

---

UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CAMPUS TUXTEPEC

“Extracción y caracterización del xilano del residuo  
lignocelulósico de *Amaranthus hypochondriacus*, para utilizarlo  
como fuente de carbono en la evaluación del crecimiento de  
*Aspergillus flavus* y *Aspergillus oryzae*”

Tesis

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

Ingeniero en Biotecnología

PRESENTA:

Luis Fernando Ramírez Rodríguez

Director: Dra. María de Jesús García Gómez

SAN JUAN BAUTISTA TUXTEPEC, OAXACA

2019



# UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN CAMPUS TUXTEPEC

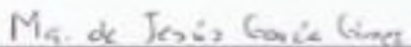
## ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la ciudad de San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, el día 30 de octubre de 2019 a las 16 hr, los miembros de la comisión revisora de tesis designada por la Jefatura de Carrera de la Ingeniería en Biotecnología se reunieron en la sala de juntas del Instituto de Biotecnología de la Universidad del Papaloapan, con la finalidad de examinar la tesis titulada "Extracción y caracterización del xileno del residuo lignocelulósico de *Amaranthus hypochondriacus* para utilizarlo como fuente de carbono en la evaluación del crecimiento de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus oryzae*" presentada por el alumno Luis Fernando Ramírez Rodríguez, con número de matrícula 12090277, aspirante al título de Licenciatura.


Después de intercambiar opiniones, los miembros de la comisión manifestaron que la tesis **satisface** los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes, otorgando su **aprobación** para que el aspirante pueda proceder con el proceso de titulación.


Tuxtepec, Oaxaca, a 30 de octubre de 2019

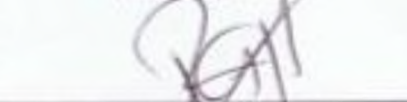
ATENTAMENTE  
LA COMISIÓN REVISORA




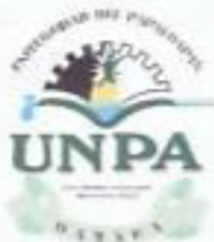
Dra. María de Jesús García Gómez  
Profesor Investigador Titular  
Universidad del Papaloapan  
Director de Tesis

  
M.C. Miguel Ángel García Muñoz  
Profesor Investigador Titular  
Universidad del Papaloapan  
Revisor de Tesis

  
Dr. Oscar Núñez Gaona  
Profesor Investigador Titular  
Universidad del Papaloapan  
Revisor de Tesis

  
Dra. Rubi Guadalupe Utrilla Coello  
Profesor Investigador Titular  
Universidad del Papaloapan  
Revisor de Tesis

  
Dr. Aurelio Ramírez Hernández  
Profesor Investigador Titular  
Universidad del Papaloapan  
Revisor de Tesis



## UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN CAMPUS TUXTEPEC

Tuxtepec, Oaxaca, a 05 de noviembre de 2019  
Oficio No. JCIB/001/11/2019

**Lic. Yesenia Barrientos Arenal**  
Jefe de Servicios Escolares  
Universidad del Papaloapan

Con base en el dictamen de la comisión revisora, se autoriza la impresión del trabajo de tesis del alumno **Luis Fernando Ramírez Rodríguez** titulado 'Extracción y caracterización del xilano del residuo lignocelulósico de *Amaranthus hypochondriacus* para utilizarlo como fuente de carbono en la evaluación del crecimiento de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus oryzae*'. Para ser presentado como trabajo de tesis para obtener el título de Licenciado en Ingeniería en Biotecnología, toda vez que cumple satisfactoriamente con la reglamentación establecida para tal fin.

El Jurado de Examen Profesional estará compuesto por los siguientes profesores:

M.C. Miguel Ángel García Muñoz (Presidente)  
Dr. Óscar Núñez Gaona (Vocal)  
Dra. Rubí G. Utrilla Coello (Secretario)  
Dr. Aurelio Ramírez Hernández (Primer Suplente)  
Dra. Jacqueline Capataz Tafur (Segundo Suplente)

Sin más por el momento le envío un cordial saludo.

**Atentamente**  
*Terra uberima, mens aperta*  
*Bau Lo-tama, chí jí jú*



**Dr. Julián Mario Peña Castro**  
Jefe de Carrera de Ingeniería en  
Biotecnología  
Universidad del Papaloapan



**Vo.Bo. M.C. Héctor López**  
Vice Rector Académico  
Universidad del Papaloapan  
VICE-RECTORIA  
ACADEMICA

c.c.p. Dra. María de Jesús García Gómez, Director de tesis, Para su conocimiento  
c.c.p. Archivo

El presente trabajo no ha sido aceptado o empleado para el otorgamiento de título o grado diferente o adicional al actual. La tesis es resultado de la investigación del autor, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas. El autor otorga su consentimiento a la **Universidad del Papaloapan** para la reproducción del documento con el fin del intercambio bibliotecario siempre y cuando se indique la fuente.

## **Agradecimientos**

A la Dra. María de Jesús García Gómez por la dirección, consejos, observaciones y paciencia otorgadas durante el desarrollo de este proyecto de investigación.

Al ing. Juan Hernández Sánchez por el tiempo brindado, sus valiosas contribuciones, enseñanza en manejo de equipos y mas que nada por su gran amistad.

A los doctores Andrés, Erick, Rubí, Lemuel y Aurelio, por sus valiosas contribuciones en el manejo de equipos, conocimiento y el tiempo brindado para poder cumplir los objetivos de esta investigación.

A la Universidad del Papaloapan por proporcionar un lugar muy cálido para el desarrollo de la ciencia y tecnología y ser como mi segunda casa.

Y finalmente, a mi familia en quien siempre podre encontrar apoyo, en especial en mi madre, a quien le debo mis logros y todo mi reconocimiento.

## **Dedicatoria.**

### **A mi madre**

Por apoyarme en cada proyecto de mi vida y siempre estar en el momento que la necesito.  
Pero sobre todo gracias por inculcarme el valor de la honestidad, respeto y sobre todo la  
humildad.

### **A mis hermanos:**

Adry, Emilio (wero), Perla, y Mar (la rara), gracias por las palabras de aliento, apoyo,  
abrazos, bromas y regaños, son lo máximo, los quiero chamacos feos.

### **A mis compadres.**

Antonio, Adiel, Wilber, Isaías, los Juárez, y todos los de la cuadra, gracias amigos por su  
amistad y por las tardes que pasábamos, haciéndolas increíbles, teniendo una infancia  
maravillosa; posdata ninguno fue futbolista profesional, pero cada quien está realizando su  
segunda opción.

### **A mis compañeros de carrera.**

David, Daniel, Abi, Sam, por brindarme su amistad y su apoyo en toda la carrera.

### **A mis amigos de intendencia**

Por apoyarme en todo lo que necesitaba, brindarme su amistad y dejarme ser parte del equipo  
de fútbol, que hicieron mis días en la **UNPA** más alegres.

## Tabla de contenido

1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. MARCO TEÓRICO .....	2
2.1. Residuos lignocelulósicos.....	2
2.2 Composición de los desechos lignocelulósicos .....	3
2.2.1 Componentes estructurales de los residuos lignocelulósicos.....	3
2.2.2 Componentes secundarios de los residuos lignocelulósicos. ....	6
2.3 Usos y aplicaciones de los residuos lignocelulósicos. ....	7
2.4 Xilano.....	7
2.4.1 Aplicaciones importantes del xilano .....	8
2.4.2 Métodos de extracción de xilano. ....	9
2.5 Caracterización química del xilano.....	11
2.5.1 Espectroscopía de infrarrojo usando transformada de Fourier .....	11
2.5.2 Difracción de rayos X .....	12
2.6 Evaluación del xilano como fuente de carbono utilizando hongos filamentosos mediante la técnica de crecimiento radial. ....	13
2.6.1 Criterios para la selección de sustratos. ....	13
2.6.2 Tamaño de partícula.....	13
2.6.3 Hongos filamentosos (HF).....	14
2.6.4 Criterios para la selección de HF. ....	14
2.6.5. Ventajas de usar HF .....	14
2.6.6 Factores importantes para el crecimiento de los hongos filamentosos .....	15
2.6.6.1 Actividad de agua .....	15
2.6.5.2 pH y temperatura.....	15
2.7 Degradación enzimática de la celulosa y hemicelulosa. ....	16
2.8 Características del residuo lignocelulósico y de los hongos que se utilizaran.....	16
2.8.1 Generalidades del <i>Amaranthus hypochondriacus</i> .....	16
2.8.2 Cultivo y distribución de la producción del <i>Amaranthus hypochondriacus</i> .....	17



6.7.1 Cepas de <i>Aspergillus</i> empleadas.....	35
6.7.2 Preparación de los sustratos para evaluar el crecimiento radial. ....	35
6.7.3 Inoculación.....	35
6.7.4 Analisis estadístico.....	36
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
7.1 Análisis químico-proximal al residuo lignocelulósico del amaranto.....	37
7.2 Composición química del residuo lignocelulósico del amaranto.....	38
7.3 Extracción de xilano.....	39
7.4 Caracterización fisicoquímica del xilano. ....	41
7.4.1 Identificación de los grupos funcionales del xilano mediante FTIR .....	41
7.4.2 Difracción de rayos X (DRX) .....	44
7.5 Evaluación de la velocidad del crecimiento radial (VCR) de los hongos filamentosos .....	48
8. CONCLUSIONES .....	55
9. PERSPECTIVAS .....	56
10. BIBLIOGRAFÍA.....	57
Anexos.....	65
Anexo A Procedimientos del análisis químico proximal.....	65
Anexo B Análisis estadístico. ....	70
Análisis estadístico de los tratamientos de extracción de xilano .....	70
Análisis estadístico de la velocidad de crecimiento radial.....	71

## Índice de figuras.

Figura 1. Estructura de los residuos lignocelulósicos ( tomado de Mosier y col. 2004) ....	3
Figura 2. Estructura de la celulosa (tomado de Pecoraro y col. 2008).....	4
Figura 3. Monómeros precursores de la hemicelulosa (tomado de Martínez y col. 2015).	5
Figura 4. Estructura de la lignina (tomado de Gellerstedt y Henriksson. 2008).....	6
Figura 5. Estructura del xilano extraído de residuos de madera (tomado de Ira y col. 2014) .....	8
Figura 6 Espectro FT-IR del polvo de xilano extraído de mazorca de maíz (tomado de da Silva y col. 2012). ....	12
Figura 7. Difractograma del xilano (b) obtenido de residuos de maíz (tomado de Wu Shuping y col. 2011). ....	12
Figura 8 Actividad de agua de algunos microorganismos (tomado de Prinyawiwatkul y col. 1993).....	15
Figura 9. Capacidad enzimática (tomado de Aro y col. 2005).....	16
Figura 10. Cultivo de amaranto (tomado de amarantopedia.com).....	17
Figura 11. Esquema del desarrollo experimental.....	28
Figura 12. Espectros FTIR del xilano extraído del residuo lignocelulósico del <i>Amaranthus hypochondriacus</i> . a) HS10, HS12I, HS14I b) HS10A, HS12A, HS14A c) HK10I, HK12I, HK14I d) HK10A, HK12A, HK14A. ....	42
Figura 13. Región de los espectros FTIR extraídos para identificar señales de lignina. a) HS10I, HS12I, HS14I b) HS10A, HS12A, HS14A c) HK10I, HK12I, HK14I d) HK10A, HK12A, HK14A.....	43

Figura 14. Región de los espectros FTIR extraídos para identificar señales de celulosa. a) HS10I, HS12I, HS14I b) HS10A, HS12A, HS14A c) HK10I, HK12I, HK14I d) HK10A, HK12A, HK14A.....	44
Figura 15. Difractograma del xilano obtenido de residuos de maíz (tomado de Wu Shuping y col. 2011).....	45
Figura 16. Difractograma del xilano extraído del residuo lignocelulósico del <i>Amaranthus hypochondriacus</i> aplicando el método fisicoquímico. 1) HK10A 2) HK12A 3) HK14 4) HS10A 5) HS10A 6) HS14A .....	46
Figura 17. Difractograma del xilano extraído del residuo lignocelulósico del <i>Amaranthus hypochondriacus</i> aplicando el método químico 1) HK10I 2) HK12I 3) HK14I 4) HS10I 5) HS12I 6) HS14I.....	47
Figura 18. Cinética de crecimiento radial en xilano al 5 % .....	49
Figura 19. Cinética de crecimiento radial en xilano al 10% .....	50
Figura 20. Cinética de crecimiento radial en amaranto al 5% .....	50
Figura 21. Cinética de crecimiento radial en amaranto al 10% .....	51
Figura 22 . Velocidad de crecimiento en las diferentes fuentes de carbono .....	52
Figura 23. Crecimiento micelial de <i>Aspergillus flavus</i> a) agar-xilano al 10%. b) agar-harina del residuo de amaranto 10%. c) agar-xilano al 5%. d) agar-harina del residuo de amaranto 5% .....	53
Figura 24. Crecimiento micelial de <i>Aspergillus oryzae</i> . a) agar-harina del residuo de amaranto 10%. b) agar-xilano al 10%. c) agar-harina del residuo de amaranto 5%. d) agar-xilano al 5%.....	54

## Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación de los principales residuos lignocelulósicos (tomado de Cheng y Zhu 2009).....	2
Tabla 2. Componentes principales de los residuos lignocelulósicos (modificado de Juri. 2011).....	3
Tabla 3 Componentes secundarios de residuos lignocelulósicos (modificado de Van Soest, 1982).....	6
Tabla 4. Aplicaciones del xilano. ....	8
Tabla 5. Métodos de extracción de xilano (Colorado y col. 2014, , Kumar y Wyman. 2009, Yachmenev y col. 2009, Kim y col. 2008).....	9
Tabla 6. Ejemplos de extracción de xilano .....	11
Tabla 7 Composición química del residuo lignocelulósico del <i>Amaranthus hypochondriacus</i> (tomado de Gómez. 2011). ....	18
Tabla 8. Aprovechamiento de residuos.....	20
Tabla 9. Determinación del análisis químico proximal .....	29
Tabla 10. Matriz para la extracción de xilano.....	33
Tabla 11: Matriz para evaluación del crecimiento radial.....	34
Tabla 12. Análisis químico proximal del amaranto. ....	37
Tabla 13. Composición química del amaranto.....	38
Tabla 14. Extracción de xilano utilizando métodos fisicoquímicos y químicos en base al amaranto.....	39

## Abreviaturas y símbolos

FTIR	Espectroscopía de infrarrojo usando transformada de Fourier
DrX	Difracción de rayos X
%	Porcentaje
Etc.	Etcétera
Xos	Xilooligosacáridos
Axos	Arabinoxilooligosacáridos
°C	Grados Celsius
h	Horas
HF	Hongos filamentosos
GRAS	Generalmente reconocido como seguro
FS	Fermentación sólida
pH	Potencial de hidrogeno
cm	Centímetros
mL	Mililitros
AOAC	Asociación de Análisis Químicos Oficiales
mm	Milímetro
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido sulfúrico
Lbs	Libras
NaClO <sub>2</sub>	Clorito de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
KOH	Hidróxido de potasio
H <sub>2</sub> O	Agua
Min	Minutos
p/v	Peso/ volumen

Cu K $\alpha$	longitud de onda del cobre
$\lambda$	longitud de onda
A°	Amperes
Kv	Kilovoltios
mA	Milivoltios
Ni	Níquel
N <sub>o</sub>	Número
PDA	Agar dextrosa y papa
g/L	Gramos / litro
MES	ácido 2- (N -morfolino) etanosulfónico
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	fosfato monopotásico
MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	Sulfato de magnesio heptahidratado.
SIAP	Servicio de información agroalimentaria y pesquera.

## Resumen

En este estudio, se desarrolló un proceso para la extracción y caracterización de xilano a partir del residuo lignocelulósico del *Amaranthus hypochondriacus*; así mismo, se utilizó este residuo y el xilano extraído como fuente de carbono para la evaluación del crecimiento radial de hongos filamentosos aislados de hojas de café *Aspergillus flavus* y *Aspergillus oryzae*.

El análisis de la composición del residuo lignocelulósico del amaranto reveló una cantidad de hemicelulosa 37.45%, celulosa 33.34% y proteína cruda 14.11%.

El rendimiento de extracción de xilano dependió del método y del tipo de álcali utilizado. El método fisicoquímico con hidróxido de sodio llevó un 75.35% de recuperación de xilano mientras que con hidróxido de potasio 66%; por otro lado, con el método químico el porcentaje de extracción con hidróxido de sodio fue de 59.55% frente a hidróxido de potasio con un valor 53.40%. En los espectros FTIR se pudo apreciar que los extractos presentaron las bandas características del xilano reportadas en la literatura situadas en 3405cm<sup>-1</sup> y 1160 cm<sup>-1</sup>; que corresponden a la característica de estiramiento de los grupos glucosídicos y características de estiramiento de las hemicelulosas (OH, CC, COC); además se observó que al utilizar el método fisicoquímico en combinación con el hidróxido de potasio la pureza del xilano se incrementó en función de la concentración del álcali.

En cuanto a la evaluación del crecimiento radial de los hongos filamentosos se observó que cada microorganismo presentó afinidad para un sustrato diferente; *Aspergillus oryzae* se desarrolló mejor en el sustrato agar-harina del residuo de amaranto al 10% obteniendo un crecimiento micelar de 6.9 cm a las 168 h; en contraste, *Aspergillus flavus* se desarrolló mejor en agar xilano al 10% obteniendo un crecimiento del micelio de 6.8 cm a las 168 h. Por lo tanto, de acuerdo a lo antes mencionado el residuo de amaranto se podrá utilizar como materia prima para la extracción de xilano y como fuente de carbono para la obtención de otros productos de interés industrial.

## Abstract

In this study, a process for the extraction and characterization of xylan was developed from the lignocellulosic residue of *Amaranthus hypochondriacus*; likewise, this residue and the extracted xylan were used as a carbon source for the evaluation of the radial growth of filamentous fungi isolated from *Aspergillus flavus* and *Aspergillus oryzae* coffee leaves.

Analysis of the composition of the lignocellulosic residue of amaranth revealed an amount of 37.45% hemicellulose, 33.34% cellulose and 14.11% crude protein.

The yield of xylan extraction depended on the method and type of alkali used. The physicochemical method with sodium hydroxide led to a 75.35% recovery of xylan while with 66% potassium hydroxide; On the other hand, with the chemical method the percentage of extraction with sodium hydroxide was 59.55% compared to potassium hydroxide with a value of 53.40%. In the chemical characterization it was observed that the extracts presented the characteristic xylan bands reported in the literature located at 3405cm<sup>-1</sup> and 1160cm<sup>-1</sup>; which correspond to the stretching characteristic of glycosidic groups and stretching characteristics of hemicelluloses (OH, CC, COC); It was also observed that when using the physicochemical method in combination with potassium hydroxide, the purity of the xylan was increased depending on the concentration of the alkali.

Regarding the evaluation of the radial growth of filamentous fungi, it was observed that each microorganism presented affinity for a different substrate; *Aspergillus oryzae* developed better in the agar-flour substrate of the 10% amaranth residue, obtaining a micellar growth of 6.9 cm at 168 h; in contrast, *Aspergillus flavus* developed better in 10% xylan agar, obtaining a mycelium growth of 6.8 cm at 168 h. Therefore, according to the aforementioned amaranth residue may be used as a raw material for the extraction of xylan and as a carbon source for obtaining other products of industrial interest.

## 1. INTRODUCCIÓN

Actualmente la biotecnología y la química analítica se han enfocado en la obtención de productos que presenten actividad biológica, pero una de las principales limitantes, es el alto costo de producción y la cantidad de producto que se obtiene; por ello se buscan alternativas factibles, que presenten un fácil manejo de las operaciones de producción, una disminución de costos y un aumento en la cantidad del producto obtenido (Mussato. 2010).

Estudios recientes demuestran que hay procesos de producción en los que se pueden utilizar residuos lignocelulósicos; de los que se producen alrededor de 76 millones toneladas anualmente solamente en México (González y col., 2015); estos residuos son sustratos ideales para la obtención de una gran variedad de productos de interés industrial, debido a que están integrados por polímeros de gran relevancia, principalmente: celulosa, hemicelulosa y lignina. Estos polímeros son de gran importancia para diversos sectores de la industria, por ejemplo: en la papelera, alimenticia, farmacéutica, energética entre otras; dando productos de valor agregado tales como: alcoholes, biocombustibles, en mayor cantidad, y en menor proporción metabolitos como; enzimas, fibra dietética, biopolímeros como el xilano, compuestos fenólicos, entre otros (Saval. 2012).

Uno de los polímeros renovables atractivos que ha tomado relevancia en los últimos años es el xilano; debido a que posee diversas funcionalidades para el desarrollo de nuevos materiales como son: los nanocompuestos, hidrogeles, bioplásticos, como sustrato para obtención de xilanasas, xilooligosacáridos, xilosa; esta última utilizada para la producción de xilitol (Sedlmeyer. 2011).

Actualmente no se dispone evidencia en la literatura científica acerca del uso de los residuos lignocelulósicos del amaranto para la obtención de productos de interés industrial; por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue extraer el xilano utilizando diferentes métodos y caracterizarlo por técnicas analíticas como son Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) y difracción de rayos X (DRX), para posteriormente evaluarlo como sustrato para el crecimiento de hongos filamentosos

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Residuos lignocelulósicos.

Anualmente en México se producen alrededor de 76 millones de toneladas de residuos lignocelulósicos (González y col. 2015), éstos son sustratos ideales para la obtención de una gran variedad de productos de interés biotecnológico, ya que están compuestos principalmente por carbohidratos y proteínas (Shalini y col. 2009).

Este tipo de residuos lignocelulósicos se generan del resultado de diversas actividades (Tabla 1), como restos de cosechas, residuos de frutos o alimentos, podas o despuntes de árboles, desechos industriales, etc., donde quedan como material de descarte como son: cáscaras, hojas y tallos, bagazo o rastrojos. Usualmente estos residuos no han sido clasificados como material peligroso, no obstante, representan un serio problema debido a su mal manejo, ocasionando contaminación ambiental, daños al suelo, agua y pérdidas económicas (Cheng y Zhu. 2009).

Ha este tipo de residuos se le pueden dar un valor agregado utilizándolos como materia prima para la obtención de productos de interés industrial; debido a su composición y propiedades, además de su carácter renovable, su abundancia y su bajo costo (Cheng y Zhu. 2009).

