



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO**

---

FACULTAD DE CIENCIAS

**EVALUACIÓN DE HONGOS  
LIGNOCELULÓSICOS EN FERMENTACIÓN  
SUMERGIDA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

**ELIUTH HIRAM CASTRO MALDONADO**

Asesor:

**Dr. en C. Ángel Roberto Martínez Campos**



El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México, Mayo 2023

## ÍNDICE

I.	RESUMEN .....	1
II.	INTRODUCCIÓN .....	2
III.	ANTECEDENTES.....	3
IV.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	4
	Residuos Sólidos Urbanos (RSU).....	4
V.	MARCO TEÓRICO.....	7
	Materiales Lignocelulósicos .....	7
	Celulosa.....	7
	Hemicelulosa .....	12
	Lignina.....	12
	Microorganismos degradadores de celulosa.....	12
	Diferencia entre hidrólisis de bacterias y hongos .....	13
	Hongos de la degradación .....	13
	Aspergillus.....	14
	Hidrólisis enzimática .....	16
	Celulasas.....	18
	Aplicaciones industriales de celulasas .....	19
	Extracción y clarificación de jugos de fruta y vegetales.....	19
	Biocombustibles y biorrefinerías .....	20
VI.	JUSTIFICACIÓN.....	21
VII.	HIPÓTESIS .....	22
VIII.	OBJETIVOS .....	22
	Objetivo General.....	22
	Objetivos Específicos.....	22
IX.	MATERIALES Y MÉTODO .....	22
	Obtención e Identificación de cepas fúngicas .....	22
	Aislamiento y conservación de cepas fúngicas. ....	23
	Fermentación sumergida. ....	23
	Medición de Biomasa.....	23
	Determinación de azúcares reductores por método de DNS.....	24

Análisis de proteínas.....	24
Análisis Estadístico.....	25
X. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
Características macroscópicas de <i>Aspergillus fumigatus</i> y <i>Aspergillus flavus</i> en fermentación sumergida .....	25
Cinética de crecimiento.....	28
Producción de Azúcares Reductores .....	31
Producción de proteínas totales.....	33
XI. CONCLUSIONES .....	34
XII. REFERENCIAS .....	36

## I. RESUMEN

Año con año aumenta la población mundial y con esta la demanda de cosechas agrícolas de las que derivan inmensas cantidades de desechos lignocelulósicos, como los residuos de procesamientos de cereales, tallos y hojas provenientes de cultivos y aquellos que vienen del procesamiento del algodón, entre muchos otros; incrementando la alta tasa de contaminación. Siendo la celulosa y la lignina, quienes conforman estos residuos, dos de los polímeros más abundantes en la biosfera, y que además son de difícil degradación por la asociación química entre sí y con otros polímeros como la hemicelulosa.

En el presente trabajo se analizaron dos cepas de hongos con capacidad lignocelulolítica, *Aspergillus fumigatus* y *Aspergillus flavus*, que previamente fueron aisladas de muestras de corteza de pino.

Se realizaron cinéticas de producción en fermentación sumergida utilizando el medio de cultivo descrito por Mandels and Weber (1969). El análisis de actividad enzimática se realizó por cuantificación de azúcares reductores mediante el método de DNS (Miller, 1959); mientras que para el análisis de proteínas se empleó el método de Lowry (1951). Para la obtención de la biomasa generada se utilizó la técnica de peso seco.

En fermentación sumergida, para ambas cepas se presentó un patrón de crecimiento de tipo diaúxico, con dos etapas de crecimiento. La velocidad de crecimiento de *A. fumigatus* fue de 0.0041 g/h, que es 2.27 veces mayor que *A. flavus*, para la primera etapa, cuya velocidad fue de 0.0018 g/h; en la segunda etapa *A. fumigatus* presentó una velocidad de crecimiento de 0.018 g/h, mientras que *A. flavus* presentó una velocidad de crecimiento de 0.0015 g/h.

En contraste en fermentación sólida la velocidad de crecimiento de *A. fumigatus* fue 1.25 veces más alta que la de *A. flavus*.

