciencias Agrícolas* 1996;30:67.
- Viniegra González, G. (2003). Producción de enzimas por *Aspergillus*. *Revista Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería* 8, 18-30.
- Zadrazi, F., *Eur. J. Appl Microbiol. Biotechnol.*, 1, 327 (1975).