**Tabla 1. Clasificación de los principales residuos lignocelulósicos (tomado de Cheng y Zhu. 2009).**

<b>Tipo de residuo</b>	<b>Ejemplo.</b>
<b>Agrícolas</b>	Rastrojo de maíz, trigo, arroz, cebada, algodón, sorgo, millo, caña, coco.
<b>Agroindustriales</b>	Bagazos de caña y sorgo, cascarilla de arroz, cacao, borra, cascarilla y pulpa de café.
<b>Forestales</b>	Madera dura: álamo, eucalipto, aspen. Madera blanda: pino, picea. Aserrín, ramas de roble.
<b>Urbanos</b>	Papel, cartón, madera, residuos de jardinería, cáscaras de frutas y verdura.

## 2.2 Composición de los desechos lignocelulósicos

### 2.2.1 Componentes estructurales de los residuos lignocelulósicos

La mayoría de los residuos lignocelulósicos que se utilizan son subproductos generados por diversas prácticas (Tabla 1) y están constituidos por:

**Componentes estructurales:** La lignina, la celulosa y la hemicelulosa (Figura 1) están presentes en una relación 3:4:3 de acuerdo con las diferentes variedades vegetales, los cuales son llamados polisacáridos de la pared celular vegetal y en la industria alimentaria son componentes de la fibra dietética total. En la **Tabla 2** se muestran los porcentajes de los componentes estructurales principales de algunos residuos lignocelulósicos (Cheng y Zhu, 2009).

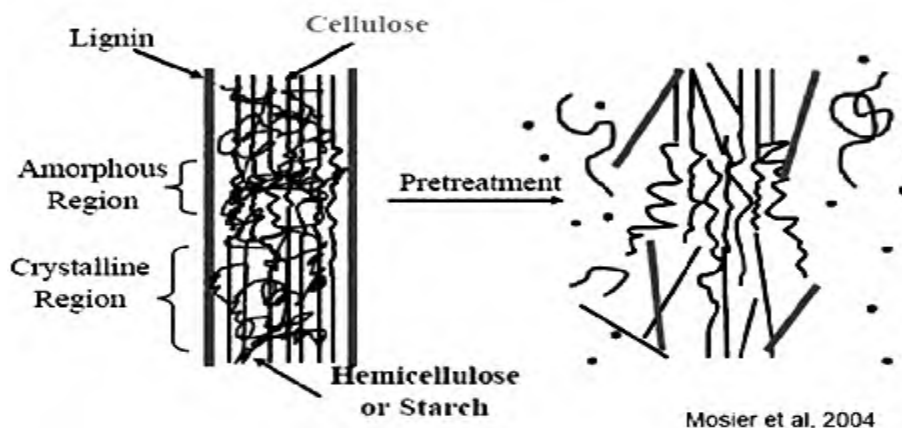


Figura 1. Estructura de los residuos lignocelulósicos (tomado de Mosier y col. 2004)

Tabla 2. Componentes principales de los residuos lignocelulósicos (modificado de Juri, 2011).

Materiales	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)
Bagazo de caña	33	30	19
Madera dura	40-55	24-40	18-25
Madera blanda	45-50	25-35	25-35
Cubierta de nuez	23-30	25-30	30-40
Mazorca de maíz	45	35	15
Pastos	25-45	35-50	10-30
Papel	85-99	0	0-15
Paja de trigo	30	50	15
Basura surtida	60	20	20
Hojas	15-20	80-85	0
Hebras de semilla de algodón	80-95	5-20	0
Papel periódico	40-55	25-40	18-30

### 2.2.1.1 Celulosa

La celulosa es un homopolímero lineal constituido por unidades de  $\beta$ -glucosa unidas entre sí por enlaces glucosídicos  $\beta$ -1-4 (Figura 2), con elevado peso molecular y grado de polimerización. Es el componente principal de las paredes celulares vegetales y el polímero mayoritario del planeta, tiene una estructura fibrosa, estable, con resistencia al ataque químico y a la tracción mecánica. Debido a su conformación la celulosa permite crear uniones intermoleculares e intramoleculares, mediante puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals, dando lugar a las fibrillas elementales. Estas fibrillas le confieren propiedades a la celulosa como resistencia y elasticidad, las cuales son importantes para el desarrollo de los microorganismos ya que son muy susceptibles a un ataque enzimático (Ovando y Waliszewski. 2005).

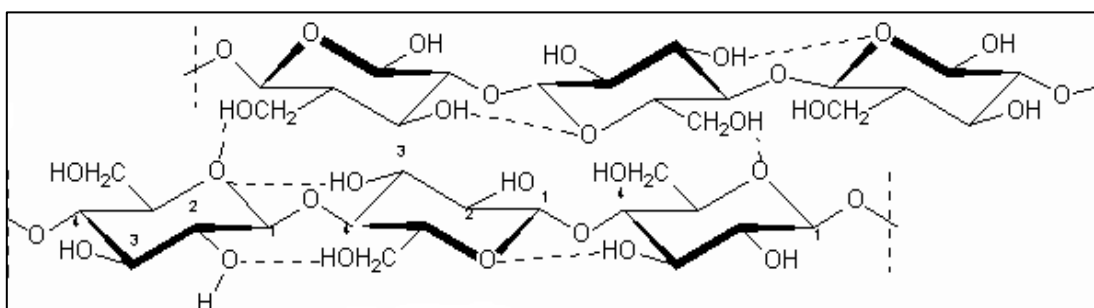


Figura 2. Estructura d la celulosa (tomado de Pecoraro y col. 2008)

### 2.2.1.2 Hemicelulosa

La hemicelulosa es un heteropolímero constituido por diferentes monosacáridos (Figura 3) unidos por enlaces glucosídicos  $\beta$ -1-4, presentando ramificaciones y sustituciones; los tipos de monosacáridos que la conforman son del grupo de las pentosas (xilosas y arabinosas), hexosas (glucosa, manosa, galactosa), desoxihexosas (ramnosa y fructosa); también está compuesto por ácidos hexaurónicos (glucorónico, metilglucorónico y galacturónico); la frecuencia y composición de las ramificaciones de la hemicelulosa dependen de la materia prima (residuo lignocelulósico) de extracción (Ira y col. 2014). La hemicelulosa se clasifica generalmente en función del monómero predominante en la cadena principal, de esta forma

puede ser; homopolímeros (mananos o galactanos) o por dos o más heteropolímeros (glucomanos, arabinogalactanos o arabinosilanos).

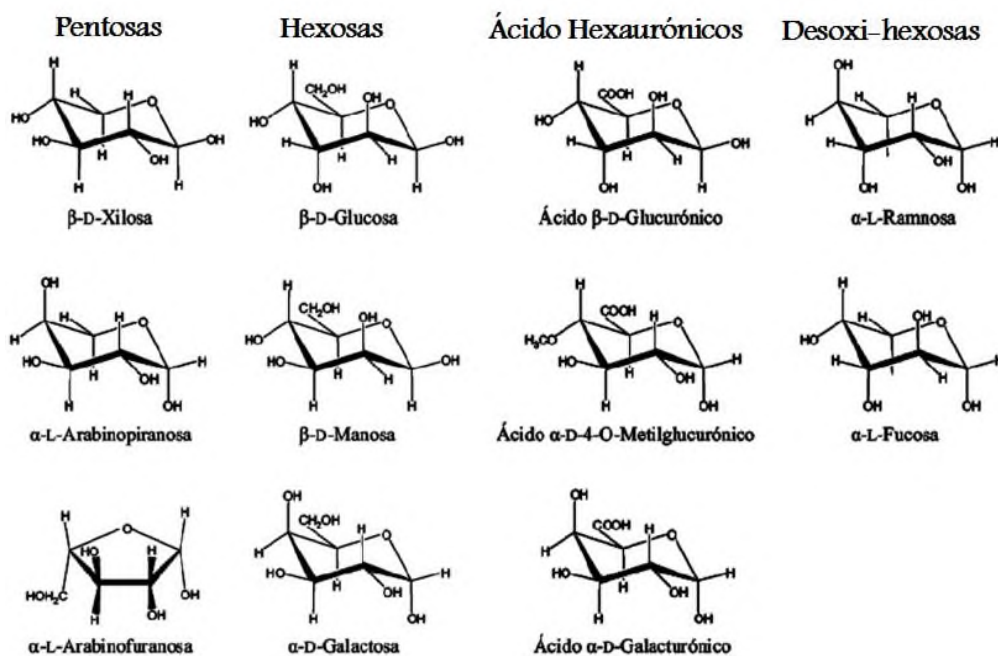


Figura 3. Monómeros precursores de la hemicelulosa (tomado de Martínez y col. 2015).

### 2.2.1.3 Lignina

La lignina es un polímero tridimensional amorfo (Figura 4) formado por unidades de fenilpropano ligadas por diferentes tipos de enlaces como alquil-eril-éter o carbono-carbono; los monómeros que forman a la lignina son llamados alcoholes cinamílicos.

Su peso molecular es muy difícil de determinar por las modificaciones que presenta su estructura en los tratamientos de separación. Posee tres funciones principales: (Lagunés y Zavaleta. 2016).

- Proteger a la celulosa de un ataque microbiano.
- Confiere resistencia e impermeabilidad al material.
- Mantener unidas las fibras celulósicas.

Para lograr la deslignificación de cualquier residuo lignocelulósico, se tienen que romper los enlaces éter presentes, mediante tratamientos con agentes oxidantes o tratamientos con agentes químicos a altas temperaturas (Rowley y col. 2005).

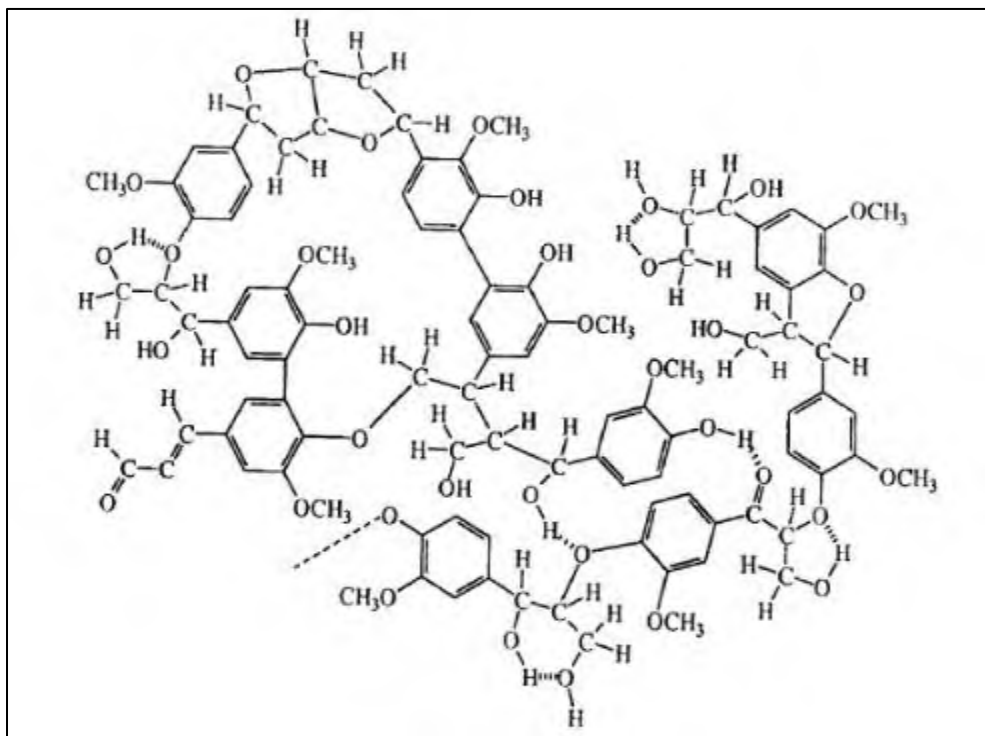


Figura 4. Estructura de la lignina (tomado de Gellerstedt y Henriksson. 2008)

### 2.2.2 Componentes secundarios de los residuos lignocelulósicos.

Los componentes secundarios son compuestos que se encuentran en menor proporción (Tabla 3), tienen bajo peso molecular, se les denominan extractos y pueden ser estimados mediante un análisis proximal (Van Soest. 1982).

Tabla 3 Componentes secundarios de residuos lignocelulósicos (modificado de Van Soest, 1982).

Compuesto	Ejemplos
Solubles en agua y en disolventes orgánicos	
Terpenos	Polímeros de isopropeno, relacionados con alcoholes terpénicos.
Resinas	Amplia variedad de compuestos no volátiles (ácidos grasos, fitoesteroides.etc.)
Fenoles	Polifenoles derivados del ácido gálico y la catequina
Otros	Carbohidratos de bajo peso molecular, y alcaloides.
Insolubles	
Cenizas	Carbonatos, oxalatos y en ocasiones sílice.
Otros	Pequeñas cantidades de almidón, pectinas o proteínas

### **2.3 Usos y aplicaciones de los residuos lignocelulósicos.**

Las moléculas que constituyen a los residuos lignocelulósicos permiten obtener productos de interés biotecnológico con alto valor industrial; por ejemplo, se han empleado como sustrato para la producción de compuesto de interés (harina, almidón, enzimas, polímeros, etc.), obtención de bioenergéticos (etanol), mejoradores o acondicionadores de suelo (composta), suplemento alimenticio para animales (ensilaje)(López y col. 2010).

La lignina representa una fuente valiosa para la obtención de compuestos químicos de tipo aromático, actualmente se ha presentado interés en utilizar métodos químicos y biológicos para la obtención de estos compuestos, ya que tiene importancia en la industria energética para la producción de combustibles (hidrocarburos, electricidad), compuestos químicos como son fenoles, aldehídos y cetonas (Chávez y col. 2013).

De la celulosa se obtienen compuestos para la industria alimentaria, por ejemplo, la carboximetilcelulosa, celulosa cristalina, y celulasas, estos compuestos poseen aplicaciones como aditivos, integrador, emulsificador, estabilizador en algunos alimentos; también se han extraído polímeros de la celulosa, ya que son muy importantes en aplicaciones de la industria papelera (Viloria, y col.2014).

Debido a que la hemicelulosa posee una gran variedad de monómeros y oligómeros sus aplicaciones en la obtención de compuestos son de amplio espectro, entre las aplicaciones principales se encuentran en la industria alimentaria (estabilizante, aglutinante), energética (etanol), farmacéutica (polímeros para encapsular medicamentos), y una biomolécula que ha incrementado su relevancia que es el xilano (Aguilar y Moreira. 2010).

### **2.4 Xilano**

Los xilanos son los principales componentes de las hemicelulosa y se pueden dividir en tres grupos: glucuronoarabinoxilanos (maderas suaves), glucuronoxilanos (maderas duras) y arabinoxilanos (residuos agrícolas), en los residuos agrícolas el porcentaje de arabinoxilano puede variar entre un 20-50% en base seca (Ebringerová y Heinze 2000).

La composición del arabinoxilano depende de la materia prima de extracción (residuo lignocelulósico), pueden estar formado por un esqueleto principal de unidades de xilosa unidas por enlaces  $\beta$ -(1,4), pueden tener sustituyentes en las posiciones 2 y 3 como arabinosa, glucosa, galactosa, ácido glucurónico, ácido ferúlico, ácido acético, entre otros (figura 5) (Ira y col. 2014).

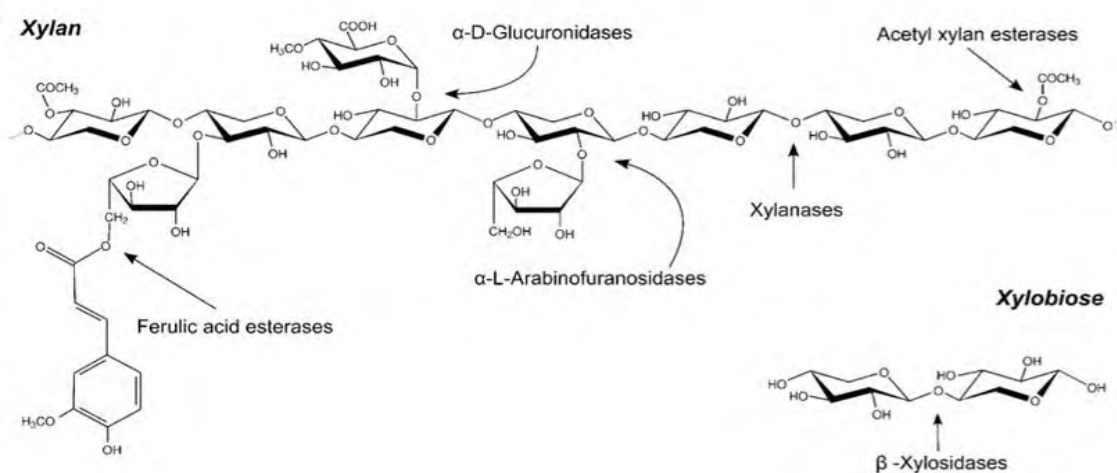


Figura 5. Estructura del xilano extraído de residuos de madera (tomado de Ira y col. 2014)

### 2.4.1 Aplicaciones importantes del xilano

El xilano es uno de los principales polisacáridos de mayor importancia en temas de investigación en los últimos años; debido a su estructura química y sus diferentes propiedades (la biocompatibilidad con otros compuestos, no toxicidad, y biodegradabilidad) este polisacárido tiene diversas funciones en diferentes sectores de la industria, las cuales se explican en la **Tabla 4** (Sedlmeyer. 2011).

Tabla 4. Aplicaciones del xilano.

Sector industrial	Uso o aplicación	Referencia
Alimentaria	Aditivos alimentarios Edulcorantes	Sedlmeyer. 2011 Vázquez y col. 2000
Papelera	Aditivo	Ebringerova y Heinz. 2000
Farmacéutica	Encapsulación Biopolímero	Ebringerova. 2005 Welcke. 2014

## 2.4.2 Métodos de extracción de xilano.

La extracción de xilano ha sido ampliamente estudiada y practicada desde hace más de 80 años, principalmente en residuos de madera; actualmente aumento el interés en su aislamiento para desarrollar productos de valor añadido, y se han buscado distintas materias primas para su obtención (Tabla 6).

Los desafíos implicados en la extracción del xilano son la resistencia de la biomasa, debido a su estrecha asociación con los otros componentes de las paredes celulares tales como la celulosa y la lignina a través de enlaces químicos (Panthapulakkal. 2014). Se han probado diferentes métodos para la obtención de xilano de distintos residuos lignocelulósicos, entre ellos se encuentran procesos físicos, fisicoquímicos, químicos, y biológicos (Tabla 5).

**Tabla 5. Métodos de extracción de xilano (Colorado y col. 2014, Kumar y Wyman. 2009, Yachmenev y col. 2009, Kim y col. 2008).**

Método	Fundamento	Ventaja	Desventaja
<b>Procesos físicos.</b>			
Utilizan energía para modificar y/o separar las estructuras de los componentes presentes en los residuos lignocelulósicos.			
<b>Pulverización mecánica</b>	Se caracteriza por la reducción de tamaños de los residuos lignocelulósicos.	Bajo costo de operación.  Mayor área de contacto.	Disminuye el índice de cristalinidad.
<b>Microondas</b>	Utilizan la energía creando vibraciones junto con una sustancia química para separar la hemicelulosa de los otros componentes.	Incrementa la extracción de hemicelulosa.  Solución es más homogénea.	Modificación de las estructuras cuando los parámetros no son los correctos.
<b>Ultrasonido</b>	Consiste en utilizar la energía ultrasónica para producir cambios permanentes en los residuos lignocelulósicos.	Reducción de tiempo y de temperatura.	Modificación de las estructuras cuando los parámetros no son los correctos.
<b>Procesos fisicoquímicos.</b>			
Se caracteriza porque hay una combinación de una solución química con procesos de descompresión instantánea que provocan la ruptura de las estructuras del residuo lignocelulósico.			

<b>Explosión a vapor</b>	Este proceso consiste en someter a los residuos lignocelulósicos junto con algún compuesto químico de característica acida o alcalina a condiciones de presión y temperaturas controladas para la obtención de xilano.	Extracción de xilano de mayor pureza.  Proceso de extracción simple y de bajo costo.	Tiempos muy prolongados provoca la degradación del xilano.
<b>Explosión de fibra de amoniaco</b>	Se expone el residuo lignocelulósico con amoniaco anhídrido líquido a altas temperaturas (60-100°C) y presión alta (1,7 - 2 MPa).	No forma compuestos tóxicos.  Costo efectivo.	No es eficiente para biomasa con alto contenido en lignina.
<b>Explosión con CO<sub>2</sub></b>	Se basa en la utilización de presión y temperaturas controladas utilizando CO <sub>2</sub> para aumentar la tasa de hidrolisis.	Menor tiempo del proceso de extracción.	Se gasta una elevada cantidad de CO <sub>2</sub> .

<b>Método</b>	<b>Fundamento</b>	<b>Ventaja</b>	<b>Desventaja</b>
<b>Procesos químicos</b>			
El tratamiento se basa en la utilización de solventes químicos para alterar la estructura de los residuos provocando la liberación de xilano haciendo fácil la extracción.			
<b>Hidrolisis ácida</b>	En este método se emplean presiones y temperaturas, acompañado de soluciones acidas concentradas o diluidas como son H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , HCl, para la precipitación de xilano.	Hidroliza la hemicelulosa un 70%.	Corrosión del equipo. Formación de sustancias toxicas. Alto costo. Altera la estructura de la lignina.
<b>Hidrolisis alcalina</b>	En este método se emplean bajas presiones y temperaturas, acompañado de soluciones alcalinas como son NaOH, KOH, para la precipitación de xilano.	Libera la hemicelulosa un 90%. No altera la estructura de la hemicelulosa. No altera la estructura de la lignina.	Requiere largos tiempos para la extracción.  Se pueden formar sales.
<b>Procesos biológicos</b>			
<b>Enzimático</b>	En este tipo de tratamientos se utilizan diferentes tipos de hongos, bacterias y/o sus enzimas para realizar el proceso de deslignificación.	Requiere poca energía.  Hemicelulosa de mayor pureza	Hidrólisis lenta.  Buscar y/o encontrar enzimas específicas.

A continuación, en la **Tabla 6** se muestran algunos ejemplos de residuos lignocelulósicos utilizados para la extracción de xilano con su respectivo método utilizado.

**Tabla 6. Ejemplos de extracción de xilano**

<b>Tratamiento</b>	<b>Materia prima</b>	<b>Referencia</b>
<b>Hidrólisis ácida</b>	Mazorca de maíz	Yang y col. (2005)
<b>Autohidrólisis</b>	Mazorca de maíz	Garrote y col. (2002)
<b>Hidrólisis alcalina</b>	Cascara de cebada Pericarpio de maíz	Roos y col. (2009) Samanta y col. (2012)
<b>Enzimático</b>	Paja de trigo, desechos de maíz.	Sun y Cheng. (2002)

## 2.5 Caracterización química del xilano.

La funcionalidad del xilano depende de las características estructurales y de los grupos funcionales que lo conforman (Sedlmeyer. 2011). Existen diversos métodos de caracterización tales como: espectroscopía infrarroja, difracción de rayos X, microscopía electrónica de barrido, resonancia magnética nuclear, entre otras; sin embargo, en esta investigación solo se utilizarán los métodos que se describen a continuación.