## **II. INTRODUCCIÓN**

El bienestar que nos brinda el desarrollo de la tecnología, sustentada en el consumo, ha generado un costo ambiental muy alto para la sociedad y la naturaleza, con la alta demanda de recursos y la absorción de desechos resultantes del consumismo.

A nivel mundial la generación de residuos, es uno de los problemas ambientales más graves que los gobiernos deben enfrentar. En las últimas décadas su ritmo de crecimiento ha sido acelerado, con una mezcla cada vez más heterogénea y peligrosa tanto para la salud como para el ambiente (Sotelo *et al.*, 2013).

En naciones en vías de desarrollo se pueden identificar tres tipos de lugares para el manejo de residuos sólidos urbanos, los cuales son: relleno sanitario, sitios controlados y tiraderos a cielo abierto. Sin embargo, los dos últimos no se consideran lugares adecuados para su disposición final ya que no garantizan el control del flujo de lixiviados, ni la emisión de gases a la atmósfera. En el caso de México, se ha reportado la existencia de 260 rellenos sanitarios que son utilizados para disponer alrededor de 28 millones de toneladas de residuos sólidos urbanos. La mala disposición de los residuos sólidos urbanos acarrea una larga lista de problemas sociales y ecológicos como la proliferación de insectos y aves capaces de transmitir enfermedades, y el requerimiento de grandes extensiones de tierra para su uso como tiraderos a cielo abierto que generalmente se crean cerca de asentamientos poblacionales (Vian-Pérez *et al.*, 2019).

Así mismo los residuos ricos en celulosa y lignina procedentes de industrias como la agrícola y forestal cuya eliminación suele ser mediante la quema de biomasa representa un desperdicio de materia que tiene el potencial de convertirse en más de un producto con valor agregado (Grijalva Vallejos, 2013)

### III. ANTECEDENTES

La composición de los líquidos producidos por la descomposición de los residuos sólidos urbanos puede ser muy diversa y está directamente relacionada con la naturaleza de dichos residuos. Grandes industrias como la papelera, agricultura, la forestal, de producción de pulpa y de alimentos, crean una enorme cantidad de residuos ricos en celulosa y lignina que contaminan a nivel global, muchos residuos celulósicos son generalmente eliminados mediante quema de biomasa. Pero también representan una pérdida por el desperdicio de materia que puede ser convertida en varios productos con valor agregado (Grijalva Vallejo, 2013). A pesar de ello, una gran cantidad de microorganismos como bacterias y hongos, han sido estudiados como responsables de la degradación de la biomasa lignocelulolítica (Arana, 2002).

La participación de los microorganismos degradadores de celulosa se debe a la generación de enzimas hidrolíticas que despolimerizan los componentes orgánicos de los residuos. (Lynd *et al.*, 2002).

Galván-Quintero (2018) en su tesis “Aislamiento, purificación y caracterización de actividad celulolítica de hongos de corteza de *Pinus hartwegii*” logró purificar, caracterizar e identificar 10 cepas recolectadas de árboles *P. hartwegii* en el Área de Protección de Flora y Fauna del Nevado de Toluca y en el Volcán Pico de Orizaba, mediante identificación taxonómica. Concluyó que al analizar la actividad celulolítica mediante la técnica de rojo congo en placas de agar celulosa, las cepas que presentaron mayor actividad fueron *Aspergillus niger* y *Aspergillus fumigatus*, contrastando con *Aspergillus flavus*, la cepa con menor actividad de celulasa.

Si bien la fermentación en estado sólido, en este caso el crecimiento en placa, es recomendada para hongos filamentosos puesto que se simula el hábitat natural del microorganismo, esta presenta dificultad para mantener humedad durante la fermentación y carece de métodos analíticos simples y eficaces para determinar el crecimiento (Pandey, 2003). Por el contrario, la fermentación sumergida es un sistema de reacción que en general está perfectamente mezclado, logrando que en cada parte del reactor y en un tiempo dado se tenga la misma cantidad de microorganismo, nutrientes, y metabolitos (Gervais y Molin, 2003).

Por tales razones en el presente trabajo se plantea analizar la actividad lignocelulolítica de dos cepas de *Aspergillus* sp. en fermentación sumergida esperando que una de dichas cepas sea candidata para su potencial uso en la descomposición de residuos sólidos, por sus características celulolíticas.