### 2.5.1 Espectroscopía de infrarrojo usando transformada de Fourier

La espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) posee una función principal, que es identificar los grupos funcionales de diversos compuestos; da Silva y col. (2012) lo utilizaron para estudiar el comportamiento presente en el xilano extraído de mazorca de maíz.

En la **Figura 6** se muestra el espectro del xilano extraído de mazorca de maíz, en el cual se puede observar los grupos funcionales principales en las siguientes bandas de absorción  $3405\text{cm}^{-1}$  que corresponde a la vibración de alargamiento del enlace de puentes de hidrogeno del grupo OH, y  $1160\text{ cm}^{-1}$  donde se ubican los grupos C-O-C, y C-C. Además, se detectan bandas de absorción cercana a  $1375\text{ cm}^{-1}$ ,  $1044\text{ cm}^{-1}$  y  $897\text{ cm}^{-1}$  que pertenecen a estructuras químicas típicas de unidades de azúcar de hemicelulosa (da Silva y col. 2012).

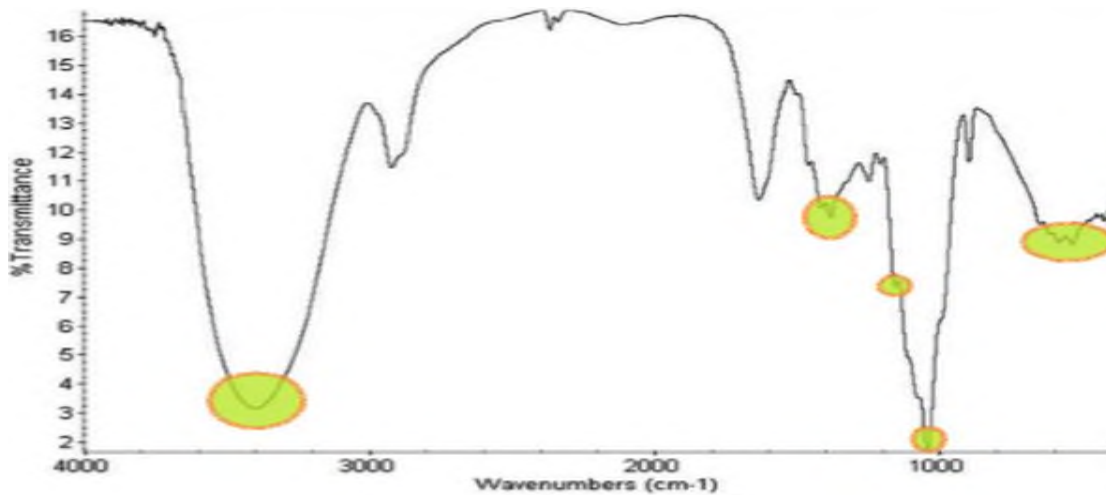


Figura 6 Espectro FT-IR del polvo de xilano extraído de mazorca de maíz (tomado de da Silva y col. 2012).

### 2.5.2 Difracción de rayos X

El método de difracción de rayos X constituye una herramienta importante para el estudio de la estructura interna de diversos compuestos. El fundamento de la técnica se basa en la interacción de la estructura cristalina de un sólido con una fuente de rayos X.

da Silva y col. (2012), realizaron el análisis del xilano extraído de mazorcas de maíz, así mismo Wu Shuping y col. (2011) evaluaron la estructura del xilano obtenido de residuos de maíz, utilizando este método de análisis.

Estos autores obtuvieron los difractogramas del xilano (Figura 7) y observaron que la difracción de rayos X detecta unos pocos y pequeños picos, que indican que el xilano presenta una baja cristalinidad, aunque el pico de mayor importancia se observa en la posición ( $2\theta=18$ ).

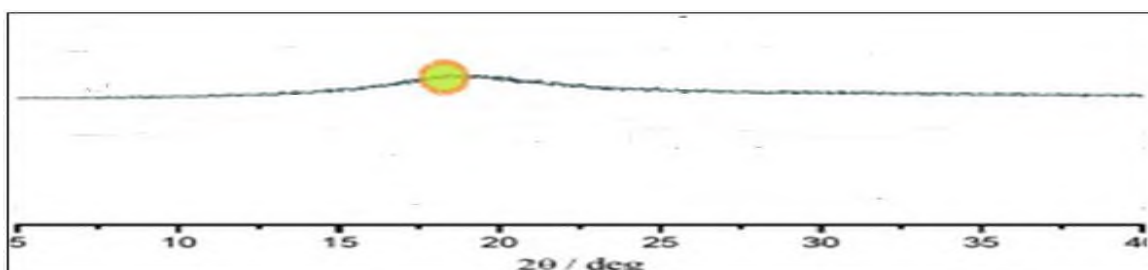


Figura 7. Difractograma del xilano obtenido de residuos de maíz (tomado de Wu Shuping y col. 2011).

## **2.6 Evaluación del xilano como fuente de carbono utilizando hongos filamentosos mediante la técnica de crecimiento radial.**

El seguimiento de la cinética de crecimiento de los hongos filamentosos, son aspectos biotecnológicos de suma relevancia ya que indica la capacidad del microorganismo para colonizar el sustrato empleado, es decir que esta técnica nos permite evaluar la capacidad de los hongos filamentosos empleados para invadir y adaptarse a los nutrientes que le provee el sustrato y a su vez evaluarlos si se podrían emplearse en una fermentación en medio sólido (Gutiérrez y col. 1999).

Para poder medir el crecimiento radial es indispensable conocer criterios para la selección de sustratos y hongos filamentosos.

### **2.6.1 Criterios para la selección de sustratos.**

El sustrato a utilizar depende del producto a obtener, (comúnmente se utilizan residuos agrícolas o forestales) y debe de poseer las siguientes características (Murthy y col. 1993):

- Elevadas concentraciones de carbohidratos y/o proteínas.
- Fermentable por microorganismos.
- Baja tendencia a la aglomeración con el micelio.
- Insoluble en agua, para garantizar las condiciones del cultivo en estado sólido.

Un sustrato ideal es considerado aquel que provea al microorganismo los nutrientes necesarios para su metabolismo celular y fermentativo.

### **2.6.2 Tamaño de partícula**

Es necesario determinar el tamaño de partícula que se utilizará, ya que está relacionada con la transferencia de masa entre el microorganismo y el sustrato.

En partículas pequeñas el área de contacto entre el micelio del microorganismo y el sustrato se incrementa y a su vez limita el intercambio gaseoso, al contrario en partículas grandes el área de contacto entre micelio-sustrato es menor, pero aumenta el intercambio gaseoso (Murthy y col. 1993)

### 2.6.3 Hongos filamentosos (HF)

Los hongos filamentosos son los microorganismos mejor adaptados para crecer en sustratos sólidos con bajo contenido de agua libre; además, tienen la capacidad de usar una amplia variedad de polisacáridos como fuentes de carbono. Se han reportado el uso de diferentes tipos de sustratos de origen vegetal para su uso en fermentaciones sólidas con hongos filamentosos, evaluando las mejores condiciones para obtener diferentes metabolitos de interés biotecnológico, entre ellos se encuentran los prebióticos, enzimas, hormonas, alcoholes. Se ha reportado el uso de madera, tallo de algodón, paja y salvado de trigo, cáscara de arroz, bagazo de caña de azúcar, tallos y mazorca de maíz, cáscara de maní, cáscara de almendra, paja de cebada, entre otros (Baysal y col. 20033).

### 2.6.4 Criterios para la selección de HF.

No todos los microorganismos son aptos para crecer y desarrollarse en un medio sólido, debido a las limitaciones que esta presenta. Entonces la selección de un microorganismo para llevar a cabo la fermentación debe de cumplir estos requisitos:

- Producir enzimas necesarias para poder desdoblar varias fuentes de carbono.
- Capacidad de adherencia y penetración en las partículas del sustrato.
- Capacidad de desarrollarse y/o proliferar en una mínima cantidad de agua.
- Crecer en elevadas concentraciones de nutrientes.
- Si los productos metabólicos son destinados a la industria de los alimentos, deben de pertenecer a los microorganismos GRAS (Chahal. 1983).

Los microorganismos más utilizados para la degradación de residuos agrícolas son los hongos filamentosos, en especial del género *Aspergillus* ya que tienen la característica de ser xilófagos, queriendo decir que poseen la facilidad de adaptarse a diversos sustratos obtenidos de dichos residuos (Prado. 2016).

### 2.6.5. Ventajas de usar HF

- Proliferan en sustratos simples, ya que un único sustrato proporciona todos los nutrientes necesarios.
- Facilidad en la obtención de esporas.

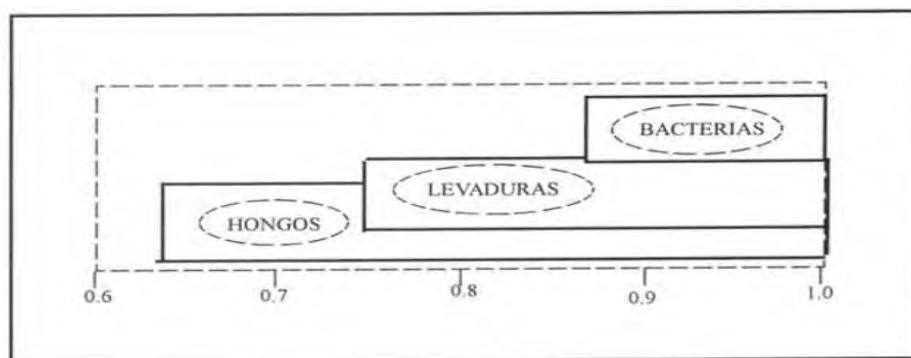
- Bajo riesgo por contaminación por cepas bacterianas.
- Bajo consumo de disolventes para la extracción de los productos (Christen y col.1993).

## 2.6.6 Factores importantes para el crecimiento de los hongos filamentosos

### 2.6.6.1 Actividad de agua

El papel del agua es importante en el crecimiento y desarrollo de los hongos, ya que una humedad elevada en el medio mayor a 80% causa daños severos en los poros del sustrato, provocando poca difusión de oxígeno y por ende muerte del hongo; contrariamente una humedad baja menor a 30% no permite un crecimiento adecuado del microorganismo ya que provoca una baja disponibilidad del sustrato. (Prinyawiwatkul y col. 1993). Por consiguiente, la modificación de este parámetro se puede utilizar para modular el metabolismo de los microorganismos, produciéndose metabolitos de interés comercial.

En la **Figura 8** se muestra el intervalo de la actividad de agua correspondiente para cada microorganismo, y en donde podemos observar que los hongos su rango oscila entre 0.65-0,75.



**Figura 8** Actividad de agua de algunos microorganismos (tomado de Prinyawiwatkul y col. 1993).

### 2.6.5.2 pH y temperatura

Estos parámetros son relevantes ya que se deben de controlar dependiendo del microorganismo a utilizar, el tipo de sustrato y el producto de interés que se quiere obtener. La capacidad metabólica para la producción de enzimas en hongos filamentosos se ve influenciada por el pH del medio; a un pH debajo de 5 y por encima de 7, se presentan

cambios notables en la cantidad de enzima presente y por ende en la capacidad de adaptarse al sustrato (Sargantanis y col. 1993).

De igual forma pasa con la temperatura; cada microorganismo presenta un intervalo de temperatura distinta, en el que si la temperatura óptima ayudara a un buen crecimiento y a producir un metabolito de interés; pero cuando esta sobrepasa los límites mínimos o máximos de temperatura, las funciones celulares se ven afectadas de manera significativa (Sargantanis y col. 1993).

## 2.7 Degradación enzimática de la celulosa y hemicelulosa.

Los microorganismos capaces de degradar la celulosa y hemicelulosa secretan un complejo enzimático (Figura 8), donde predominan enzimas extracelulares como son las celulasas y xilanasas. Para desdoblar las fibrillas de la celulosa, los microorganismos presentan dos tipos de sistemas de enzimas importantes; los agregativos y los no agregativos (Vries y col. 2001; Aro y col. 2005).



Figura 9. Capacidad enzimática (tomado de Aro y col. 2005).

## 2.8 Características del residuo lignocelulósico y de los hongos utilizados.

### 2.8.1 Generalidades del *Amaranthus hypochondriacus*.

El amaranto es una planta ancestral (Figura 10) perteneciente a la familia *Amaranthaceae*, se trata de un género de plantas ampliamente distribuido por la mayor parte de las regiones templadas y tropicales, contiene un alto nivel alimenticio, lo cual lo hace una excelente alternativa para regiones con dificultades para la siembra de otros cultivos importantes

(García. 2012). Una de las características más importantes del *Amaranthus hypochondriacus* es, su alto valor nutritivo. El cultivo de amaranto, se pueden aprovechar de múltiples formas, como grano, verdura o forraje.

El valor nutritivo del residuo lignocelulósico del amaranto ha sido también ampliamente estudiado, se ha encontrado que la hoja contiene altos valores de calcio, hierro, fósforo y magnesio, así como ácido ascórbico, vitamina A, proteínas y carbohidratos (Martínez y col. 2010)



Figura 10. Cultivo de amaranto (amarantopedia.com)

### 2.8.2 Cultivo y distribución de la producción del *Amaranthus hypochondriacus*

El cultivo de amaranto es muy resistente a la sequía, heladas y plagas, lo cual lo hace un cultivo fácil de adaptarse a diferentes hábitats (Espitia y col. 2010), además de que los granos del amaranto tienen una gran relevancia en la elaboración de productos como es la alegría. En la República Mexicana, las zonas de cultivo y producción de amaranto son: Puebla, Morelos, México, Tlaxcala, Oaxaca, Jalisco y Querétaro; se estima que el rendimiento del residuo lignocelulósico es de 3.8 a 6.1 t/ha anualmente (SIAP, 2017).

### 2.8.3 Composición fisicoquímica del residuo lignocelulósico del amaranto

El residuo lignocelulósico del amaranto está compuesto por una alta cantidad de carbohidratos, proteína y elementos minerales (Tabla 7), por ello lo hace un sustrato importante para diferentes análisis, enfocados en la obtención de biomoléculas (Gómez y col. 2011).

De acuerdo a la literatura, ya se ha identificado la composición química de los componentes secundarios del residuo del amaranto, pero aún falta la composición principal (celulosa, hemicelulosa, lignina).

Gómez y col. (2011), Arce y col. (2011), y otros, han demostrado y cuantificado la caracterización bromatológica del *Amaranthus hypochondriacus*; los datos obtenidos se muestran en el siguiente cuadro.

**Tabla 7 Composición química del residuo lignocelulósico del *Amaranthus hypochondriacus* (tomado de Gómez. 2011).**

Componente	Harina del residuo lignocelulósico del amaranto (Gómez y col., 2011)	Harina del residuo lignocelulósico del amaranto (Alfaro y col., 1987)	Harina de la hoja de amaranto (Soriano y col., 2004)	Harina de la hoja de amaranto (arce y Vázquez, 2011)
Humedad	2.26	10.14	5.73	5.8
Ceniza	15.33	9.27	20.73	11.7
Extracto etéreo	4.24	2.64	4.46	4.9
Proteína cruda	24.75	14.18	22.2	18.4
Fibra cruda	7.7	15.44	14.13	8.2
ELN	45.69	48.33		49
<b>*ELN = Extracto libre de nitrógeno, se calculó por diferencia a 100</b>				

#### 2.8.4 Generalidades de los hongos utilizados (*Aspergillus*)

Existe evidencia de diferentes trabajos científicos reportados en donde evalúan la capacidad metabólica de hongos filamentosos; en especial del género *Aspergillus*, ya que tienen la capacidad de adaptarse a diversos sustratos lignocelulósicos, para producir metabolitos de interés; por ello han recibido una atención considerable, llegando a ser uno de los grupos de hongos filamentosos mejor estudiados.

*Aspergillus oryzae* es un hongo filamentos, aeróbico y ampliamente utilizado en las industrias de fermentación japonesas, incluyendo la salsa de soja, el sake, la salsa de habichuelas y la producción de vinagre. Los hongos filamentosos generalmente tienen la capacidad de producir diversas y grandes cantidades de enzimas de una manera secretora, *Aspergillus oryzae* tiene un potencial prominente para la producción secretora de diversas

enzimas capaces para desdoblar sustratos lignocelulósicos, además, los avances en la tecnología de ingeniería genética han llevado a la aplicación de *Aspergillus oryzae* en la producción de enzimas industriales en la biotecnología moderna (Bok y col. 2004). En las últimas décadas se ha estudiado con más relevancia en la industria alimentaria por su gran capacidad secretora de enzimas y por ser una especie que no produce toxinas.

*Aspergillus flavus* se describe, macroscópicamente, como un hongo aterciopelado, con variaciones de color, ya que puede ser amarillo, verde, con reverso dorado a rojo-marrón (Hedayati y col. 2007). Actualmente *Aspergillus flavus* se ha empleado para la producción de potentes carcinógenos, como es las aflatoxinas, también tiene un gran impacto en la producción de enzimas, antibióticos, además de múltiples productos (Arias y Piñero, 2008).

Debido a los diversos productos de interés biotecnológicos que pueden ofrecer estos microorganismos, se decidió evaluarlos en este trabajo.

## 2.9 Antecedentes

### 2.9.1 Aprovechamientos de residuos lignocelulósicos.

El aprovechamiento de los residuos lignocelulósicos, es de interés en el ámbito mundial. En la actualidad las investigaciones se enfocan en el desarrollo de tecnologías limpias y sistemas cerrados que permitan conservar el medio ambiente y que empleen los residuos lignocelulósicos como son las materias primas en la extracción (Tabla 8), obteniendo productos de valor agregado; como son enzimas, metabolitos, macromoléculas y otros productos de interés biotecnológico.

Tabla 8. Aprovechamiento de residuos.

Producto obtenido	Descripción del trabajo	Referencia
Observar la adaptación del hongo.	Evaluaron la síntesis de proteína a partir del crecimiento vegetativo de <i>Pleurotus spp.</i> sobre residuos de algarrobo y uva pasa	Montoya y col. (2006)
Lacasa y celobiosa deshidrogenasa	Aislaron y evaluaron la actividad enzimática de hongos descomponedores de madera.	Montoya y col. (2006)
Xilanasas	Utilizaron xilano como fuente de carbono para la producción de endo-1,4- $\beta$ -xilanasas utilizando <i>Bacillus flexus</i> NJY2	Mendoza y col. (2010)
Celulasas	Evaluaron in vitro la obtención de celulasas producidas por cepas nativas de <i>Trichoderma reesei</i> , <i>Cladosporium herbarum</i> y <i>Aspergillus niger</i> .	Ramírez y col. (2012)
Ácido cítrico	Evaluaron la cepa nativa de <i>Aspergillus niger</i> en la producción de ácido cítrico sobre un sustrato con sacarosa y otro con almidón. Los rendimientos	Sáez y col. (2002)

	fueron bajos comparados con los que se reportan en la literatura.	
<b>Ácidos ferúlicos, ácido vainillínico y eugenol</b>	Utilizaron residuos de plátano para la producción de metabolitos secundarios (compuestos aromáticos, ácido ferúlico, vainilla, ácido vainillínico y eugenol) por fermentación en estado sólido empleando el hongo <i>Lentinus crinit.</i>	Granada y col. (2005)
<b>Xilanasas, celulasas.</b>	Evaluaron diferentes fuentes de carbono xilosa, carboximetilcelulosa, celulosa en polvo, algodón, papel de filtro, pectina cítrica, heno de avena xilano y pectina de manzana, empleando <i>Neocallimastix frontalis</i> , teniendo como resultado al xilano dentro de las fuentes de carbono mejor evaluadas en la actividad enzimática y el crecimiento	Mayorga y col. (2005)
<b>Celulosa</b>	Evaluaron la influencia de los tratamientos de hidrólisis ácida e hidrólisis alcalina en la estructura del bagazo de malta, buscando la liberación de las fibras de celulosa.	Mussatto y col. (2006).
<b>Fibra dietética</b>	Evalúo mediante Hidrólisis enzimática al residuo lignocelulósico de la piña para incrementar la fibra dietética soluble presente en este residuo.	Rivera. (2018)

### 2.9.2. Residuos lignocelulósicos y métodos empleados en la extracción de xilano.

Los residuos lignocelulósicos ricos en polímeros como la hemicelulosa se pueden emplear para la extracción de xilano mediante procesos químicos, físicos y/o biológicos. Actualmente los esfuerzos en la investigación se enfocan en la búsqueda de residuos lignocelulósicos que poseen una cantidad adecuada de hemicelulosa para ser utilizada como materia prima para la obtención de xilano así mismo el desarrollo de tecnologías para su extracción.

Se han realizado investigaciones utilizando técnicas convencionales hasta las más sofisticadas, para aumentar su pureza y mejorar el rendimiento; las cuales se muestran a continuación:

➤ Hidrólisis ácida.

Cruz y col. (2000) sometieron la harina de mazorcas de maíz a tratamientos con ácido sulfúrico al 2% a 125°C durante 15 minutos para extraer xilano, obteniendo un rendimiento del 98 %; así mismo Mussatto y Roberto. (2005) utilizaron residuos sólidos del malteado en la producción de cerveza con las mismas condiciones para la extracción, obteniendo rendimientos similares en este caso 92%.

➤ Autohidrólisis

Alfaro y col. (2008) utilizaron la harina de: *Eucalyptus globulus*, *Arundo donax*, tallos de girasol (*Helianthus annuus*), tagasaste (*Chamaecytisus proliferus*) y *Paulownia fortunei* para evaluar su viabilidad para la obtención de energía y otros productos químicos a través de un fraccionamiento integral vía autohidrólisis; obteniendo buenos resultados en la obtención de xilano, siendo los tallos de girasol los que presentan un mayor contenido con 23,9%.

➤ Autohidrólisis combinada

Rowley y col. (2005) utilizaron harina de restos de maíz como materia prima para la extracción del xilano, emplearon un pretratamiento con clorito de sodio para la deslignificación para posteriormente utilizar dimetilsulfóxido (DMSO) para obtener el producto, obteniendo un rendimiento del 90%.

➤ Hidrólisis alcalina

Samanta y col. (2012). Utilizaron el método de hidrólisis alcalina para la extracción de xilano, utilizando harina del pericarpio de maíz como materia prima de extracción, obteniendo resultados similares a lo reportado, con un rendimiento del 96%.

Laine y col. (2015) utilizaron como materia prima para la extracción de xilano la pulpa de madera, empleando el método de incubación junto con hidrólisis alcalina, obtuvieron un rendimiento del 16% de extracción.

➤ Enzimático

Spork y col. (2017) utilizaron bagazo de caña de azúcar como materia prima para la extracción de xilano, emplearon un pretratamiento con sulfito alcalino, para posteriormente utilizar un ataque enzimático para obtener un producto de mayor pureza, bajo estas condiciones el rendimiento de extracción del 22%.

➤ Microondas

Yang y col. (2009) utilizaron el método de microondas acompañado de una solución con ácido sulfúrico para la extracción de xilano de la harina de mazorca de maíz, obteniendo un rendimiento de extracción del 55 %.

Panthapulakkal y col. (2013) extrajeron xilano mediante el método de microondas con hidróxido de sodio utilizando harina de abedul como materia prima obteniendo un rendimiento del 60 %.

### **2.9.3. Investigaciones del residuo lignocelulósico del *Amaranthus hypochondriacus***

En los últimos años el residuo lignocelulósico del *Amaranthus hypochondriacus* ha tenido mayor relevancia en investigaciones científicas, el reciente interés se enfoca debido a su composición y estructura química.

A continuación, se muestra algunas investigaciones que se han realizado utilizando el residuo lignocelulósico del *Amaranthus hypochondriacus*.

Ocampo y col. (2005) utilizaron la harina de forraje de *Amaranthus hypochondriacus* para la obtención de compuestos fenólicos en una fermentación líquida utilizando *Aspergillus nigger*.

Por otro lado, Arce y col. (2011) establecieron que el residuo lignocelulósico del *Amaranthus hypochondriacus* tiene potencial para la obtención de fibra dietética, lo comprobaron sometiendo a la harina a un tratamiento enzimático para la extracción y cuantificación de este componente.

García. (2013) extrajo proteínas con posibles propiedades de actividad biológica del residuo lignocelulósico del *Amaranthus hypochondriacus*, se enfocaron en la purificación y la

caracterización bioquímica y biológica del lunasin, péptido con propiedades preventivas del cáncer.

Gómez. (2014) evaluó fracciones peptídicas bioactivas obtenidas de la hidrólisis enzimática de las proteínas de la harina del residuo lignocelulósico del *Amaranthus hypochondriacus* con actividad inhibitoria de la enzima convertidora de la angiotensina I.

Méndez y col. (2018) evaluaron el crecimiento radial de hongos filamentosos (*Aspergillus flavus* y *Aspergillus oryzae*) utilizando al residuo lignocelulósico del amaranto como fuente de carbono.

### 3. JUSTIFICACIÓN

La demanda y la necesidad de alimentos a nivel mundial genera una gran cantidad de residuos lignocelulósicos, simplemente en México se genera alrededor de 76 millones de toneladas de estos residuos, los cuales en la mayoría se convierte en un problema ya que no se les da un tratamiento adecuado y no tienen un valor comercial, aunque actualmente son utilizados como alimento de ganado, elaboración de composta, o en otros casos se descompone en los campos dañando el suelo, agua y medio ambiente en general.

En busca de aprovechar los residuos lignocelulósicos la biotecnología ha planteado estrategias para darle un valor agregado utilizándolos como sustrato para la extracción y producción de metabolitos de interés debido a su riqueza en nutrientes que poseen.

Con el fin de darle un valor agregado a estos residuos se determinó a utilizar el residuo del amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) ya que en México se producen alrededor de 5000 toneladas al año, del cual se utilizan principalmente las semillas en una proporción 10% a 15%, dejando que el residuo lignocelulósico se pierda (85-90%), ya que no tiene otro valor comercial; por lo tanto, en este estudio se busca analizar el uso de este residuo (*Amaranthus hypochondriacus*) como una alternativa para la obtención de xilano, heteropolímero de interés en la industria biotecnológica y como fuente de carbono para la medición del crecimiento radial de hongos filamentosos (*Aspergillus flavus* y *Aspergillus oryzae*).

#### **4. HIPÓTESIS**

El residuo lignocelulósico de *Amaranthus hypochondriacus* puede utilizarse para la extracción de xilano; el cual podrá implementarse como fuente de carbono para la evaluación del crecimiento de hongos filamentosos.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo Principal

- ❖ Extraer y caracterizar el xilano del residuo lignocelulósico de amaranto y evaluarlo como fuente de carbono para el crecimiento de hongos filamentosos.

### 5.2 Objetivos Secundarios

- ❖ Caracterizar mediante análisis proximal a la harina del residuo lignocelulósico del amaranto.
- ❖ Extraer y determinar el porcentaje de rendimiento del xilano utilizando dos álcalis (hidróxido de sodio e hidróxido de potasio) a diferentes concentraciones.
- ❖ Caracterizar el xilano mediante espectrometría infrarroja por transformada de Fourier y difracción de rayos X.
- ❖ Evaluar la velocidad de crecimiento radial de los hongos filamentosos (*Aspergillus oryzae* y *Aspergillus flavus*) utilizando medios de cultivo agar- amaranto y agar-xilano a dos niveles de concentración 5% y 10%.

## 6.- MATERIALES Y MÉTODOS.

### 6.1. Desarrollo experimental.

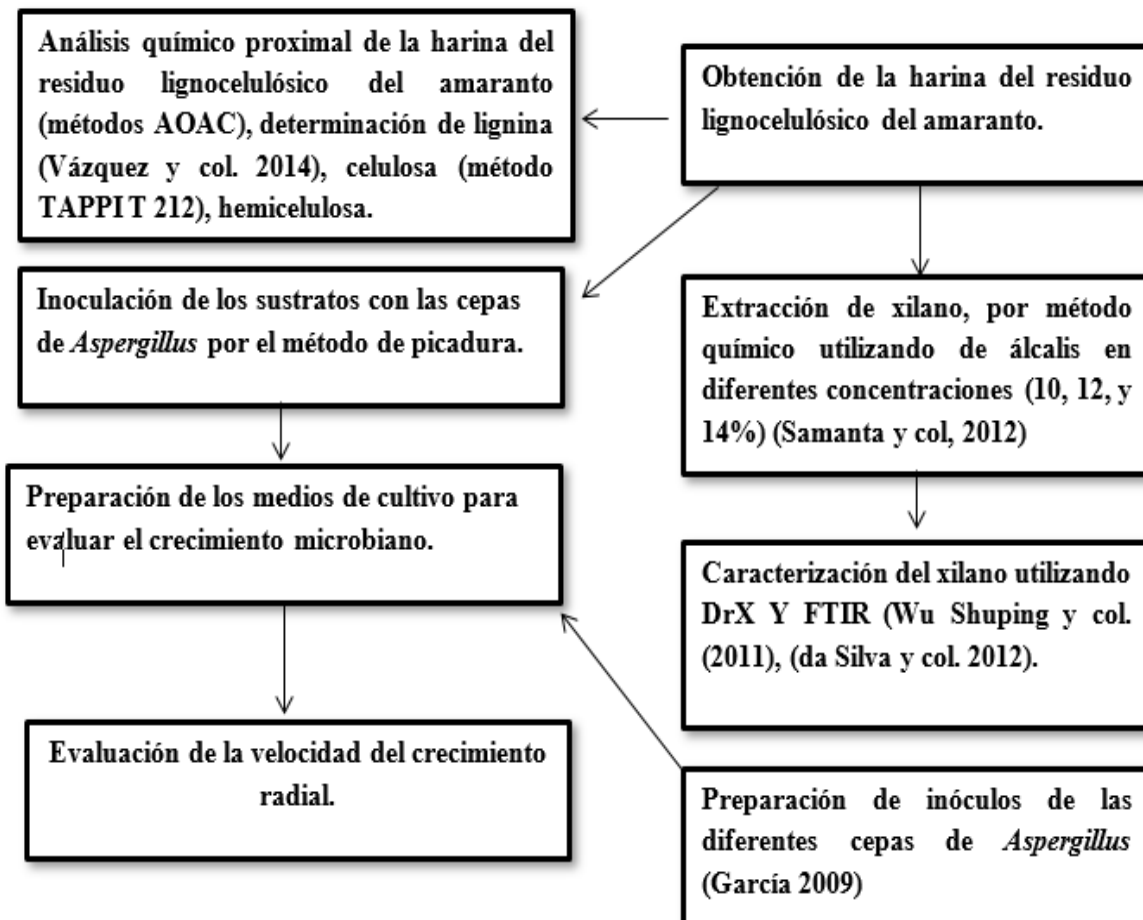


Figura 11. Esquema del desarrollo experimental.

## 6.2 Obtención de la harina del residuo lignocelulósico del *Amaranthus hypochondriacus*.

El residuo lignocelulósico del amaranto que se utilizó para la obtención de la harina fue donado por productores de la ciudad de Loma Bonita Oaxaca.

El residuo lignocelulósico del amaranto se trituro en un molino manual para granos (marca Ecom), posteriormente se tamizo utilizando malla 40 y 18 para encontrar el tamaño de partícula deseada entre 0.5 y 1 cm; una vez obtenida la harina se guardó en recipientes de plástico bien sellados y en un desecador para evitar la entrada de humedad.

## 6.3 Análisis químico proximal.

Se utilizaron procedimientos y metodologías normalizadas por las normas AOAC 2000 para la determinación del análisis químico proximal de la harina del residuo lignocelulósico del amaranto (Tabla 9).

Tabla 9. Determinación del análisis químico proximal

Análisis químico proximal	Referencia
Humedad	(AOAC 977.11),
Proteína bruta	(AOAC 955.04)
Ceniza	(AOAC 942.05)
Extracto etéreo	(AOAC 920.39)
Fibra bruta	(AOAC 962.09)
Fibra dietética total	Kit Megazyme (AOAC 2009.01 / AOAC 2011.25)

La determinación del contenido de los extractos libres de nitrógeno (carbohidratos) se realizó por cálculo indirecto mediante la ecuación propuesta por (Tarsicio, 2018):

(1)

$$\%ELN = 100 - (\%H + \%G + \%C + \%F + \%Pc)$$

Donde, %ELN = Extracto libre de nitrógeno, %H = porcentaje de humedad de la muestra; %G = porcentaje de grasa; %C = porcentaje de ceniza; %F = porcentaje de fibra cruda y %Pc = porcentaje de proteína

## 6.4 Cuantificación de componentes estructurales

Así mismo se evaluó la cantidad de hemicelulosa, celulosa y lignina presentes en la harina del residuo lignocelulósico del amaranto. La cantidad de xilano recuperado está directamente relacionada con la cantidad de estos componentes.

### 6.4.1 Determinación de lignina

Se determinó usando el método empleado por Vázquez y col. (2014) el cual se explica a continuación:

Se pesaron 0.5 g de muestra y se colocaron en tubo de ensaye, posteriormente se agregaron 5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 72%, se colocó en un baño maría a 30°C por una hora en agitación constante, después se pasó a un frasco tipo Schott de vidrio con tapa y se adicionó agua destilada hasta diluir el ácido al 4%, a continuación se colocó el frasco en una autoclave a 121°C (15 lbs) por 1 hora después se filtró el contenido en un filtro tipo Goch a peso constante; el retenido se colocó junto con el filtro en una estufa a 30°C por 12 horas.

La cantidad de lignina (%L) se determinó por diferencia de peso utilizando la siguiente formula;

(2)

$$\%L = \left( \frac{CSR}{CM} \right) \times 100$$

Donde CSR es la cantidad de sólidos recuperados y CM la cantidad inicial de la muestra.

### 6.4.2 Determinación de holocelulosa

Se determinó el contenido de holocelulosa empleando el método propuesto por Browning. (1967), el cual se explica a continuación:

Se pesaron 5 g de muestra y se mezclaron con 300 mL de agua destilada, se dejó reposar por 4 horas y posteriormente se añadieron 10 gramos de NaClO<sub>2</sub> (clorito de sodio) y 3 mL de

ácido acético glacial, se colocó en un baño maría a 70°C y a reflujo durante 30 minutos, enseguida se filtró a través de un filtro tipo Goch lavándose la muestra con agua fría, el residuo sólido que se quedó en el filtro se trató con 400 mL de NaOH (hidróxido de sodio) al 1 % durante 35 minutos en agitación constante, se prosiguió a filtrar nuevamente con agua tibia hasta obtener un pH igual al inicial.

El porcentaje de holocelulosa se calculó mediante la siguiente formula;

(3)

$$\%H = \left( \frac{PF}{PI} \right) * 100$$

donde % holocelulosa (%H), peso final (PF), peso inicial (PI).

### 6.4.3 Determinación de celulosa

la determinación de celulosa se realizó por la metodología reportado TAPPIT 212 (1999), como se menciona a continuación :se pesó 1g de holocelulosa y se colocó en un matraz de 100 mL, se añadieron 10 mL de hidróxido de sodio al 17.5 %, y esta mezcla se colocó a un baño maría a 25°C por 15 min; manteniendo en agitación periódica cada 5 min, posteriormente se añadieron 5 ml de hidróxido de sodio al 17.5%, nuevamente se colocó la muestra por 30 min en el baño maría agitándose cada 5 min, enseguida se añadieron 30 mL de agua destilada se agito y se deja reposar por 60 min.

A continuación, con ayuda de un filtro tipo Goch se recuperó el material sólido, haciendo lavados con hidróxido de sodio al 17.5% (25 mL) y agua destilada (30 mL), el material sólido se depositó en un matraz y se agregó ácido acético al 10 % y se dejó reposar por 5 min, después se agregaron 50 mL de agua destilada y se filtró aplicando vacío, el material sólido se llevó a una estufa a 70°C para retirar la humedad presente.

El porcentaje de celulosa se calculó de acuerdo a la siguiente formula:

(4)

$$\%C = \frac{PF}{PI} 100$$

Donde cantidad de celulosa (%C), peso final (PF), peso inicial (PI).

Para comprobar la reproductibilidad de los experimentos se han realizado por triplicado.

#### 6.4.4 Determinación de hemicelulosa

El contenido de hemicelulosa fue obtenido por la diferencia de la holocelulosa obtenida y la celulosa utilizando la siguiente formula:

(5)

$$\%HM = \%H - \%C$$

Donde cantidad de hemicelulosa %HM, cantidad de holocelulosa %H, cantidad de celulosa %C.

#### 6.5 Extracción del xilano.

La recuperación de xilano (Tabla 10) se realizó empleando dos procesos de extracción, químico y fisicoquímico, utilizando dos soluciones de álcali (hidróxido de sodio e hidróxido de potasio) a diferentes concentraciones; estos procesos se tomaron de la metodología descrita por Samanta y col. (2012) con algunas modificaciones.

Se realizó una suspensión en una relación 1:10 p/v (harina/solución alcalina) con los diferentes porcentajes de concentración (10, 12, 14%) mezclándose adecuadamente. Para llevar a cabo el primer proceso (fisicoquímico), la suspensión se depositó en una autoclave a una temperatura de 120°C y una presión de 15 lbs, por un tiempo aproximado de 60 min, transcurrido este tiempo se dejó enfriar a temperatura ambiente. Para el segundo proceso (químico) se realizó la suspensión de igual manera y se procedió a incubar en una incubadora de agitación orbital a 30°C por 16 horas en agitación constante. Posteriormente, para ambos métodos, la suspensión se filtró para desechar el material sólido y recuperar el sobrenadante papel filtro número 1. Una vez recuperado el sobrenadante se acidificó con ácido acético glacial hasta alcanzar un pH a 5.5; a continuación, el sobrenadante se le añadió dos volúmenes de etanol frío al 85% para su precipitación; se dejó sedimentar por 20 min a una temperatura de 4°C, se decantó para eliminar el exceso de líquido y se le añadieron otros dos volúmenes de etanol frío al 85% para la recuperación del xilano se llevó a 4000 rpm por 25 min a 4°C, al finalizar se decantó el sobrenadante para obtener así el sedimento el cual se secó en un horno a 50°C por 12 horas.

Tabla 10. Matriz para la extracción de xilano

Abreviatura del tratamiento	Método	Solución de álcali
HS10A	Hidrolisis fisicoquímica (Autoclave)	Hidróxido de sodio (10, 12, 14%)
HS12A		
HS14A		
HK10A		Hidróxido de potasio (10, 12, 14%)
HK12A		
HK14A		
HS10I	Hidrolisis química (Incubación)	Hidróxido de sodio (10, 12, 14%)
HS12I		
HS14I		
HK10I		Hidróxido de potasio (10, 12, 14%)
HK12I		
HK14I		

### 6.5.1. Rendimiento de los métodos de extracción xilano

Para determinar el rendimiento de xilano con los métodos de extracción utilizados se realizó una adaptación a la fórmula propuesta por Samanta y col. (2012).

(7)

$$\% \text{ de extracción} = (Xe/Pe) * 100$$

Donde Xe corresponde a la cantidad de xilano al final del método de extracción, y Pe a la cantidad inicial de la harina del residuo lignocelulósico del *Amaranthus hypochondriacus*.

Así mismo se utilizó la siguiente fórmula para analizar el porcentaje de extracción recuperado de xilano, respecto con la cantidad de hemicelulosa presente.

(8)

$$\% \text{ relativo del xilano} = \frac{\% \text{ de extracción}}{\% \text{ de hemicelulosa}} * 100$$

## 6.6. Caracterización química del xilano extraído.

### 6.6.1 Difracción de rayos X

Se obtuvieron los difractogramas que expresan gráficamente el comportamiento de la estructura interna (cristalina o amorfa) que posee el xilano, se utilizó el difractómetro de rayos X (marca Bruker AXS modelo D8 Advance; Alemania) el equipo utiliza la línea K $\alpha$  de

cobre ( $\lambda = 1.5405 \text{ \AA}$ ) y un detector SSD160 de alta velocidad para obtener los patrones de difracción de alta calidad en menos tiempo.

Los difractogramas fueron tomados haciendo barridos de  $0,01^\circ$  y mediante incidencia rasante a ángulos de  $1^\circ$  y  $3^\circ$  respecto a la superficie de la muestra, es decir, el haz incidente se colocó fijo y casi paralelo a la muestra y el detector se movió en un rango entre  $4^\circ < 2\theta < 80^\circ$ . (Rosas y col, 2016).

### 6.6.2 Identificación de grupos funcionales presentes en el xilano mediante espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR).

Las muestras obtenidas de xilano se analizaron con el espectrómetro IR (Perkin Elmer, modelo Spectrum 100), el cual tiene instalado el software IRsolution y la metodología de transformada de Fourier, que ofrece la relación señal/ruido para convertir las vibraciones en espectros. El análisis se realizó tomando 2 mg de muestra para leer el porcentaje de transmitancia a una longitud de onda de  $4000-500 \text{ cm}^{-1}$ , esta evaluación permitió comparar los espectros del xilano extraído con lo ya reportado en la literatura.

## 6.7 Crecimiento radial

Para medir el crecimiento radial de los hongos filamentosos se llevó a cabo el seguimiento del cambio de diámetro en función del tiempo haciendo una inoculación por piquete en el centro de la caja Petri y haciendo mediciones cada 24 h por 7 días. La caja Petri contenían medios de xilano o amaranto a diferentes concentraciones (Tabla 11).

**Tabla 11: Matriz para evaluación del crecimiento radial.**

Tratamiento	Hongo empleado	Concentración del sustrato
XO5	<i>Aspergillus oryzae</i>	Xilano (5%)
XO10		Xilano (10%)
XO5		Harina de amaranto (5%)
XO10		Harina de amaranto (10%)
XF5	<i>Aspergillus flavus</i>	Xilano (5%)
XF10		Xilano (10%)
AF5		Harina de amaranto (5%)
AF10		Harina de amaranto (10%)

### **6.7.1 Cepas de *Aspergillus* empleadas**

Para esta investigación se utilizaron las cepas de *Aspergillus oryzae* y *Aspergillus flavus*, aisladas de hojas sanas de café, recolectadas del municipio Rancho Grande, Valle Nacional, Oaxaca, por el grupo de trabajo del cuerpo académico Biotecnología Sustentable de la Universidad del Papaloapan. Las cepas se propagaron en cajas Petri con medio PDA mediante resiembras periódicas y se conservaron en refrigeración a 4°C. Para la obtención del inóculo las cepas mantenidas a 4°C fueron resembradas en cajas Petri con medio PDA sin gelificar a una temperatura promedio de 40°C y se incubaron a 30°C por 7 días. Pasado el tiempo de incubación se recolectaron las esporas en condiciones estériles agregando 20 mL de una solución de tween 80 al 0.1% (v/v) en cada caja Petri, se homogenizó la suspensión haciendo movimientos circulares (izquierda-derecha y arriba-abajo), se recuperó la suspensión con esporas y se depositó en un tubo Falcon estéril, posteriormente se tomaron 10 mL de la suspensión y se realizó una dilución 1:10 con agua destilada para determinar la concentración esporas utilizando una cámara Neubauer (Vásquez. 2013).

### **6.7.2 Preparación de los sustratos para evaluar el crecimiento radial.**

Para medir el crecimiento radial de los hongos filamentosos se empleó el xilano extraído con el método que obtuvo el mayor rendimiento y el rastrojo de amaranto como única fuente de carbono. Para la preparación de los medios de cultivo, se utilizaron dos niveles de concentración, 5 y 10% (p/v) para cada sustrato, suspendidos en una solución mineral compuesta de (g/L): 1g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 9.76g MES y agar 15%. Los medios se ajustaron a un pH de 5.5 con ácido acético glacial y se esterilizaron por 10 min a 15lb. posteriormente se vertieron 15 mL del medio en cajas Petri.

### **6.7.3 Inoculación**

Las cajas con los medios antes mencionados se inocularon en el centro mediante la técnica de punción utilizando palillos estériles sumergidos en una solución de esporas con una concentración de  $1 \times 10^7$  esporas /mL. Posteriormente se incubaron a 25° C y el crecimiento se evaluó cada 24 h utilizando una regla graduada, este procedimiento se realizó durante 7 días (Vásquez. 2013).

#### 6.7.4 Análisis estadístico.

Para obtener el análisis estadístico en la recuperación del xilano se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías para evaluar cada variable de respuesta por separado (método y tipo de álcali empleado) y la interacción entre estas dos variables con respecto a las concentraciones de álcali utilizado y la cantidad de xilano obtenido.

Para lo cual se empleó el software Minitab Statistical versión 17; una vez encontrada la diferencia con un  $\alpha=0.05$ , se realizó una prueba de medias siguiendo la metodología de Tukey.

Por otra parte, se utilizó el mismo software y análisis de prueba para evaluar el crecimiento radial de los hongos filamentosos; en este caso las variables de respuesta fueron la fuente de carbono empleado (agar- xilano, agar-amaranto), la concentración (5 y 10%), se analizaron por separado y la interacción con respecto al crecimiento radial de cada hongo empleado (*Aspergillus oryzae* y *Aspergillus flavus*).