#### **IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

##### **Residuos Sólidos Urbanos (RSU)**

La Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos (2011), en su artículo 5 sección XXXIII, define a los Residuos Sólidos Urbanos como: “Los generados en las casas habitación, que resultan de la eliminación de los materiales que utilizan en sus actividades domésticas, de los productos que consumen y de sus envases, embalajes o empaques; los residuos que provienen de cualquier otra actividad dentro de establecimientos o en la vía pública que genere residuos con características domiciliarias, y los resultantes de la limpieza de las vías y lugares públicos, siempre que no sean considerados por esta Ley como residuos de otra índole”.

Para México en 2017, el promedio de generación de residuos por persona diariamente fue de 0.98 kilogramos, lo que resultó en 44.6 millones de toneladas a nivel nacional, un aumento del 35.6.2% en comparativa con el 2003, es decir 11.73 millones de toneladas más generadas en ese período. Este aumento puede deberse al incremento urbano y al desarrollo tecnológico e industrial, lo que ocasiona un cambio de consumo. Cabe resaltar que de los residuos que se produjeron en el país en 2017, el 51.6% se compone de residuos de jardines y materiales orgánicos similares, y el 14.2% corresponde al papel y sus derivados (Figura 1) (SEMARNAT, 2018).

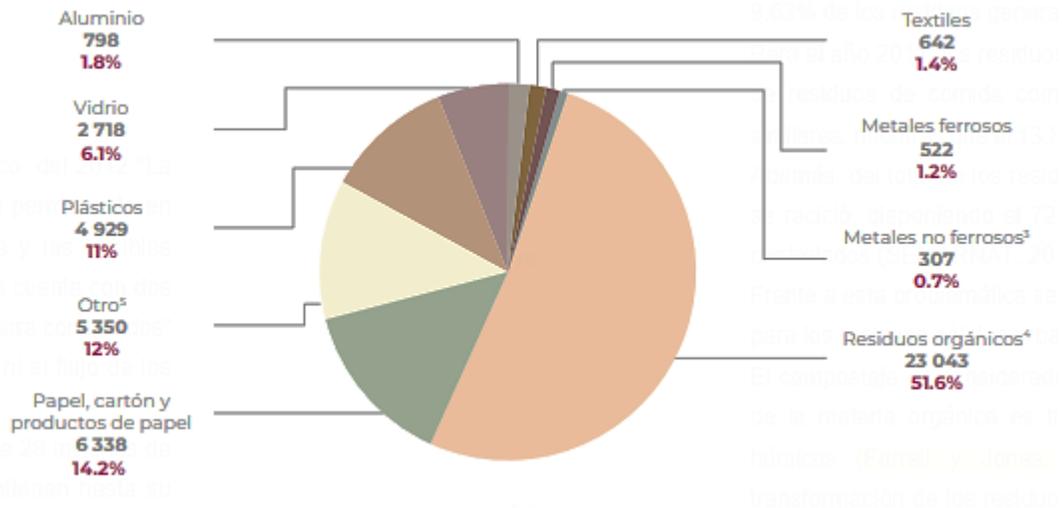


Figura 1. Composición de los RSU en México. (SEMARNAT, 2018)

### Gestión de los Residuos Sólidos Urbanos

De acuerdo con el informe de la Situación del medio Ambiente en México, del 2012 “La disposición final de los residuos se refiere a su depósito o confinamiento permanente en sitios e instalaciones que permitan evitar su presencia en el ambiente y las posibles afectaciones a la salud de la población y de los ecosistemas. En el país se cuenta con dos tipos de sitios de disposición final: los rellenos sanitarios y los rellenos de tierra controlados” En estos lugares no se vigila la emisión de gases de efecto invernadero ni el flujo de los líquidos que emana.

En México existen 260 rellenos sanitarios, donde se disponen alrededor de 28 millones de toneladas de RSU (Semarnat, 2018) en los cuales los residuos se mantienen hasta su desintegración, cubiertos de tierra, privándoles de oxígeno, proliferando microorganismos que a su vez terminan por generar el 10% del metano total global junto con otros compuestos (Vian-Pérez *et al.*, 2019).