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Análisis químico-proximal al residuo lignocelulósico del amaranto

La caracterización fisicoquímica de cualquier residuo lignocelulósico es un requisito crucial para su selección y validación como materia prima para la extracción de un producto o formar parte de un proceso para el desarrollo de productos u obtención de metabolitos (Morris y col. 1998).

Tabla 12 A. Análisis químico proximal del amaranto

Componente	Contenido %
Humedad	$13.81 \pm 0.39$
Cenizas	$7.57 \pm 0.20$
Extracto Etéreo	$0.56 \pm 0.06$
Proteína Cruda	$14.11 \pm 0.05$
Fibra bruta	$25.88 \pm 0.97$
ELN	$63.94 \pm 0.55$
<b>*ELN= Extracto libre de nitrógeno</b>	

Tabla 12 B. Contenido de fibra dietética total

Componente	Contenido%
Fibra dietética total	$60.4 \pm 1.13$

Números  $\pm$  corresponden a la desviación estándar de tres replicas por experimento.

En la **Tabla 12** se muestran los valores obtenidos del análisis químico proximal y se observa que el principal componente presente en el residuo lignocelulósico del amaranto es el extracto libre de nitrógeno (carbohidratos) con un valor de 63.94%, una cantidad por encima de lo reportado en la literatura antes mencionada (Tabla 7, apartado 2.8.3); el alto contenido de carbohidratos en el residuo de amaranto es importante como fuente de carbono para el crecimiento microbiano, también es importante en este trabajo para la extracción de polímeros, en este caso la hemicelulosa (Yang y col. 2001).

Así mismo se calculó la cantidad de fibra dietética total (Tabla 12 B) en el la harina del amaranto con un valor de 60.4%, esto hace al residuo de amaranto una materia prima sumamente relevante y atractiva para su aplicación directa como ingrediente para algún producto alimenticio que requiera de los beneficios que tiene la fibra, entre los que destacan la reducción la formación hemorroides y divertículos, además evita el estreñimiento y favorece la disminución del colesterol (Soriano y col. 2004).

Los valores de proteína cruda, ceniza y extracto etéreo obtenidos están por debajo de lo reportado por Gómez y col. (2011) (Tabla 7, apartado 2.8.3), contrariamente las cantidades de humedad y fibra bruta son mayores a lo que reportan estos autores.

Estas variaciones en la composición del residuo lignocelulósicos del amaranto pueden ser debidas al estado fisiológico de la materia prima y diversos factores ambientales como variaciones en las condiciones climáticas, y/o los nutrientes del suelo (Morris y col. 1998).

## 7.2 Composición química del residuo lignocelulósico del amaranto

En la **Tabla 13** se muestra la cantidad presente de cada polímero que conforman al residuo lignocelulósico del amaranto, en la que se observa que el contenido de holocelulosa fue de 70.79% de los cuales la hemicelulosa representa un 37.45%, mientras que las celulosa y lignina un 33.34% y 27.73%, respectivamente. La cantidad de hemicelulosa en el residuo lignocelulósico del amaranto es importante ya que está directamente relacionado con el porcentaje de extracción del xilano; esto quiere decir que entre mayor cantidad de hemicelulosa presente en el residuo de amaranto mayor podrá ser el porcentaje de extracción del xilano. Por otro lado, las afirmaciones anteriores indican que la cantidad posible a recuperar de xilano en el residuo de amaranto no superara el valor obtenido por la hemicelulosa que es de 37.45%.

Por otra parte, no se han encontrado reportes previos analizando el residuo de amaranto que permita comparar los valores obtenidos de la hemicelulosa, celulosa y lignina, pero los datos de otros tipos de residuos ya reportados presentan cantidades similares a lo obtenido en este trabajo (Tabla 2, apartado 2.2).

En la **Tabla 13** también se observa que el residuo del amaranto presenta una cantidad comparable en celulosa y lignina con otros residuos (Tabla 2, apartado 2.2); estos residuos han sido utilizados para la producción de enzimas y metabolitos de interés biotecnológico debido a que estos componentes funcionan como inductores de la actividad enzimática de diferentes microorganismos (Rodríguez y Piñeros. 2007), así mismo se han utilizado para la extracción individual de cada polímero (hemicelulosa, celulosa y lignina) debido a las diferentes aplicaciones que presentan cada uno en los diferentes sectores de la industria (López y col. 2010), esto es de suma importancia ya que sitúa al residuo de amaranto como

sustrato adecuado para ser evaluado para la extracción de polímeros y como fuente de carbono para el crecimiento de hongos filamentosos.

**Tabla 13. Composición química del amaranto**

Componente	Contenido %
Hemicelulosa	37.45 ± 0.59
Lignina	27.73 ± 0.11
Celulosa	33.34 ± 0.65
Holocelulosa	70.79 ± 0.66

Promedio ± desviación estándar n=

### 7.3 Extracción de xilano

Se adoptaron dos métodos (físicoquímico y químico) y dos álcalis (NaOH y KOH) a diferentes concentraciones (10%, 12% 14%) para evaluar la extracción de xilano en este trabajo.

En la **Tabla 14** se muestran los porcentajes de recuperación del xilano del residuo del amaranto obtenidos después de los tratamientos aplicados, cabe destacar que estos porcentajes permiten estimar el rendimiento real del xilano ya que estos valores están directamente relacionados con la base seca del residuo lignocelulósico. Por otro lado, estos datos se utilizaron para estimar el porcentaje del xilano recuperado con respecto a la cantidad de hemicelulosa presente en el residuo de amaranto (Tabla 13).

**Tabla 14. Extracción de xilano utilizando métodos físicoquímicos y químicos en base al amaranto**

% de álcali utilizado	NaOH Físicoquímico (Vapor)	KOH Físicoquímico (Vapor)	NaOH Químico (Incubación)	KOH Químico (Incubación)
10%	21.3% ± 0.52 <sup>BCDE</sup>	18.6% ± 0.77 <sup>EFG</sup>	16.6% ± 1.3 <sup>GH</sup>	15.2% ± 0.40 <sup>H</sup>
12%	22.6% ± 1.7 <sup>BC</sup>	20% ± 0.11 <sup>BCD</sup>	18.9% ± 1.07 <sup>DEFG</sup>	17.3% ± 0.13 <sup>FGH</sup>
14%	28.1% ± 1.9 <sup>A</sup>	23.4% ± 0.44 <sup>B</sup>	22.3% ± 2.02 <sup>BC</sup>	20% ± 0.36 <sup>CDEF</sup>

Se reporta el porcentaje de extracción del xilano en relación con el peso seco del residuo del amaranto ± la desviación estándar con tres replicas por experimento. Valores seguidos por la misma letra no presentan diferencias significativas (P < 0,05)

Analizando los datos de la **Tabla 14** se observa que la concentración del álcali, el tipo de álcali y el método empleado están directamente relacionados con la recuperación del xilano; ya que los datos demuestran que al emplear el método fisicoquímico se obtiene mejores rendimientos en comparación al método químico, de manera similar sucede con los álcalis empleados dando mejores rendimientos el NaOH que el KOH; esto debido que el NaOH tiene mejor capacidad para romper los puentes de hidrógeno e hidrolizar los enlaces éster dando como resultado la hinchazón del residuo, lo que provoca una mejor liberación del xilano (Samanta y col. 2012). Por otra parte, los datos también manifestaron que a medida que aumento la concentración del álcali, aumento la recuperación del xilano, independientemente del tipo de álcali empleado o el método utilizado.

En conclusión, el método fisicoquímico en combinación con NaOH al 14% fue el mejor tratamiento en la recuperación de xilano con un valor de 28.1%, contrariamente el método químico con KOH al 10% permitió una recuperación de 15.2%.

**Tabla 15. Porcentaje de recuperación de xilano en base a la cantidad de hemicelulosa**

% de álcali utilizado	NaOH	KOH	NaOH	KOH
	Fisicoquímico (Vapor)	Fisicoquímico (Vapor)	Químico (Incubación)	Químico (Incubación)
10%	56.88± 0.52	49.67% ± 0.77	44.33% ± 1.3	40.59% ± 0.40
12%	60.35% ± 1.7	53.40% ± 0.11	50.47 ± 1.07	46.19% ± 0.13
14%	75.03% ± 1.9	62.48% ± 0.44	59.55% ± 2.02	53.40% ± 0.36

Se reporta el porcentaje de extracción del xilano en relación con la cantidad de hemicelulosa presente en el residuo del amaranto ± la desviación estándar de tres replicas por experimento.

Como se ha mencionado anteriormente la cantidad de xilano recuperado depende de la cantidad de hemicelulosa presente en la materia prima de extracción, por eso en la **Tabla 15** se muestran los porcentajes de xilano recuperado de acuerdo a la cantidad presente de hemicelulosa (37.45%± 0.5), donde los datos muestran que se logró una recuperación del 75.03% aplicando hidróxido de sodio al 14% en combinación con la aplicación de vapor, estos datos están por debajo de lo reportado por Samanta y col. (2012), quienes obtuvieron

una cantidad de hemicelulosa de 38.78 % en el residuo de mazorca de maíz y lograron una recuperación de xilano del 83.5%.

Como se puede apreciar en la **Tabla 15** no se ha podido extraer toda la cantidad de xilano posible, esto por el contenido de lignina presente en el residuo de amaranto, ya que esta dificulta la extracción debido a los enlaces éter, éster y enlaces glucosídicos que forma con la hemicelulosa (Nacos y col. 2006, Panthapulakkal. 2014).

## 7.4 Caracterización fisicoquímica del xilano.

### 7.4.1 Identificación de los grupos funcionales del xilano mediante FTIR

El análisis por técnica infrarrojo FTIR permitió identificar los grupos funcionales característicos del xilano extraído del forraje amaranto.

Los espectros FTIR del xilano obtenidos con NaOH y KOH por métodos fisicoquímicos y químicos se presentan en la **Figura 12**. En cada uno de los espectros se puede observar la señal de vibración del estiramiento del grupo hidroxilo en el intervalo de 3350 a 3300  $\text{cm}^{-1}$ , esta banda se produce como resultado a interacción física entre polímeros, su intensidad está influenciada por la concentración de los mismos de acuerdo a la muestra reportado por Oliveira y col. 2010. La señal en 2900  $\text{cm}^{-1}$  corresponde a las vibraciones de estiramiento por enlaces C-H debido a grupos  $\text{CH}_2$  y  $\text{CH}_3$ ; confirmándose estos grupos por las vibraciones de flexión en las señales 1380  $\text{cm}^{-1}$  y 918  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente, estas señales son características de la hemicelulosa (Peng y col. 2009). Respectivamente, las bandas de absorción en 1640 a 1600  $\text{cm}^{-1}$  están relacionada con el estiramiento de H-O-H, que se produce principalmente en el estado amorfo y se ha atribuido a la hidratación de los polisacáridos de tipo xilano (Sun y col. 1998). También los extractos obtenidos con los diferentes álcalis presentaron una banda de absorción prominente a 1044  $\text{cm}^{-1}$  asociada a la hemicelulosa y se atribuye a la flexión del grupo C-OH. Finalmente, se detectó una banda aguda a 897  $\text{cm}^{-1}$ , que es típica de los enlaces  $\beta$ -glucosídicos entre las unidades de azúcar de las hemicelulosas, en la región anomérica (Sun y col. 2005).

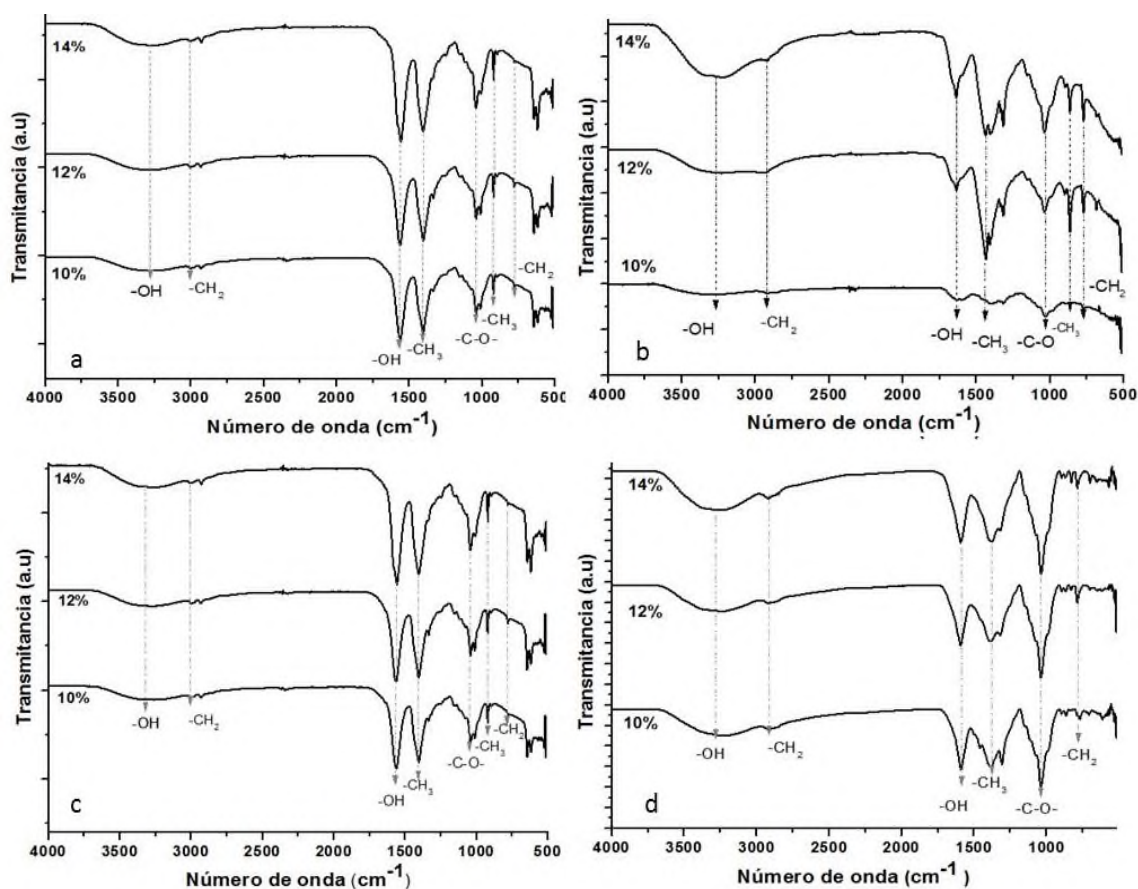


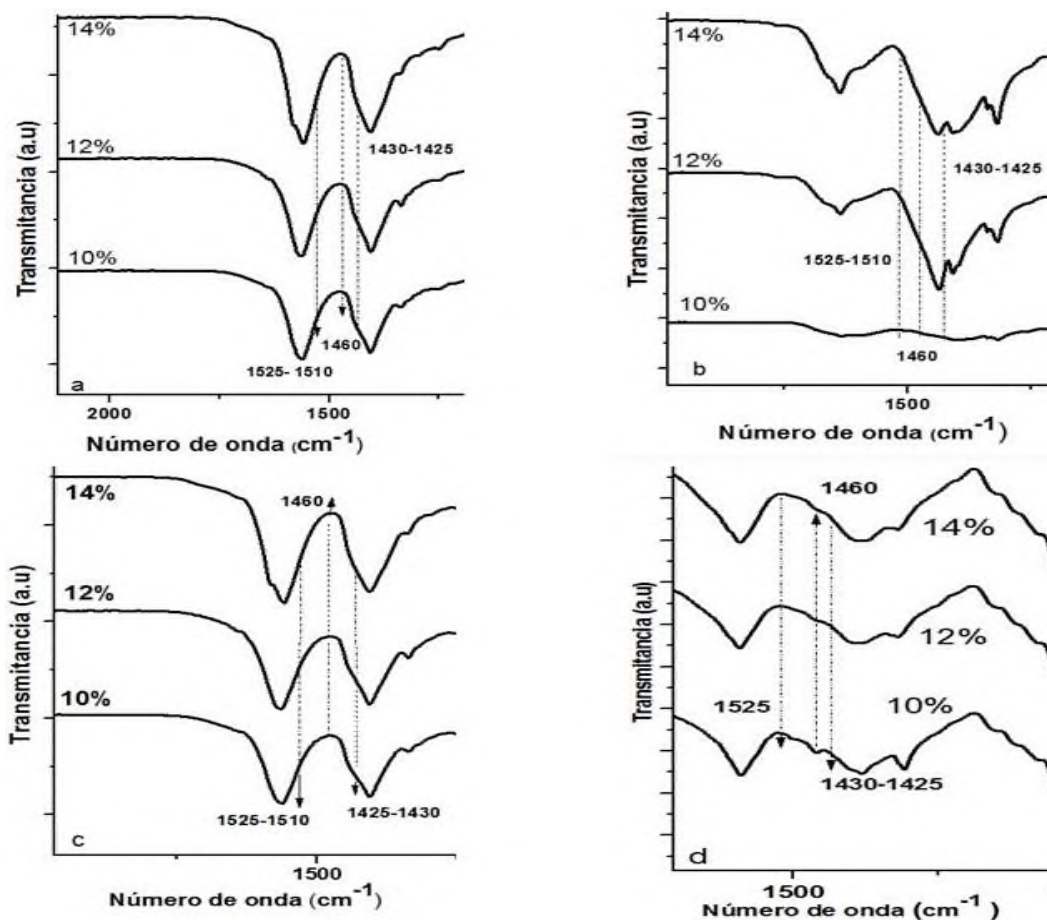
Figura 12. Espectros FTIR del xilano extraído del residuo lignocelulósico del *Amaranthus hypochondriacus*. a) HS10, HS12I, HS14I b) HS10A, HS12A, HS14A c) HK10I, HK12I, HK14I d) HK10A, HK12A, HK14A.

Los tratamientos utilizados en esta investigación se enfocaron en la obtención de hemicelulosa, en este caso de tipo xilano, y hacen suponer la remoción de lignina sin extraer celulosa. Para confirmar lo anterior, se llevó a cabo el análisis de los espectros de FTIR para detectar la presencia de las señales características de estos polímeros.

Por ello en la **Figura 13** se muestran las regiones de las bandas características de los polímeros lignina y celulosa en los espectros FTIR a gran escala.

Las señales de la lignina recaen en  $1525-1510\text{ cm}^{-1}$ ,  $1460\text{ cm}^{-1}$  y  $1430-1425\text{ cm}^{-1}$  (Palomar y col. 2015); sin embargo, utilizando el método químico analizando no se encontraron señales homologas de la lignina (Figura 13a, y 13c); contrariamente, empleando el método fisicoquímico se encontró una señal compatible con dicho polímero, empleando KOH

(Figura. 14d, línea puntuada hacia arriba) se observa la señal en  $1460\text{ cm}^{-1}$ ; sin embargo, conforme aumenta la concentración del álcali esta banda va perdiendo su intensidad. Por otro lado, empleando NaOH la señal del polímero correspondiente se localiza en  $1430\text{ cm}^{-1}$  y disminuye su intensidad en función al incremento a la concentración del NaOH (Figura 13 b).



**Figura 13. Región de los espectros FTIR extraídos para identificar señales de lignina. a) HS10I, HS12I, HS14I b) HS10A, HS12A, HS14A c) HK10I, HK12I, HK14I d) HK10A, HK12A, HK14A.**

En cuanto a la celulosa, las señales características del espectro FTIR están ubicadas en  $1645\text{ cm}^{-1}$ ,  $1111\text{ cm}^{-1}$  y  $895\text{ cm}^{-1}$  (Cruz y col. 2011). En los espectros obtenidos utilizando el método fisicoquímico (Figura 14b, 14d) no se encontraron señales compatibles con dicho polímero; contrariamente en el método químico se presentaron dos señales típicas de la celulosa ubicadas en  $1111\text{ cm}^{-1}$  y  $895\text{ cm}^{-1}$ , independientemente de la concentración y tipo de álcali (Figura 14a y 14c).

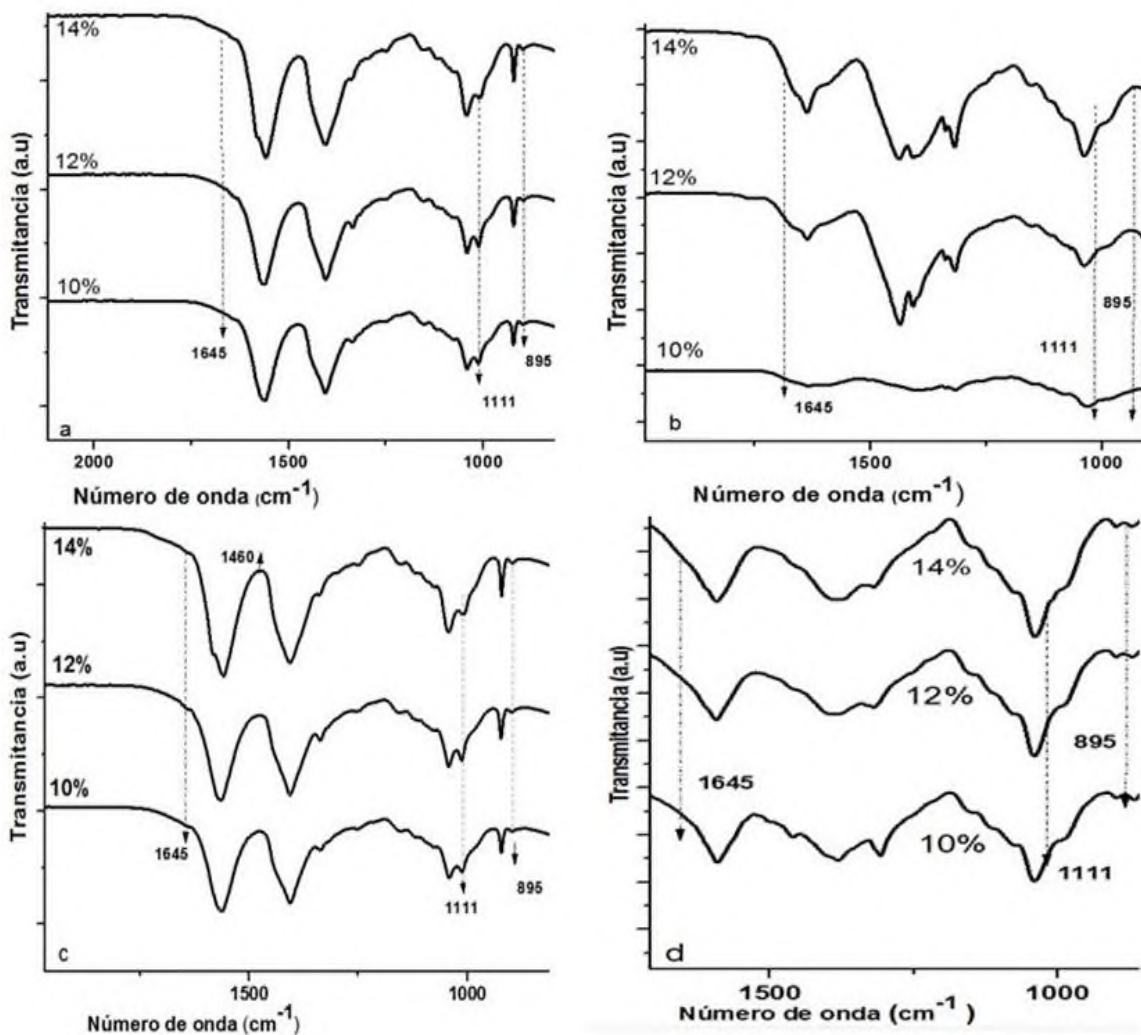


Figura 14. Región de los espectros FTIR extraídos para identificar señales de celulosa. a) HS10I, HS12I, HS14I b) HS10A, HS12A, HS14A c) HK10I, HK12I, HK14I d) HK10A, HK12A, HK14A.

#### 7.4.2 Difracción de rayos X (DRX)

Los patrones de difracción de rayos X del xilano extraído con los diferentes tratamientos (HS10, HS12, HS14, HK10, HK12, HK14, HS10I, HS12I, HS14I, HK10I, HK12I, HK14I) presentaron una estructura amorfa (Figura 15). Estos fueron comparados con lo reportado en la literatura; en la **Figura 15** se muestra el difractograma correspondiente al xilano analizado por Wu Shuping y col. (2011) extraído de mazorca de maíz.

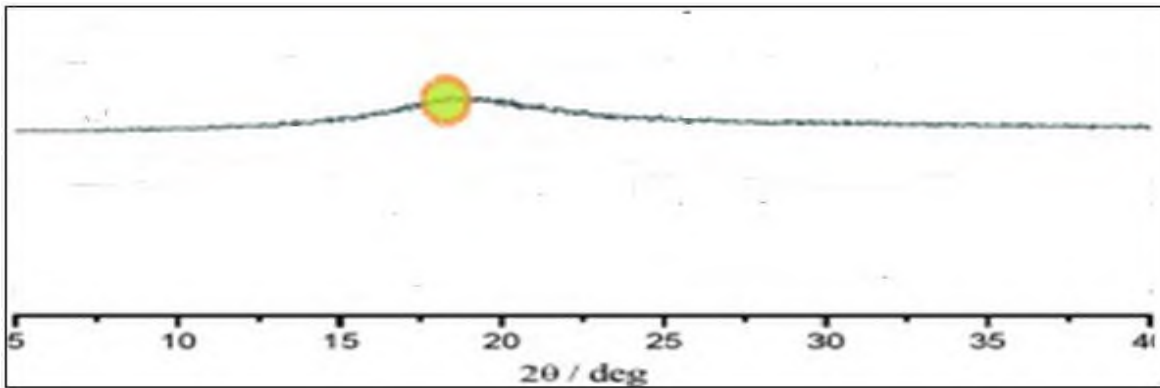
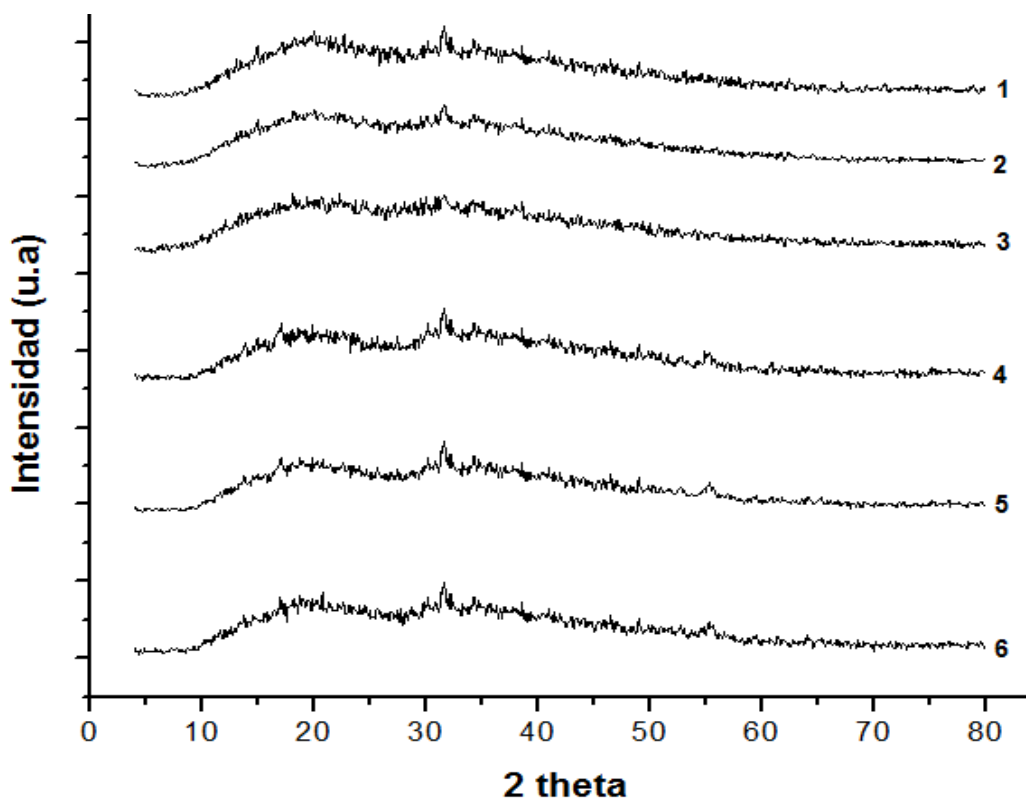


Figura 15. Diffractograma del xilano obtenido de residuos de maíz (tomado de Wu Shuping y col. 2011).

En la **Figura 16** se observan los diferentes difractogramas del xilano, extraído utilizando el método fisicoquímico y los dos tipos de álcali (NaOH, KOH), en donde se puede apreciar que se presenta el plano y la meseta situada en  $2\theta = 18^\circ$ , características primordiales del xilano (Figura 15); también se aprecia un pequeño pico situado en  $2\theta = 33^\circ$  correspondiente a la lignina (Sabatier y col. 1991); esto concuerda con el análisis por espectroscopia FTIR en donde se observó una banda característica de la lignina. Este pico se manifestó con mayor intensidad en los extractos obtenidos con NaOH (HS10, HS12, HS14) (Figura 16: 4,5,6) y se mantuvo constante sin importar la concentración del álcali empleado; mientras que en los extractos con KOH (HK10, HK12, HK14) (Figura 16: 1, 2, 3) la intensidad de los picos disminuyó conforme aumentó la concentración del álcali; esto quiere decir que al emplear el KOH presenta una mejor remoción de la lignina presente en el residuo lignocelulósico del amaranto.



**Figura 16.** Difractograma del xilano extraído del residuo lignocelulósico del *Amaranthus hypochondriacus* aplicando el método fisicoquímico. 1) HK10A 2) HK12A 3) HK14 4) HS10A 5) HS10A 6) HS14A

En la **Figura 17** se observan los diferentes difractogramas del xilano, extraído utilizando el método químico y los dos álcalis (NaOH, KOH), en donde se puede apreciar que se presenta el plano y la meseta situado en  $2\theta = 18^\circ$ , características primordiales del xilano (Figura 15), también se aprecia un picos situados en  $2\theta = 34^\circ, 35^\circ, 38^\circ$ , correspondientes a la celulosa (Fernández y col .2013) y su intensidad se mantiene constante sin importar la concentración del álcali empleado. Esto concuerda con el análisis por espectroscopia FTIR en donde se observaron señales características de este polímero.

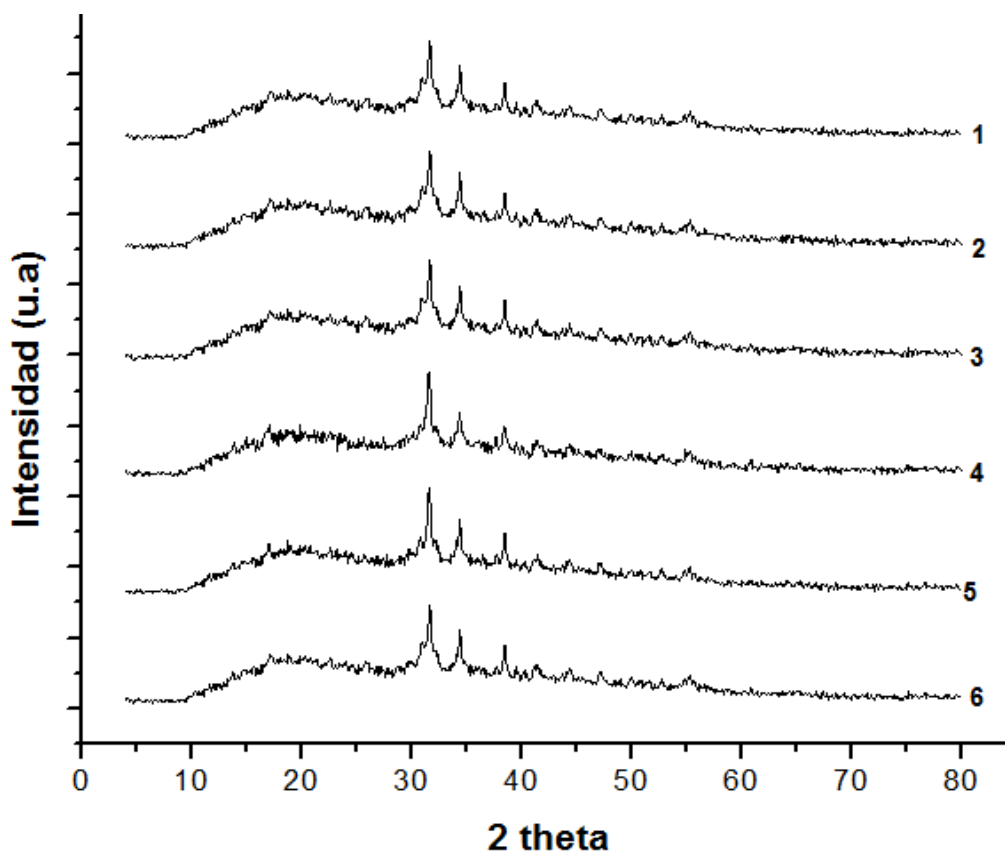


Figura 17. Difractograma del xilano extraído del residuo lignocelulósico del *Amaranthus hypochondriacus* aplicando el método químico 1) HK10I 2) HK12I 3) HK14I 4) HS10I 5) HS12I 6) HS14I

En referencia a las evidencias mostradas en los espectros FTIR y los difractogramas de rayos X, se encontraron la presencia de lignina en la extracción de xilano utilizando el método fisicoquímico, esto debido al alto contenido de este polímero presente en la materia prima de extracción (27.73%). La presencia de este polímero reduce drásticamente el rendimiento de xilano debido a los enlaces que la unen a los demás polisacáridos, principalmente con la hemicelulosa, ocasionando una obstrucción en el desprendimiento de cadenas de xilano de la matriz de la pared celular de acuerdo a lo reportado por Nacos y col. 2006. Otro factor son las condiciones del método empleado, al incrementar la concentración del álcali y la temperatura se provoca un hinchamiento en la materia prima exponiendo en mayor concentración a la hemicelulosa y la lignina siendo este último solubilizado (Singh y col. 2018). En consecuencia, una de las alternativas que sugiere este trabajo para incrementar la remoción de este polímero es aumentar el tiempo de extracción de tal manera que haya una

mayor interacción del álcali y la materia prima; también incrementar la cantidad de lavados con etanol frío, ya que este no precipita a la lignina, pero mejora la precipitación del xilano (Sun y col. 2005).

Por otra parte, los resultados también mostraron que en los extractos obtenidos con el método químico no se observó la presencia de lignina esto se debe a que este método no es capaz de exponer a la hemicelulosa que tiene mayor interacción con los enlaces de la lignina (Samanta y col. 2012), es decir solo se extrae a la hemicelulosa libre; sin embargo, se observó la presencia de celulosa.

## **7.5 Evaluación de la velocidad del crecimiento radial (VCR) de los hongos filamentosos**

El crecimiento radial que esta descrita por la ecuación enunciada por Trinci y Pirt. (1975), en la que se establece que el radio de la colonia está en función del tiempo y la pendiente se define como la velocidad de crecimiento radial expresado en cm/h.

En las gráficas de las Figuras 18, 19, 20 y 21 se puede observar que los microorganismos utilizados tuvieron la capacidad de crecer en los dos sustratos empleados (xilano, y harina de amaranto), así mismo se aprecia la afinidad que presentó cada microorganismo del género *Aspergillus* por cada uno de estos. La cepa *Aspergillus oryzae* creció mejor en agar-harina del residuo de amaranto, al 10% de concentración tuvo un crecimiento del micelio de 6.9 cm a las 168 h, mientras que al 5% de concentración del sustrato presentó un crecimiento de micelio de 6.4 cm; estos valores son similares por lo reportado por Méndez y col. (2018) quienes reportaron un valor de 6.7 cm. Contrariamente, *Aspergillus flavus* presentó un crecimiento del micelio de 4.9 cm a las 168 h en el mismo sustrato a una concentración del 10% y al 5% de concentración presentó un crecimiento micelial de 4.4 cm a las 168 h; estos datos están por encima por lo reportado por Méndez y col. (2018) quienes reportaron un valor de 3.7 cm. Sin embargo, cabe resaltar que la concentración utilizada de la fuente de carbono por estos investigadores fue del 2%, esto hace suponer que la concentración del sustrato está directamente relacionada con el crecimiento micelial (Ocampo y col. 2005). Por otro lado, analizando el crecimiento micelial de los hongos filamentosos empleados utilizando agar-

xilano como fuente de carbono se observó que *Aspergillus flavus* presentó un crecimiento del micelial a las 168 h de 6.8 cm y 5.3 cm a concentraciones al 10% y 5% respectivamente. mientras que la cepa *Aspergillus oryzae* obtuvo valores menores en este sustrato presentando un crecimiento micelial a las 168 h de 5.4 cm y 3.6 cm a concentraciones de 10% y 5%, respectivamente. No hay evidencias reportadas que permitan comparar los valores obtenidos con este sustrato, sin embargo, los datos mostrados presentan una cierta similitud con trabajos anteriores utilizando microorganismos del género *Aspergillus flavus* con medios convencionales.

Por ejemplo, López y col. (2016) y Méndez y col. (2018) analizaron el crecimiento radial de una cepa de *Aspergillus flavus* en medio de cultivo PDA y obtuvieron un crecimiento micelial a las 168 h de 5.3 cm y 5.5 respectivamente, estos datos son similares a lo obtenido en esta investigación empleando xilano al 5%, mientras que al subir la concentración al 10%, el crecimiento micelial aumento a un valor de 6.8 cm; esto hace al xilano una fuente de carbono adecuado para el crecimiento de este hongo filamentoso; ya que el medio PDA contiene monosacáridos de fácil asimilación.

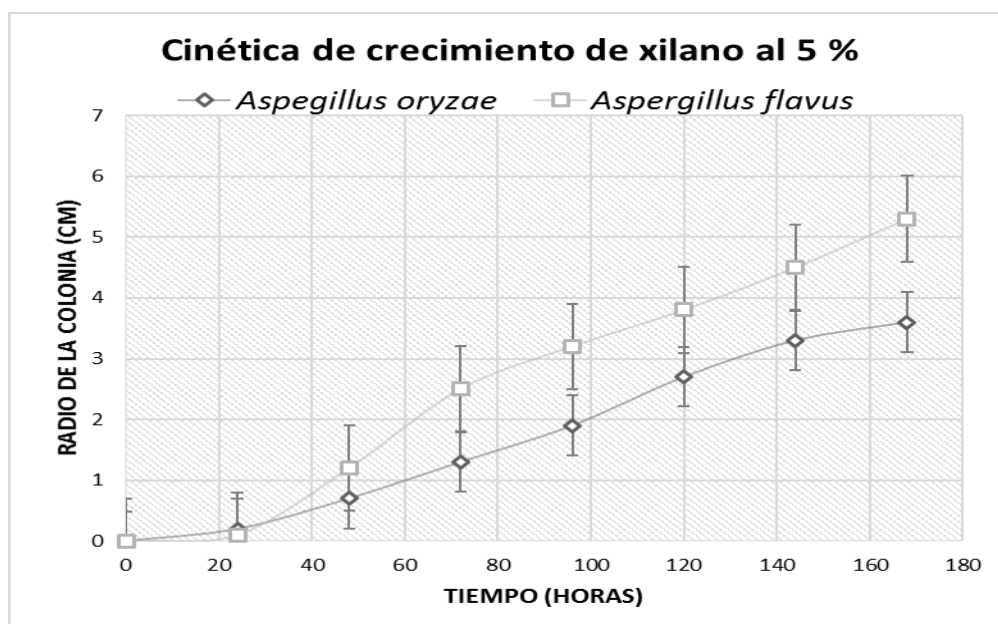


Figura 18. Cinética de crecimiento radial en xilano al 5 %

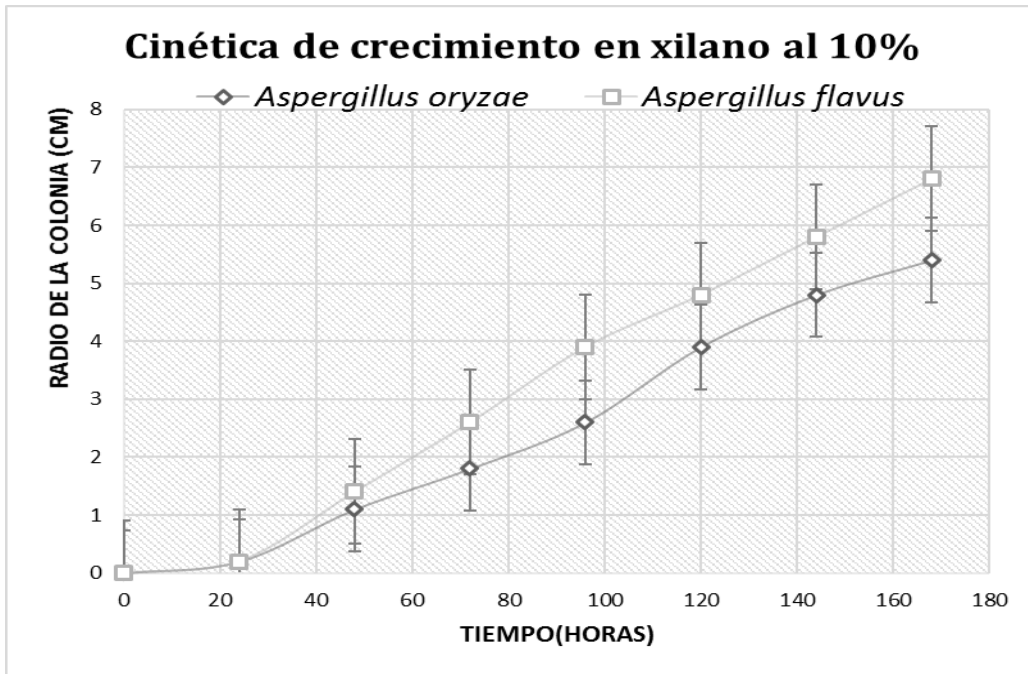


Figura 19. Cinética de crecimiento radial en xilano al 10%

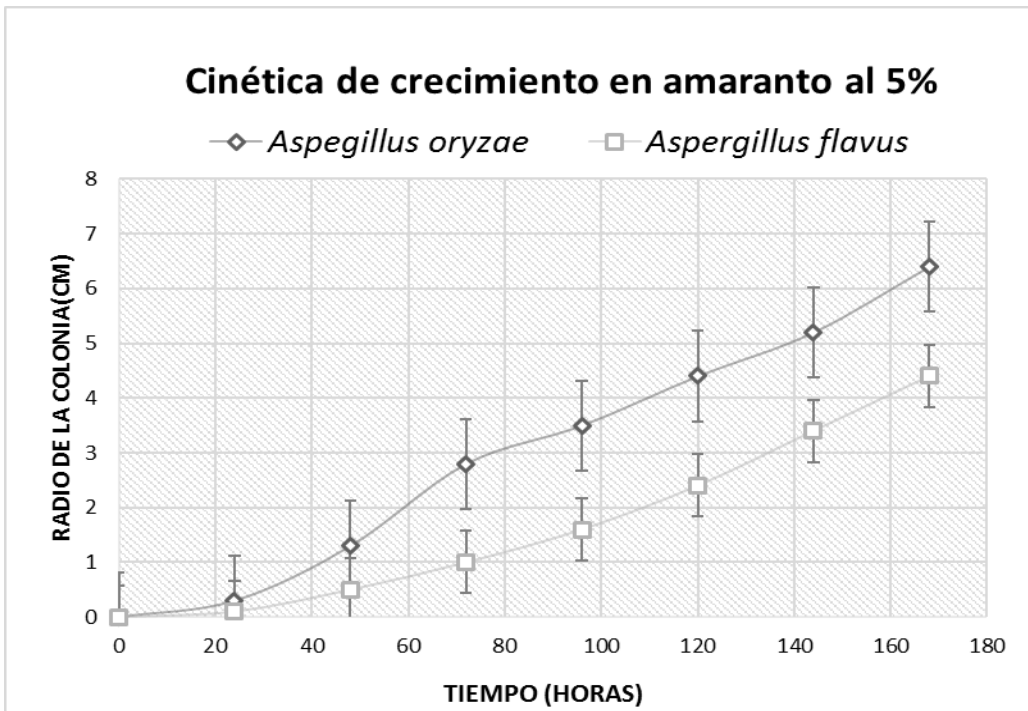


Figura 20. Cinética de crecimiento radial en amaranto al 5%

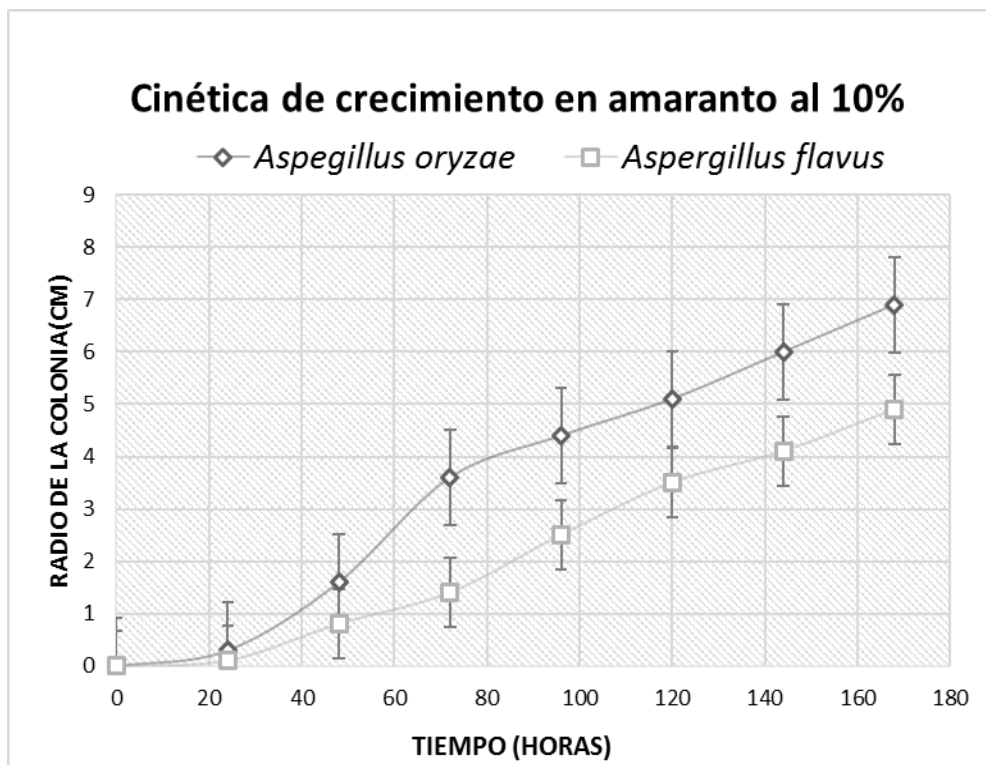


Figura 21. Cinética de crecimiento radial en amaranto al 10%

Las 2 cepas de hongos filamentosos crecieron en ambos medios de cultivo, agar- harina del residuo de amaranto y agar-xilano. Sin embargo, la cepa de *A. flavus* mostró la mayor velocidad de crecimiento radial de 0.048 cm/h utilizando xilano al 10% como fuente de carbono y *Aspergillus oryzae* una velocidad de 0.046 cm/h presentó utilizando la harina del residuo lignocelulósico del amaranto 10% (Figura 22) esta cantidad es comparable a lo que presenta Sánchez y col. (1999) donde utiliza una cepa de *Aspergillus oryzae* y evalúa la VCR utilizando pulpa de café como sustrato, obteniendo un valor de 0.04 cm/h. También se pudo observar en la **Figura 22** que conforme aumentó la concentración de los sustratos, incremento la velocidad de crecimiento radial de los hongos filamentosos.