## **Problemática de los Residuos Sólidos Urbanos**

### **Generación de biogases**

La composición de los biogases generados por el confinamiento de los RSU depende de la naturaleza de los mismos, sin embargo, en la literatura puede encontrarse que el metano los conforma aproximadamente en un 50%, seguido de bióxido de carbono junto con nitrógeno y sulfuro de hidrógeno, que además de ser una principal fuente de olor desagradable, también contribuyen al calentamiento global al ser los gases esenciales de efecto invernadero (Kiss y Encarnación, 2006).

### **Contaminación de los suelos y de los cuerpos de agua**

Los lixiviados, líquidos formados por el estancamiento pluvial entre los desechos orgánicos e inorgánicos, sumado a los liberados por los residuos, acarrearán una enorme cantidad de compuestos que van directo a cuerpos de agua y suelos, acidificándolos con la ayuda de microorganismos que los degradan, cambiando el pH del medio (Vián-Pérez *et al*, 2019).

### **Riesgos para la salud**

Los RSU y su mal manejo provocan riesgos sanitarios de manera directa e indirecta.

Directos: relacionados con los recolectores y segregadores de basura, puesto que son quienes de forma literal están en contacto con los desechos, muchas veces nocivos a causa de la mezcla de materiales peligrosos por parte de la población, como punzo cortantes y biológico-infecciosos, así como residuos industriales. Cabe mencionar que estos trabajos por sí solos son de los más arduos y de más alto riesgo, provocando que tengan de las morbilidades más elevadas. Además, claro, de convertir a los trabajadores en vectores de infecciones y enfermedades respiratorias, tóxicas y gastrointestinales para las personas con quienes conviven y tienen contacto (Jaramillo, 2002).

Indirectos: relacionados con los microorganismos presentes en ciertos residuos tanto domiciliarios como hospitalarios, tales como papel higiénico, gasas, algodones, pañales y ropa interior. Al igual que con la proliferación de animales, moscas, mosquitos, ratas, cucarachas y aves, que encuentran un lugar adecuado para su reproducción en los sitios

finales para los RSU, y que terminan siendo vectores para los microorganismos antes mencionados. Todo esto desencadenando un grave problema para los asentamientos humanos que se encuentren cerca de los rellenos sanitarios y tiraderos a cielo abierto (Jaramillo, 2002).

## **V. MARCO TEÓRICO**

Para Sotelo y colaboradores (2013), el bienestar que nos brinda el desarrollo de la tecnología, sustentada en el consumo, ha generado un costo ambiental muy alto para la sociedad y la naturaleza, con la alta demanda de recursos y la absorción de desechos resultantes del consumismo. La generación de residuos, a nivel mundial, es uno de los problemas ambientales más graves que los gobiernos deben enfrentar. En las últimas décadas su ritmo de crecimiento ha sido acelerado, con una mezcla cada vez más heterogénea y peligrosa tanto para la salud como para el ambiente. Además de la adecuada concientización social sobre dicha problemática para fomentar la reducción y el reciclaje, es importante promover el consumo responsable para disminuir la tasa de generación de desechos pero, sobre todo, es fundamental emprender la correcta utilización de tecnologías que faciliten la degradación de los residuos sólidos urbanos.

La celulosa se encuentra en una gran cantidad de materias primas en la industria y por consiguiente también está presente en los desechos de estas que lamentablemente terminan por eliminarse mediante combustión, terminando con el potencial de convertir estos desechos en productos con valor agregado (Grijalva Vallejos, 2013).

### **Materiales Lignocelulósicos**

Como señala Martínez-Anaya *et al.*, (2008) las maderas se componen principalmente de tres tipos de polímeros estructurales: lignina, celulosa y hemicelulosa. La lignina es un tipo de polímero fenólico heterogéneo que no tiene una composición estereoquímica regular y su función es proteger los otros dos componentes polisacáridos, celulosa y hemicelulosa (holocelulosa). La celulosa, por su parte, es el componente más abundante en las plantas y se produce como parte de su pared celular

### **Celulosa**

La celulosa es un polisacárido fibroso, resistente e insoluble en agua, responsable de la estructura rígida de las plantas (Brigham, 2018).