Con base en que el crecimiento radial y la velocidad de crecimiento son métodos propuestos para evaluar la capacidad de los hongos para invadir y adaptarse a los nutrientes sobre un sustrato (Sánchez y col. 1999) entonces se puede decir que la cepa de *A. flavus* fue la que se

adaptó mejor al medio de cultivo agar- xilano por lo tanto esta cepa tiene la capacidad metabólica y por ende las enzimas (xilanasas, xilosidasas, glucoronidasas, acetilxilano esterasa, feruloil esterasa) (Montoya y col. 2012) para hidrolizar el xilano y producir xilooligosacáridos. En contraste, la cepa de *Aspergillus oryzae* se adaptó mejor en el medio agar- harina del residuo de amaranto debido a la producción y el tipo de enzimas que presenta (celulasas, hemicelulasas) (Terebiznik. 1998).

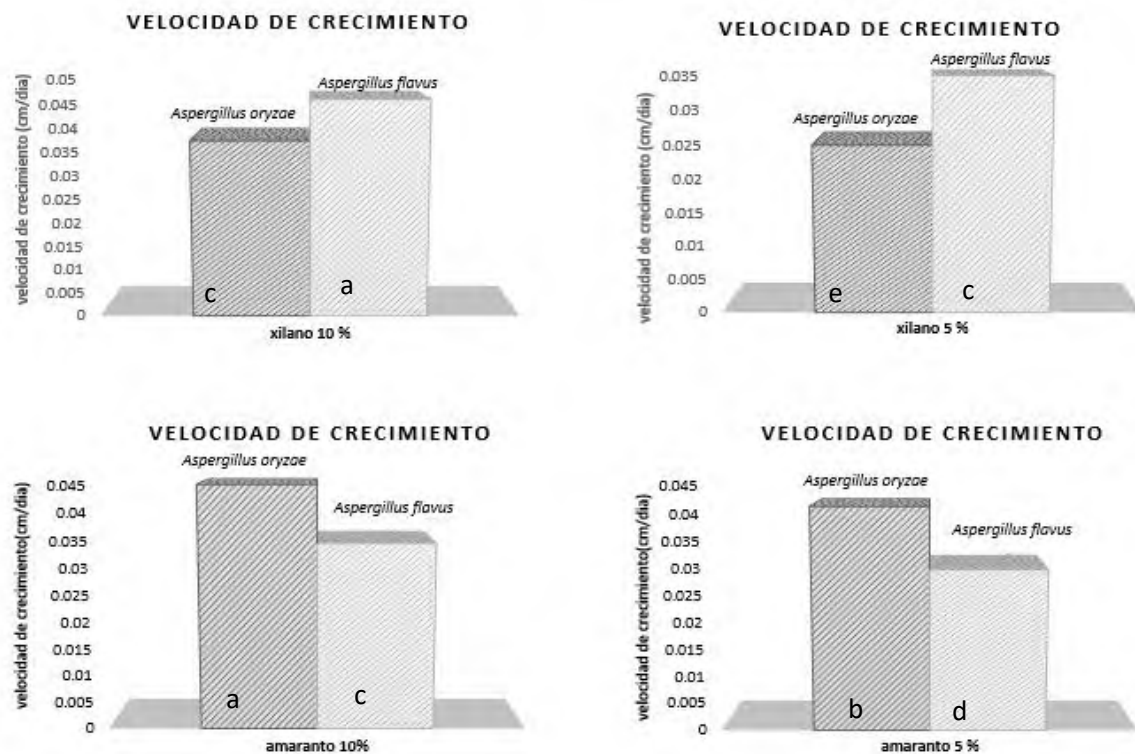


Figura 22 . Velocidad de crecimiento en las diferentes fuentes de carbono.

### Imágenes del crecimiento radial

Durante 7 días se realizó una cinética de crecimiento de los 2 hongos evaluados, en los dos diferentes medios de cultivo y en sus respectivas concentraciones demostrando la capacidad de estos hongos de tener una afinidad diferente para cada fuente de carbono (Figura 23 y 24).

En la **Figura 23** se observa que no hubo una diferencia en el micelio de la cepa de *Aspergillus flavus* en los medios con diferentes niveles de concentración de sustrato. Mientras que en la cepa de *Aspergillus oryzae* se observó un micelio más algodonoso (Figura 24).

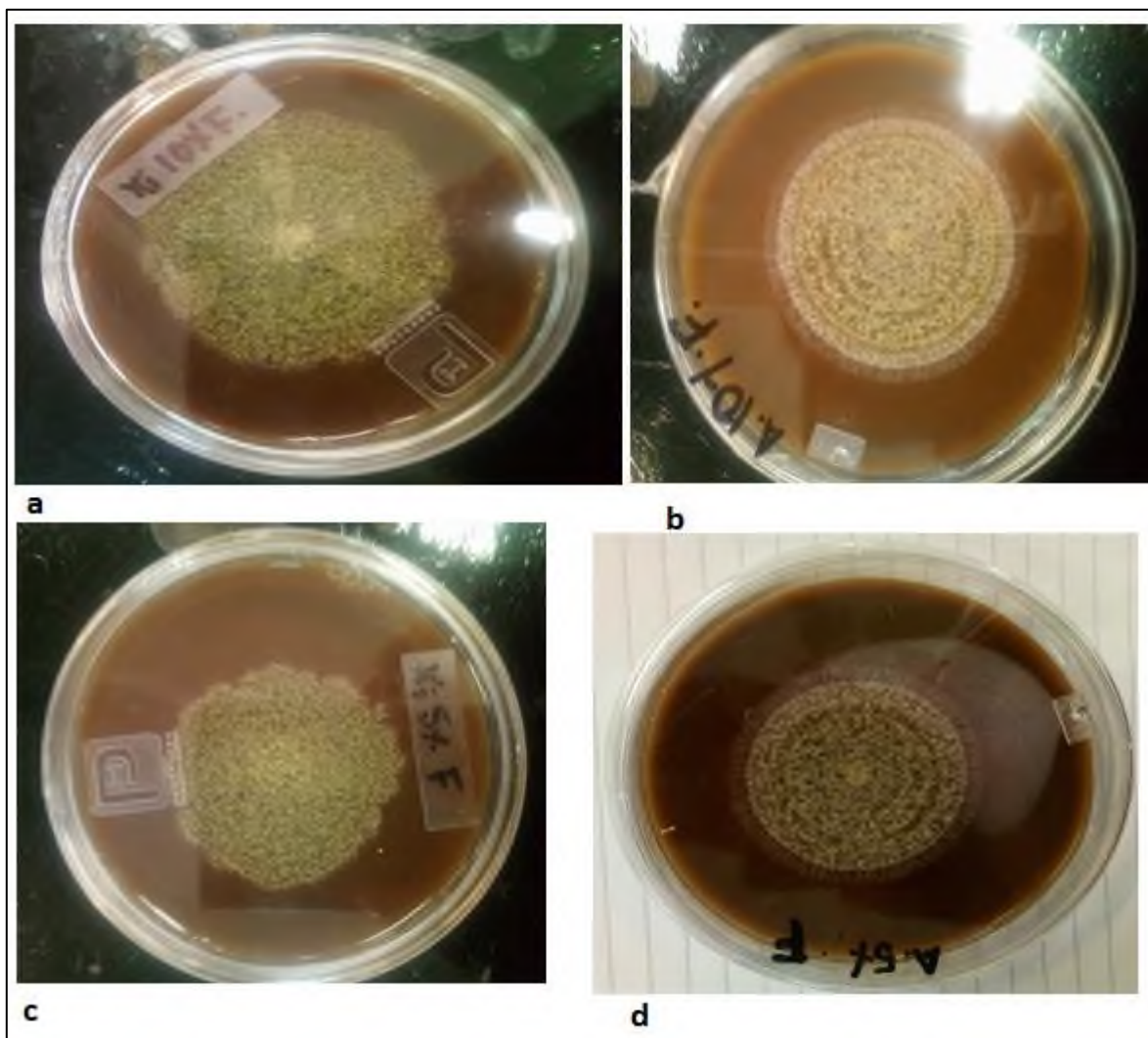


Figura 23. Crecimiento micelial de *Aspergillus flavus* a) agar-xilano al 10%. b) agar-harina del residuo de amaranto 10%. c) agar-xilano al 5%. d) agar-harina del residuo de amaranto 5%.

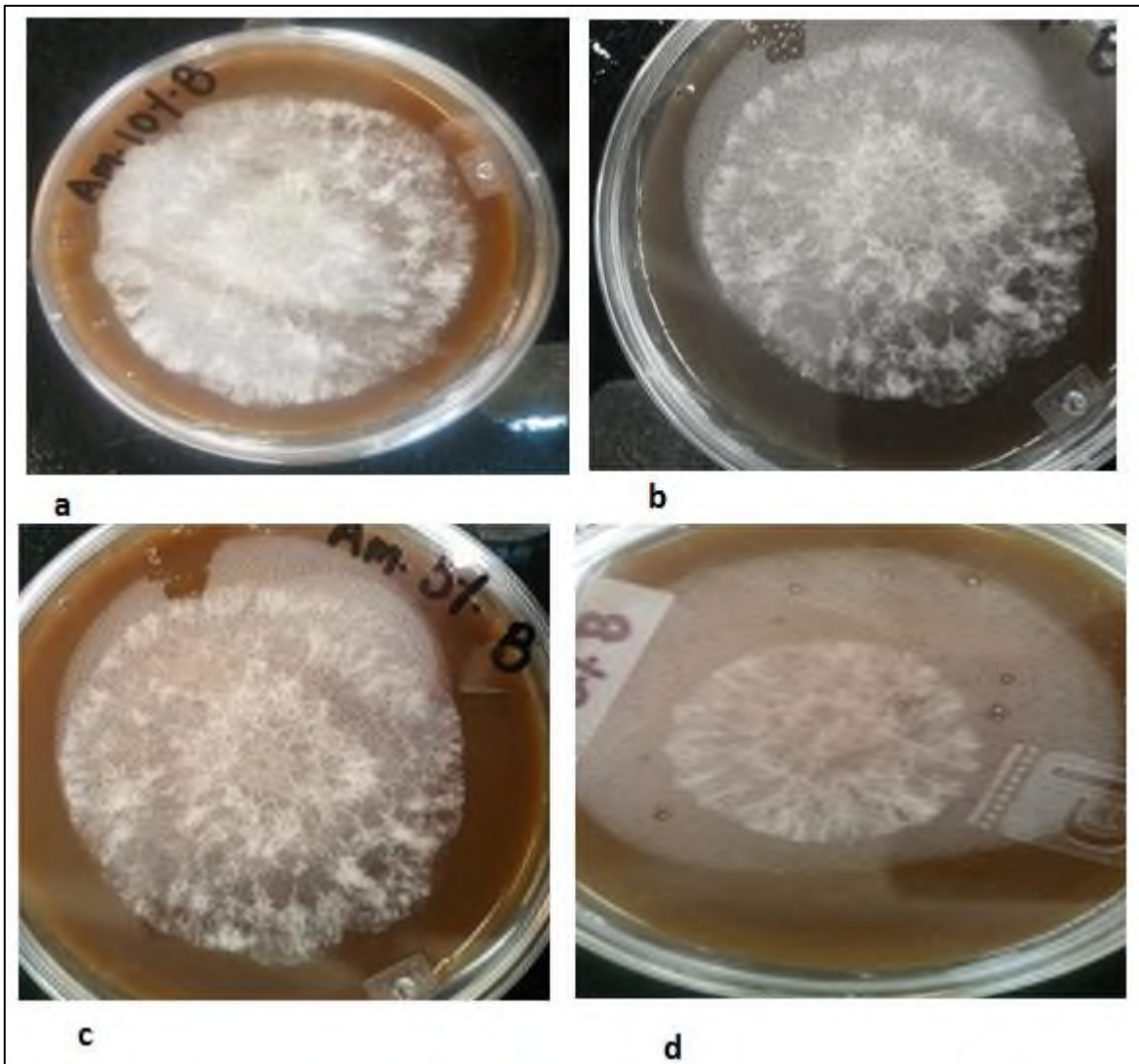


Figura 24. Crecimiento micelial de *Aspergillus oryzae*. a) agar-harina del residuo de amaranto 10%. b) agar-xilano al 10%. c) agar-harina del residuo de amaranto 5%. d) agar-xilano al 5%.

## 8. CONCLUSIONES

Acorde a los resultados obtenidos y los objetivos propuestos en el presente trabajo se formulan las siguientes conclusiones:

De acuerdo con la caracterización químico proximal, el residuo lignocelulósico del *Amaranthus hypochondriacus* representa una alternativa factible para la extracción de xilano, así mismo tiene el potencial para ser utilizado para la extracción de fibra y proteínas.

El uso de soluciones álcalis utilizando vapor permite una extracción adecuada de xilano obtenido del residuo lignocelulósico del *Amaranthus hypochondriacus*.

El uso de técnicas analíticas como FTIR y DRX permitió verificar la presencia del xilano extraído del residuo lignocelulósico del *Amaranthus hypochondriacus* utilizando los diferentes métodos y álcalis con sus diferentes concentraciones.

Los álcalis utilizados influyeron en la pureza y el rendimiento de la extracción del xilano, obteniendo mayor pureza con KOH, mientras que mayor rendimiento con NaOH.

La medición del crecimiento radial permitió evaluar la capacidad de los hongos filamentosos (*Aspergillus oryzae*, *Aspergillus flavus*) de hidrolizar la fuente de carbono utilizado; por lo tanto; el xilano puede emplearse como fuente de carbono en fermentaciones para la producción de xilooligosacáridos.

La harina del forraje de *Amaranthus hypochondriacus* se puede emplear como sustrato para la evaluación del crecimiento de hongos filamentosos (*Aspergillus oryzae*, *Aspergillus flavus*) ya que estos son capaces de hidrolizarlos por su capacidad metabólica (producción de enzimas) que poseen.

## **9. PERSPECTIVAS**

Mejorar el rendimiento de extracción de xilano del residuo lignocelulósico del amaranto.

Explorar métodos que permitan la obtención de los Xilooligosacáridos, utilizando xilano o el residuo lignocelulósico del amaranto como sustrato.

Diseñar e implementar un sistema que permita la producción de enzimas con interés biotecnológico utilizando xilano o el residuo lignocelulósico del amaranto como sustrato.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- A.O.A.C. Association of Official Analytical Chemistry. (2000). Official methods of analysis. Editorial Gaithersburg.
- Aguilar, C. N. y Moreira, A. (2010). Perspectivas biotecnológicas de hemicelulosas vegetales. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 2(4).
- Alfaro, M. A., Martínez A., Ramírez R. y Bressani R. (1987). Rendimiento y composición química de las partes vegetativas del amaranto (*Amaranthus hypochondriacus L.*) en diferentes etapas fisiológicas. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 35 (01). 108-121.
- Amador, K. R., Carrillo Ó. R., Aguilar P. A., y Vega J. R. (2012). Obtención de xilosa a partir de desechos lignocelulósicos de la producción y proceso industrial de la piña (*Ananascomusus*). *Uniciencia*, 26(1). 75-89.
- Arce, V. M. B. (2011). Obtención de compuestos bifuncionales a partir del material lignocelulósico de *Amaranthus hypochondriacus L.* Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana, unidad Iztapalapa.
- Arce, V. M. B., Soria H. G. G., Tovar P. E. y Soriano S. J. Fibra dietética de *Amaranthus hypochondriacus L.* como fuente de antioxidantes. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Arias, C. E., y Piñeros E. P. A. (2008). Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestras de suelo de los paramentos de guasca y cruz verde. Pontificia Universidad Javeriana, facultad de ciencias , 21(34).
- Aro, N., Pakula T., y Penttilä M. (2005). Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *Microbiology Reviews*, 29(4). 719-739.
- Baysal, Z., Uyar F. y Aytekin C. (2003). Solid state fermentation for production of  $\alpha$ -amylase by a thermotolerant *Bacillus subtilis* from hot-spring water. *Process Biochemistry*, 38(12). 1665-1668.
- Bok, J. W., y Keller N. P. (2004). LaeA, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus spp.* *Eukaryotic Cell*, 3(2). 527-535.
- Brinson, K., y Dey, P. M. (1984). Polysaccharides containing xylose, arabinose, and galactose in higher plants. *Biochemistry of Storage Carbohydrates in Green Plants*, 3 (12). 349-371.

- Browning, B. L. (1967). Methods of wood chemistry Volumes I y II.
- Chahal, D. S., Moo Y. M., y Vlach D. (1983). Protein production and growth characteristics of *Chaetomium cellulolyticum* during solid state fermentation of corn stover. *Mycologia*, 75(4). 597-603.
- Chávez, S., M., y Domine, M., E. (2013). Lignina, estructura y aplicaciones: métodos de despolimerización para la obtención de derivados aromáticos de interés industrial. *Avances en ciencias e Ingeniería*, 4(4). 15-46.
- Cheng, S. y Zhu S. (2009). Lignocellulosic feedstock biorefinery-the future of the chemical and energy industry. *BioResources*, 4(2). 456-457.
- Christen, P., Auria R., Vega C., Villegas E., y Revah S. (1993). Growth of *Candida utilis* in solid state fermentation. *Biotechnology Advances*, 11(3). 549-557.
- Chua, M. G., y Wayman M. (1979). Characterization of autohydrolysis aspen (*P. tremuloides*) lignins. Part 1. Composition and molecular weight distribution of extracted autohydrolysis lignin. *Canadian Journal of Chemistry*, 57(10). 1141-1149.
- Cowling, E. B., y Kirk T. K. (1976). Properties of cellulose and lignocellulosic materials as substrates for enzymatic conversion processes. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*, 6 (1). 95-123.
- Cruz, J. M, Domínguez J. M, Domínguez H., y Parajó J. C. (2000). Preparación de medios de fermentación a partir de desechos agrícolas y su bioconversión en xilitol. *Biotecnología Alimentaria*, 14 (1). 1-2.
- da Silva, A. E., Marcelino H. R., Gomes M. C. S., Oliveira E. E., Nagashima Jr. T., y Egito E. S. T. (2012). Xylan, a promising hemicellulose for pharmaceutical use. In *Products and Applications of Biopolymers*. IntechOpen. 4 (1). 61-84.
- de Vries, R. P., y Visser J. A. A. P. (2001). *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiology*, 65(4), 497-522.
- Dey, P. M., y Brinson K. (1984). Plant cell-walls. In *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 46 (1). 265-382.
- Ebringerová, A., Hromádková Z., y Heinze T. (2005). Hemicellulose. In *polysaccharides*. Springer, Berlin, Heidelberg, 11(1). 1-67.
- Ebringerova, A., y Heinze, T. (2000). Xylan and xylan derivatives—biopolymers with valuable properties, 1. Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties. *Macromolecular Rapid Communications*, 21(9). 542-556.

- Espitia, R. E., Mapes S. E. C., Núñez C. C. A., y Escobedo L. D. (2010). Distribución geográfica de las especies cultivadas de *Amaranthus* y de sus parientes silvestres en México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 1(3). 427-437.
- Fernández, I. F. (2012). Producción de xilanasas por cepas de *Aspergillus niger* en cultivo sólido sobre salvado de avena y salvado de trigo. Tesis de doctorado, Universidad Autónoma de Querétaro.
- Gabriellii, I., Gatenholm P., Glasser W. G., Jain R. K., y Kenne L. (2000). Separation, characterization and hydrogel-formation of hemicellulose from aspen wood. *Carbohydrate Polymers*, 43(4). 367-374.
- García, I. L. (2012). Variedades de amaranto y fechas de siembra para rendimiento de grano y forraje en San Luis Potosí.
- Garrote, G., Domínguez H., y Parajó J. C. (1999). Mild autohydrolysis: an environmentally friendly technology for xylooligosaccharide production from wood. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental and Clean Technology*, 74(11). 1101-1109.
- Garrote, G., Domínguez H., y Parajó J. C. (2002). Autohydrolysis of corncob: study of non-isothermal operation for xylooligosaccharide production. *Journal of Food Engineering*, 52(3). 211-218.
- Gómez, G. A. L. (2014). Obtención de péptidos con actividad inhibitoria de la enzima convertidora de la angiotensina I a partir de hidrolizados proteínicos de la fracción vegetal del amaranto (*Amaranthus hypochondriacus L.*). Tesis de licenciatura. Universidad del Papaloapan, campus Tuxtepec.
- Gómez, G., A. L., García, G., M.J., y Soriano S., J. (2011). Composición química proximal de harina elaborada a partir de la fracción vegetal del amaranto (*Amaranthus hypochondriacus L.*). *Memorias del XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería*. Juriquilla, Querétaro.
- González, S. M. E., Pérez F. S. y Wong V. A. (2015), Residuos agroindustriales con potencial para la producción de metano mediante la digestión anaerobia. *Revista Argentina de Microbiología*, 47(3). 229-235.
- Graham, H., Aman P., Theander O., Kolankaya N., y Stewart C. S. (1985). Influence of heat sterilization and ammoniation on straw composition and degradation by pure cultures of cellulolytic rumen bacteria. *Animal Feed Science and Technology*, 12(3). 195-203.