En la célula vegetal, la producción de celulosa se lleva a cabo a través de complejos de celulosa sintasa que se forman en el aparato de Golgi. Una vez creados, estos complejos son transportados a la membrana plasmática, donde sintetizan la celulosa. La orientación de la síntesis de las microfibrillas de celulosa está determinada por las rutas de microtúbulos corticales que siguen estos complejos. (Polko y Kieber, 2019).

Al ser un biopolímero tan abundante en la naturaleza, la celulosa genera un importante flujo de materiales en la biosfera a escala global, y es además relevante en los procesos de compostaje y digestión anaeróbica. La estructura cristalina de la celulosa es lo que le permite tener una alta resistencia a la hidrólisis biológica, sin embargo existen microorganismos capaces de degradarla gracias a la acción de complejos enzimáticos celulolíticos (Lynd *et al.*, 2002). La celulosa en las plantas se encuentra dentro de una matriz que, dependiendo del tipo de planta, se conforma por 50% celulosa, 30% hemicelulosa y 20% lignina, aproximadamente (Peters, 2006).

### Estructura química de la celulosa

La celulosa consta de unidades de anillo de D-glucopiranososa en la configuración de silla 4C1. Estas unidades están conectadas por enlaces glucosídicos  $\beta$ -1,4, que permiten que el eje de la cadena de celulosa gire hacia adelante y hacia atrás  $180^\circ$ . La unidad que se repite constantemente en la celulosa es la celobiosa que mide 1,3 nm de longitud. Cada uno contiene una unidad de anhidroglucosa de tres hidroxilos (AGU) en la cadena de celulosa, un grupo primario en C6 y dos grupos secundarios en C2 y C3 en el plano del anillo (Figura 2) (Heinze, 2015).

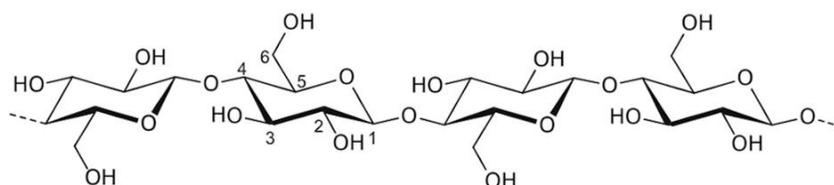


Figura. 2 Representación de una molécula de celulosa (Heinze, 2015)

La molécula de celulosa presenta diferencias químicas en sus extremos. Uno de los extremos cuenta con un átomo de carbono anomérico que se encuentra unido por enlaces

glicosídicos, lo que le confiere un carácter no reductor. Por otro lado, el extremo opuesto contiene una unidad de D-glucopiranososa que se encuentra en equilibrio con una función aldehído, otorgándole al grupo terminal un carácter reductor. (Heinze, 2015).

Los enlaces de hidrógeno, a la par de las áreas hidrofóbicas alrededor de los átomos de C, originan ciertas propiedades como la solubilidad, la reactividad de los grupos hidroxilo y la cristalinidad de la celulosa. Estos enlaces determinan también la diferencia entre la celulosa I y la celulosa II (Heinze, 2015).

La estructura general de la celulosa muestra dos fases: cristalina y no cristalina, y dependiendo de la fuente, la cristalinidad varía en la proporción de sus dos formas (Heinze, 2015).

La cristalinidad de la celulosa es una de las dos fases que esta presenta y la proporción de estas varía dependiendo de la fuente de obtención de la celulosa. La naturaleza estructural de la celulosa cristalina la vuelve insoluble en la mayoría de los solventes, incluyendo el agua, y evita que sea atacada por enzimas microbianas. A este fenómeno se le conoce como recalcitrancia (Himmel et al., 2007).

## **Polimorfismos**

La celulosa cristalina presenta cuatro diferentes polimorfismos (I, II, III, y IV), acorde a su fuente de obtención y a los tratamientos químicos a los que llegan a ser sometidos. Las dos formas cristalinas que se encuentran en la celulosa nativa, es decir, en las fibras naturales, son la celulosa I y la celulosa II, siendo la más abundante la celulosa I donde las cadenas de glucosa están orientadas paralelamente (Brown, 2003). Por el contrario, en la celulosa nativa II, que es sintetizada principalmente por algas y algunas bacterias, las cadenas de glucosa son antiparalelas (Brown, 2003).