- Gutierrez, C. M., Portal L., Moreno P., y Tengerdy R. P. (1999). Mixed culture solid substrate fermentation of *Trichoderma reesei* with *Aspergillus niger* on sugar cane bagasse. *Bioresource Technology*, 68(2). 173-178.
- Hedayati, M. T., Pasqualotto A. C., Warn P. A., Bowyer P. y Denning D. W. (2007). *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology*, 153(6). 1677-1692.
- Jain, I., Kumar V., y Satyanarayana T. (2015). Xylooligosaccharides: an economical prebiotic from agroresidues and their health benefits. *Indian Journal of Experimental Biology*, 53 (2). 131-142.
- Juri, A. (2011). Sacarificación y fermentación simultánea para la producción de bioetanol de segunda generación, mediante pretratamientos alternativos. Líquidos iónicos reciclados y hongos de pudrición blanca. Tesis de licenciatura. Universidad de Chile.
- Kim, T. H, Taylor F., Hicks K. B. (2008). Bioethanol production from barley hull using SAA (soaking in aqueous ammonia) pretreatment. *Bioresour Technol*, 99(1). 5694-702.
- Kumar, P. K. R., y Lonsane B. K. (1987). Potential of fed-batch culture in solid state fermentation for production of gibberellic acid. *Biotechnology Letters*, 9(3). 179-182.
- Kumar, R. y Wyman C.E. (2009). Effects of cellulase and xylanase enzymes on the deconstruction of solids from pretreatment of poplar by leading technologies. *Biotechnology Progress*, 25(1). 302-314.
- Lagunes, F., E., y Zavaleta M., E. (2016). Función de la lignina en la interacción planta-nematodos endoparásitos sedentarios. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 34(1). 43-63.
- Larsson, S., Palmqvist E., Hahn H. B., Tengborg C., Stenberg K., Zacchi G., y Nilvebrant N.O. (1999). La generación de inhibidores de la fermentación durante la hidrólisis ácida diluida de la madera blanda. *Tecnología de Enzimas y Microbios*, 24(1). 3-4.
- López, B. F., García, J. C., Feria Infante, M. J., Zamudio, M. A., y Pérez, A. (2010). Biorrefinería de materiales lignocelulósicos." *Eucalyptus globulus*". Universidad de Huelva.
- Martínez Salvador, Laura. (2016). Seguridad alimentaria, autosuficiencia y disponibilidad del amaranto en México. *Problemas del Desarrollo*, 47(186). 107-132.

- Martínez, J. M. R., y Lora E. E. S. (2015). Bioenergía: Fuentes, conversión y sustentabilidad. José María Rincón Martínez, Electo Eduardo Silva Lora.
- Méndez. A. M. F., López S. D., Núñez G. O., García G., M. J. Evaluation of radial growth on amaranth forage from filamentous fungi isolated from coffee leaves. *Mexican Journal of Biotechnology*, 4(2). 47-59.
- Montane, D., Farriol X., Salvado J., Jollez P., y Chornet E. (1998). Application of steam explosion to the fractionation and rapid vapor-phase alkaline pulping of wheat straw. *Biomass and Bioenergy*, 14(3). 261-276.
- Morales, R. S., Campos M. J. M., y Fierro J. L. (2014). Optimization of the process of chemical hydrolysis of cellulose to glucose. *Cellulose*, 21(4). 2397-2407.
- Morris, K. R., Nail S. L., Peck G. E., Byrn S. R., Griesser U. J., Stowell J. G., Hwang S.-J. y Park K. (1998). Advances in pharmaceutical materials and processing. *Pharmaceutical Science y Technology Today*, 1(6). 235-245.
- Murthy, M. R., Karanth N. G., y Rao K. R. (1993). Biochemical engineering aspects of solid-state fermentation. In *Advances in Applied Microbiology*, 38(1). 99-147.
- Mussatto, S. I., y Roberto I. C. (2005). Acid hydrolysis and fermentation of brewer's spent grain to produce xylitol. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(14). 2453-2460.
- Nacos, M. K., Katapodis P., Pappas C., Daferera D., Tarantilis P. A., Christakopoulos P., y Polissiou M. (2006). Kenaf xylan—a source of biologically active acidic oligosaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 66 (1). 126-134.
- Nair, S. G., Sindhu R., y Shashidhar S. (2008). Purification and biochemical characterization of two xylanases from *Aspergillus sydowii* SBS 45. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 149(3). 229-243.
- Niño L., L. C., Acosta C., A., y Gelves Z., G. R. (2013). Evaluación de pretratamientos químicos para la hidrólisis enzimática de residuos lignocelulósicos de yuca (*Manihot esculenta Crantz*). *Revista Facultad de Ingeniería de la Universidad de Antioquia*, 69 (2). 317-326.
- Ocampo, M. E., Cruz H. R., Aquiahuatl R. M. A., y Soriano S.J. Cultivo de *Aspergillus niger* en rastrojo de amaranto y olote de maíz para la obtención de polifenoles. Universidad Autónoma Metropolitana.

- Ovando, C. S. L., y Waliszewski K. N. (2005). Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. *Universidad y Ciencia*, 21(42). 111-121.
- Panthapulakkal, F. S. (2014). Microwave assisted extraction of xylan. Tesis doctoral. University of Toronto
- Panthapulakkal, F. S., Pakhareno V., y Sain M. (2013). Microwave assisted short-time alkaline extraction of birch xylan. *Journal of Polymers and the Environment*, 21(4). 917-929.
- Pérez, J., Muñoz D., J., De la Rubia T. D. L. R., y Martínez J. (2002). Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Microbiology*, 5(2). 53-63.
- Petzold, W. K., Schwikal K., Daus S., y Heinze T. (2014). Xylan derivatives and their application potential—Mini-review of own results. *Carbohydrate Polymers*, 100 (1). 80-88.
- Pirt, S. J. (1975). Principles of microbe and cell cultivation. Blackwell Scientific Publications.
- Prado, M. (2016). Optimización de la producción de enzimas celulasas obtenidas de hongos xilofagos aislados de madera en descomposición. Tesis de licenciatura. Universidad de Carabobo.
- Prinyawiwatkul, W., Beuchat L. R., y McWatters K. H. (1993). Functional property changes in partially defatted peanut flour caused by fungal fermentation and heat treatment. *Journal of Food Science*, 58(6). 1318-1323.
- Reed, J. D., McDowell R. T., Van Soest P. J., y Horvath P. R. (1982). Condensed tannins: a factor limiting the use of cassava forage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 33(3). 213-220.
- Rodríguez, I., y Piñeros 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).
- Roos, A. A., Persson T., Krawczyk H., Zacchi G., y Stålbbrand H. (2009). Extraction of water-soluble hemicelluloses from barley husks. *Bioresource Technology*, 100(2). 763-769.
- Samanta, A. K., Senani S., Kolte A. P., Sridhar M., Sampath K. T., Jayapal N., y Devi A. (2012). Production and in vitro evaluation of xylooligosaccharides generated from corn cobs. *Food and Bioproducts Processing*, 90(3). 466-474.

- Sargantanis, J., Karim M. N., Murphy V. G., Ryoo D., y Tengerdy R. P. (1993). Effect of operating conditions on solid substrate fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 42(2). 149-158.
- Saval, S. (2012). Aprovechamiento de residuos agroindustriales: pasado, presente y futuro. *Bio Tecnología*, 16(2). 14-46.
- Sedlmeyer, F. B. (2011). Xylan as by-product of biorefineries: characteristics and potential use for food applications. *Food Hydrocolloids*, 25(8). 1891-1898.
- Shalini, R., y Gupta D. K. (2010). Utilization of pomace from apple processing industries: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 47 (4). 365-371.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) (2018), con información de las Delegaciones de la SAGARPA.
- Soriano, S. J., Malpica S. F.P., Ramírez M.A.G. y Escamilla H.M.L. (2004). Análisis granulométrico de una harina de hoja de amaranto deshidratada, para la elaboración de una bebida de fibra dietética. *Tecnología de Alimentos*, 39 (01). 35-41.
- Sun, R. C., Fang J. M., Rolands P. y Bolton J. (1998). Physico-chemical and thermal characterization of wheat straw hemicelluloses and cellulose. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46 (1). 2804-2809.
- TAPPI, T. (2002). 211 om-02. Ash in Wood and Pulp. Technical Association of the Pulp and Paper Industry.
- Medina, S. T., Arroyo F. G., Herrera M. C., y Mariana G. A. (2018). Análisis químico proximal en residuos sólidos de cerveza artesanal y su aceptación en cerdas. *Abanico Veterinario*, 8(3). 86-93.
- Tengerdy, R. P., y Szakacs G. (2003). Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2-3). 169-179.
- Trinci, A. P. J. (1971). Influence of the width of the peripheral growth zone on the radial growth rate of fungal colonies on solid media. *Microbiology*, 67(3). 325-344.
- Vásquez, V. A. M. (2013). Producción de xilanasas por *aspergillus* sp: en fermentación sumergida y fermentación en medio sólido. Tesis de maestría. Universidad Iberoamericana Ciudad de México.
- Vazquez, M. J., Alonso J. L., Dominguez H., y Parajo J. C. (2000). Xylooligosaccharides: manufacture and applications. *Trends in Food Science and Technology*, 11(11). 387-393.

- Vila, C., Romero J., Francisco J. L., Garrote G., y Parajó J. C. (2011). Extracting value from Eucalyptus wood before kraft pulping: Effects of hemicelluloses solubilization on pulp properties. *Bioresource Technology*, 102(8). 5251-5254.
- Viloria, P., R., Marfisi, S., Rondón, P., O., y Rojas, B. (2014). Obtención de celulosa microcristalina a partir de desechos agrícolas del cambur (*Musa sapientum*). Síntesis de celulosa microcristalina. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 15(6). 286-300
- Wei, L., Yan, T., Wu, Y., Chen, H., & Zhang, B. (2018). Optimization of alkaline extraction of hemicellulose from sweet sorghum bagasse and its direct application for the production of acidic xylooligosaccharides by *Bacillus subtilis* strain MR44. *PloS one*, 13(4). 137-153.
- Wilkie, K. C. (1979). The hemicelluloses of grasses and cereals. In *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 36 (2). 215-264.
- Wright R.S, Glasser W.G. (1998). Steam assisted biomass fractionation. II. Fractionation behavior of various biomass resources. *Biomass and Bioenergy*, 14(3). 219-235.
- Wu, S., Du Y., Hu Y., Shi X., y Zhang L. (2013). Antioxidant and antimicrobial activity of xylan–chitoooligomer–zinc complex. *Food chemistry*, 138(2-3). 1312-1319.
- Yachmenev, V., Condon B., Klasson T., Lambert A.J. (2009). Acceleration of the enzymatic hydrolysis of corn stover and sugar cane bagasse celluloses by low intensity uniform ultrasound. *Biobased Material Bioenergy*, 3(1). 25-31
- Yang, R., Xu S., Wang Z., y Yang W. (2005). Aqueous extraction of corncob xylan and production of xylooligosaccharides. *Food Science and Technology*, 38(6). 677-682.

## Anexos

### Anexo A Procedimientos del análisis químico proximal

#### Determinación de cenizas

Se colocaron 3 crisoles limpios en una estufa a 105° C durante aproximadamente 3 horas, posteriormente se trasladaron los crisoles de la estufa al desecador para enfriarse a temperatura ambiente y así mantener a peso constante, se registraron el peso de cada crisol y se depositaron 2 g de muestra a cada uno, una vez terminado se llevaron los crisoles a un parrilla para su incineración, posteriormente los crisoles se trasladaron a un horno incinerador (mufla) manteniendo una temperatura de 550° C durante la noche, posteriormente se trasladó el crisol a un desecador hasta obtener una temperatura manipulable, transcurrido el tiempo se pesaron los crisoles.

La cantidad de cenizas se describe mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de ceniza} = \frac{\text{Peso de ceniza}}{\text{peso de la muestra}} * 100$$

#### Determinación del extracto etéreo

Se pesó dos gramos de muestra en papel filtro previamente formado en dedales o cartuchos con la muestra en el interior; cuidadosamente se introdujo en el cilindro de extracción del aparato Soxhlet para luego colocar 60 ml de éter en el matraz especial (previamente pesado) con borde esmerilado, el mismo que se coloca en un manto de calor eléctrico controlando que no sobrepase los 80° C de temperatura para que comenzara el ciclo de extracción durante cuatro horas, una vez terminado este proceso, se metieron los matraces a una estufa por 4 horas para la eliminación completa del éter, terminado el tiempo se dejó enfriar en un desecador para posteriormente contabilizar su peso.

La cantidad de extracto etéreo se describe de la siguiente fórmula:

$$\text{Cantidad de extracto etéreo} = \frac{\text{peso del matraz final} - \text{peso del matraz inicial}}{\text{peso de la muestra original}} * 100$$

## Proteína cruda

En un tubo de digestión se agregó 2 g de sulfato de potasio, 1 g de sulfato de cobre pentahidratado, 1 g de muestra y 10 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; en función del contenido de agua de la muestra se empezó con el proceso de digestión evaporando el agua presente en la muestra a una temperatura de 150°C por 20 minutos, pasado el tiempo se elevó la temperatura a 300°C por 30 minutos para reducir la producción de humos blancos, una vez terminado este tiempo se incrementó de nuevo la temperatura a 400°C por 90 minutos para finalizar la reacción. Terminado este proceso se dejó atemperar y posteriormente se procedió a una dilución del ácido agregando 15 mL de agua destilada. Posteriormente se llevó a un proceso de destilación donde se introdujo el tubo con la muestra en el destilador y se dosificó con 50 mL de NaOH juntamente se colocó un matraz de 250 mL a la salida del refrigerante con 40 mL de ácido Bórico y unas gotas de indicador. Se destiló hasta recoger 200 mL en el matraz (40 mL Bórico + 160 mL del destilado). Una vez obtenido el destilado se llevó a un proceso de titulación con HCl con una concentración de 0.1N.

## VALORACIÓN Y CÁLCULO

La cantidad de nitrógeno se determinó con la formula siguiente:

$$\text{Nitrógeno} = N \times V \times 14$$

Donde:

N = Normalidad del ácido de valoración

V = Volumen de ácido consumido

14 = Peso atómico del nitrógeno.

La cantidad de proteína cruda se determinó con la formula siguiente:

Para pasar a contenido de proteínas corregir por el factor adecuado según la naturaleza de la muestra. (6.25 por defecto)

$$\% \text{ Proteínas} = P2/P0 \times 100 \times F$$

Donde:

P2: Nitrógeno (mg).

P0: Peso de la muestra (mg).

F: Factor proteínico (6.25 por defecto)

### **Determinación de la fibra bruta**

Se pesaron 2 g de muestra en un matraz, posteriormente se agregó 200 ml de ácido H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> caliente y se mantuvo en ebullición por 30 minutos a reflujo, para luego filtrar la solución caliente a través del papel filtro en un embudo tipo Goch. Luego se regresó el residuo al matraz para seguir el mismo procedimiento con el NaOH caliente, se mantuvo en ebullición por 30 minutos a reflujo; terminado el proceso se filtró y se lavó con agua caliente, se secó el residuo durante toda la noche a una temperatura de 105° C pasado el tiempo se contabilizó el peso para posteriormente llevarlo a un horno mufla a una temperatura de 500°- 600° C, hasta que el contenido tome un color blanco; finalmente se dejó enfriar y se tomó el peso.

La cantidad de fibra cruda se determinó con la formula siguiente:

$$\% \text{ de fibra bruta} = \frac{\text{peso de la muestra y el crisol} - \text{peso de crisol y ceniza}}{\text{cantidad de muestra}} * 100$$

## **Determinación de humedad**

En una caja Petri a peso constante se depositó 2g de la muestra debidamente homogeneizada para luego ser llevada a la estufa y secar el material por 6 horas, una vez terminado el proceso se dejó enfriar en un desecador a temperatura ambiente, para posteriormente registrar su peso.

La cantidad de humedad se determinó con la formula siguiente:

$$\% \text{ de humedad} = \frac{\text{peso de la muestra con la caja} - \text{peso de la caja con muestra despues del secado}}{\text{cantidad de muestra}}$$

## **Determinación de fibra dietética total.**

- 1.- Se pesó  $1.000 \pm 0.005$  g de muestra tratada en vasos de precipitado de 100 ml, por duplicado (M1 y M2). Juntamente con las muestras se corrieron dos blancos de reactivos durante cada prueba (B1 y B2).
- 2.- Con agitación, se agregó a cada vaso 40 ml de solución mezcla amortiguadora MES-TRIS, de pH 8.2 a 24°C.
- 3.- Incubación con  $\alpha$ -amilasa termoestable. Con agitación a baja velocidad, se agregó a cada muestra y a cada blanco, 50  $\mu$ l de solución de  $\alpha$ -amilasa termoestable. Los vasos cubiertos con papel de aluminio se colocaron en un baño de agua con agitación a 95°C y se incubaron por 35 minutos. En todos los casos la medición del volumen de solución enzimática se realizó con micropipeta.
- 4.- Los vasos se retiraron del baño caliente y se enfriaron a 60°C. La temperatura del baño también se ajustó a 60°C.
- 5.- Incubación con proteasa. Se añadieron 100  $\mu$ l de solución de proteasa a las muestras y blancos. Los vasos cubiertos se incubaron en baño de agua a  $60 \pm 1$ °C, con agitación continua durante 30 minutos.

6.- Los vasos se retiraron del baño. Se ajustó el pH al intervalo 4,1-4,8, con solución adicional de NaOH 5% o solución de HCl 5%.

7.- Incubación con amiloglucosidasa. Se agregaron 200 µl de solución de amiloglucosidasa, se cubrieron los vasos y se incubaron en baño de agua agitado a 60°C durante 30 minutos.

8- Precipitación de fibra dietética con etanol. A cada muestra y blancos se agregaron 225 ml de etanol 95% precalentado a 60°C, se cubrieron con papel de aluminio y se permitió que se forme el precipitado a temperatura ambiente durante 30 minutos.

9.- Para la etapa de filtración se utilizaron cuatro crisoles filtrantes (correspondientes a las dos muestras y los dos blancos) tipo Gooch, de 60 ml de capacidad y tamaño de poro grueso (N° 4). Se registró el peso de los crisoles secos con una precisión de 0,1 mg, y a cada uno se agregó 1,0 gramo de agente filtrante Celite (con la misma precisión); se humedeció con agua destilada, se redistribuyó y aspiró para formar una capa uniforme de Celite.

10.- Se filtró el precipitado de cada digestión enzimática del paso 7 a través de un crisol con Celite, trasvasando todo el líquido y precipitado de manera cuantitativa, utilizando una bomba de vacío.

11.- El residuo se lavó sucesivamente con dos alícuotas de 15 ml de: a) Etanol 78%. b) Etanol 95%. c) Acetona.

12.- Se secaron los crisoles con el residuo en horno a 103°C durante toda la noche.

13.- Se enfriaron los crisoles en desecador y se pesaron con precisión de 0,1 mg. Para obtener el peso de cada residuo, se restó el peso de tara (peso del crisol seco y Celite).

14.- Se analizaron las cenizas de los residuos de M1 y B1, y se determinó el contenido de proteína por MicroKjeldahl en M2 y B2.

## CÁLCULOS

$$\% \text{ de FDT} = \frac{\frac{R1 + R2}{2} - C - P - B}{\frac{M1 + M2}{2}} * 100$$

Donde: M1: muestra 1 (g) M2: muestra 2 (g) R1: residuo de M1 (g) R2: residuo de M2 (g)  
 C: ceniza de R1 P: proteína de R2 B = blanco

Siendo el blanco:

$$\text{Blanco} = \frac{RB1 + RB2}{2} - BC - BP$$

Donde: RB1: residuo del blanco 1 (g) RB2: residuo del blanco 2 (g) BC: cenizas de RB1 (g)  
 BA: proteínas de RB2 (g)

## Anexo B análisis estadístico.

### Análisis estadístico de los tratamientos de extracción de xilano

Se realizó el análisis estadístico utilizando el software minitab para saber qué tratamiento de extracción fue el mejor, se analizó mediante la prueba Tukey aplicando 95% de confiabilidad.

### Comparisons for EXTRACCION

#### Tukey Pairwise Comparisons: Response = EXTRACCION, Term = METODO\*SUSTANCIA QUIMICA

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

METODO*SUSTANCIA QUIMICA	N	Mean	Grouping
A1 HS3	3	28.0867	A
A1 KO3	3	24.3700	B
A1 HS2	3	22.6433	B C
A2 HS3	3	22.2700	B C
A1 KO2	3	22.0233	B C D
A1 HS1	3	21.3367	B C D E
A2 KO3	3	20.0400	C D E F
A2 HS2	3	18.9400	D E F G
A1 KO1	3	18.6500	E F G
A2 KO2	3	17.2700	F G H
A2 HS1	3	16.5967	G H
A2 KO1	3	15.1667	H

Means that do not share a letter are significantly different.

## Análisis estadístico de la velocidad de crecimiento radial

Se realizó el análisis estadístico utilizando el software minitab para saber qué tratamiento de extracción fue el mejor, se analizó mediante la prueba Tukey aplicando 95% de confiabilidad.

### Tukey Simultaneous 95% CIs

#### Comparisons for velocidad de crecimiento

#### Tukey Pairwise Comparisons: Response = velocidad de crecimiento, Term = sustrato y concentrac

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

sustrato y concentracion*hongo empleado	N	Mean	Grouping
x10 b2	3	0.0460000	A
a10 a1	3	0.0446667	A
a5 a1	3	0.0410000	B
x10 a1	3	0.0370000	C
x5 b2	3	0.0350000	C
a10 b2	3	0.0340000	C
a5 b2	3	0.0300000	D
x5 a1	3	0.0246667	E

Means that do not share a letter are significantly different.