La celulosa II puede también obtenerse a través de mercerización de la celulosa I para solubilizarla, y cabe mencionar que esta transición irreversible suele emplearse en la práctica para mejorar la calidad de las fibras e hilos naturales, mientras las celulosas III y IV aparecen por tratamientos específicos de la celulosa con amoníaco o aminas y glicerol, respectivamente. (Moon *et al.*, 2011; Heinze, 2005). La celulosa I a su vez tiene dos maneras de polimorfismo: I $\alpha$ , de estructura triclnica y I $\beta$  de estructura monoclnica. Estas

coexisten variando su proporción como resultado de la fuente que la contenga. (Moon *et al.*, 2011).

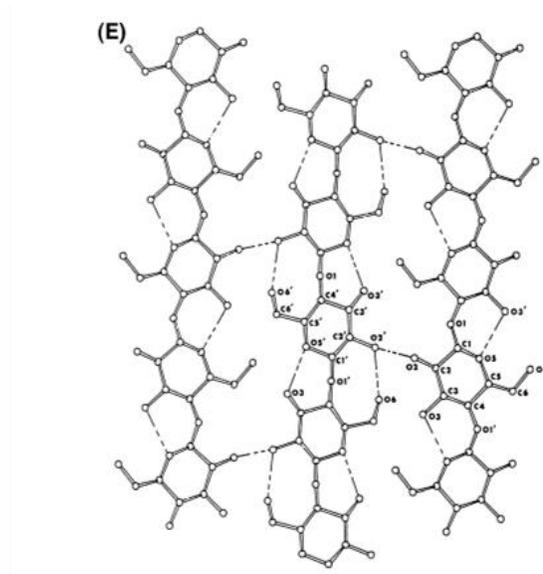


Figura 3. Enlaces de hidrógeno en la celulosa II (Kondo, 2005).

Gracias al enlace de hidrógeno intermolecular entre los grupos OH de C6 y C2 de otra cadena, es que la celulosa II muestra un sistema de enlace distinto, de manera que se forma un enlace de hidrógeno intermolecular de H-2:::OH-2' de la siguiente cadena, en lugar del enlace intramolecular de OH en C2. (Fig. 3) (Heinze, 2015).

La celulosa II tiene menos reactividad porque sus moléculas se encuentran más empaquetadas e intensamente entrelazadas, que las de la celulosa I. La figura 4 es un esquema de los diferentes sistemas de enlace de hidrógeno de la celulosa I y II (Thomas, H. 2015).

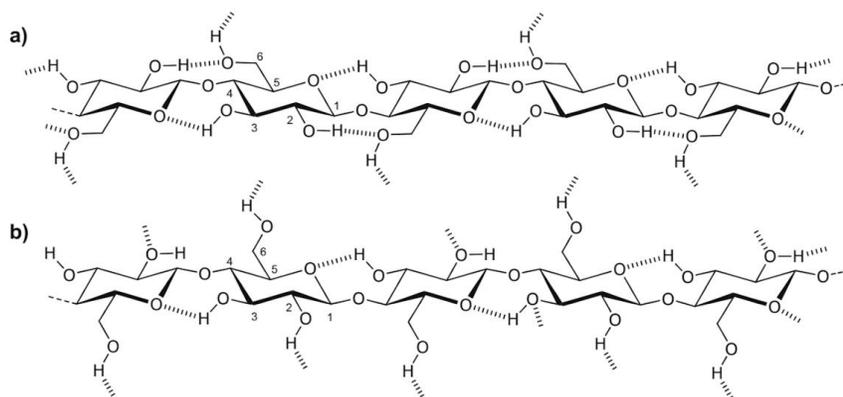


Figura 4. Sistema de enlace de hidrógeno en celulosa I (a) y celulosa II (b). (Thomas, H. 2015).

La celulosa cristalina de las plantas consiste principalmente de celulosa I $\beta$ , mientras que la celulosa producida por algunas bacterias tiene mayoritariamente la fase I $\alpha$ . (Heinze, 2005). El arreglo de las moléculas de celulosa en la pared celular de las plantas es jerárquico. La configuración tridimensional es estabilizada mediante interacciones de Van Der Waals, y consiste de 30 moléculas lineales, de entre 10,000 y hasta 14,000 moléculas de glucosa, que forman una estructura conocida como protofibrilla; ésta a su vez se asocia con otras protofibrillas para formar la fibrilla de celulosa. Por último, las fibrillas se ensamblan entre ellas para formar las fibras de celulosa que son entrelazadas mediante interacciones no covalentes con la hemicelulosa y la lignina (Lynd *et al.*, 2002).

La más importante es la celulosa tipo II, que se obtiene de la regeneración de la celulosa nativa después de haber sido tratada con bases fuertes para solubilizarla (Pettersen, 1984). La naturaleza estructural de la celulosa cristalina la vuelve insoluble en la mayoría de los solventes, incluyendo el agua, y evita que sea atacada por enzimas microbianas. A este fenómeno se le conoce como recalcitrancia (Himmel *et al.*, 2007).

### Regiones Amorfas

Aunado a las partes cristalinas, la celulosa también se conforma de unidades no cristalinas o “amorfos” que tienen un papel determinante en sus propiedades fisicoquímicas. Además las interacciones de la celulosa sólida con sustancias externas, reactivas, solubles o

absorbentes se dan inicialmente en los dominios amorfos, o en su defecto en la parte superficial de la celulosa cristalina. (Heinze, 2015).

Las regiones amorfas están compuestas de estructuras secundarias, que se encuentran en menor proporción dentro del arreglo molecular de la celulosa, tales como microfibrillas en formas de rosca o vueltas, o regiones vacías que dan forma a microporos superficiales, grandes hoyos y capilares. La celulosa amorfa por estas razones es menos compacta que la región cristalina, por lo que tiene la capacidad de absorber moléculas de agua que le confieren gran flexibilidad y cierta solubilidad (Cowling, 1975).

### **Hemicelulosa**

La hemicelulosa es el segundo polisacárido más abundante de la naturaleza. Se conforma de xyloglucanos, xylanos, mananos y glucomananos, y se encuentra presente en las paredes celulares de todas las plantas. Cada uno de estos componentes presenta diferencias estructurales entre cada especie de plantas.

Las hemicelulosas son sintetizadas por glicosiltransferasas ubicadas en las membranas de Golgi de la célula vegetal y su función principal es unir las microfibrillas de la celulosa, fortaleciendo así la pared celular vegetal (Scheller & Ulvskov, 2010).

### **Lignina**

La lignina es uno de los biopolímeros más abundantes en la naturaleza solo después de la celulosa y al igual que otros biopolímeros vegetales, se produce gracias a la fotosíntesis. Su importancia radica en el soporte mecánico, el transporte de agua y la resistencia al estrés externo de la planta. En las plantas herbáceas el contenido de lignina es menor al 15 por ciento, mientras que en las plantas leñosas el contenido va del 15 al 40 por ciento. Se considera un recurso renovable y de potencial uso industrial, su producción anual se ha estimado en el intervalo de  $5 \times 10^8$  -  $36 \times 10^8$  toneladas (Liu Q *et al*, 2018; Gellerstedt & Henrinksson, 2008).

### **Microorganismos degradadores de celulosa**

La degradación de la celulosa es una capacidad biológica que comparten una gran variedad de seres, tanto microorganismos como algunas especies animales, tales como las termitas

y la jaiba. Dentro de los microorganismos se encuentran un diverso número de bacterias y hongos, estos últimos, si bien son conocidos generalmente por saprófitos, en lo particular muchos de estos utilizan sustratos celulósicos para su supervivencia. Entre estos resalta un grupo primitivo de hongos aeróbicos, los Chytridomycetes por su relación simbiótica con los rumiantes, al degradar celulosa en los tractos gastrointestinales de estos. En contraste, existe una vasta diversidad de hongos anaeróbicos con capacidad celulolítica dentro de los que se encuentra *Bulgaria*, *Chaetomium*, y *Helotium*; y algunos anamorfos como: *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Myrothecium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, y *Trichoderma* del Phylum Ascomycota, y del Phylum Basidiomycota: *Coriolus*, *Phanerochaete*, *Poria*, *Schizophyllum* y *Serpula* (Lynd et al., 2002).

### **Diferencia entre hidrólisis de bacterias y hongos**

La disparidad más significativa en la hidrólisis de celulosa realizada entre hongos y bacterias radica en el mecanismo empleado por los microorganismos aerobios y anaerobios. Las bacterias y hongos aerobios poseen sistemas no complejos de celulasa que provocan la secreción de las enzimas de hidrólisis directamente al medio de cultivo en el que pudiese encontrarse el microorganismo. En la práctica esto implica el uso de sistemas con agitación y aireación constantes, aunado a la pérdida de las enzimas secretadas, lo que decrece la eficiencia del proceso. En contraste los hongos y bacterias anaerobios suelen comprender sistemas complejos de celulasa, en los cuales las enzimas de hidrólisis están contenidas en complejos enzimáticos denominados celulosomas que se encuentran unidos a la membrana celular. Por consiguiente los sistemas anaerobios resultan más atractivos en aplicaciones biotecnológicas por el simple hecho de prescindir de la agitación y tecnologías de flujo de control constantes, aún a pesar del hecho de que los microorganismos aerobios obtienen mayor energía de la glucosa que los anaerobios (Malherbe y Cloete, 2002).

### **Hongos de la degradación**

De manera natural existe una gran variedad de microorganismos que tienen la capacidad metabólica de degradar celulosa, al producir las enzimas necesarias para dicha tarea, es casi imposible dar un número exacto de estos debido a la gran variedad de

microorganismos que existen en la naturaleza y la constante investigación en esta área. Aún así, los hongos resaltan en esta actividad como saprófitos y patógenos por su rápida colonización e hidrólisis en la materia orgánica (Delfín-Alcalá y Durán-De-Bazúa, 2003; García-Espejo *et al*, 2016). De entre los hongos aerobios con actividad celulolítica se encuentran géneros como *Penicillium*, *Trichoderma*, *Fusarium* y *Aspergillus*. Y en hongos anaerobios están los géneros *Piromyces*, *Caecomyces* y *Orpinomyces*, entre otros (Gutiérrez-Rojas *et al*, 2013).

### **Aspergillus**

De acuerdo con Abarca (2000), *Aspergillus* es un género de hongos que produce estructuras llamadas conidióforos, en los cuales se encuentran las células conidiógenas que dan lugar a las esporas asexuales o conidios. Además, este género de hongos se caracteriza por su capacidad para producir hifas especializadas.

Se trata de un gran género conformado por más de 180 especies que presentan sus telomorfos en géneros diferentes. Se subdivide en 6 subgéneros que a su vez se dividen en secciones (Samson & Pitt, 2000). (Tabla 1)

Tabla 1. Clasificación del género *Aspergillus* (Abarca, 2000).

Subgénero	Sección	Sinónimo	Especie tipo	Teleomorfo	
<b>Aspergillus</b>	<i>Aspergillus</i>	Grupo <i>A. glaucus</i>	<i>A. glaucus</i>	<i>Eurotium</i>	
	<i>Restricti</i>	Grupo <i>A. restrictus</i>	<i>A. restrictus</i>		
<b>Fumigati</b>	<i>Fumigati</i>	Grupo <i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>Neosartorya</i>	
	<i>Cervini</i>	Grupo <i>A. cervinus</i>	<i>A. cervinus</i>		
<b>Ornati</b>		Grupo <i>A. ornatus</i>	<i>A. ornatulus</i>	<i>Warcupiella, Sclerocleista, Hemicarpenteles</i>	
<b>Clavati</b>	<i>Clavati</i>	Grupo <i>A. clavatus</i>	<i>A. clavatus</i>		
<b>Nidulantes</b>	<i>Nidulantes</i>	Grupo <i>A. nidulans</i>	<i>A. nidulans</i>	<i>Emericella</i>	
	<i>Versicolores</i>	Grupo <i>A. versicolor</i>	<i>A. versicolor</i>		
	<i>Usti</i>	Grupo <i>A. ustus</i>	<i>A. ustus</i>		
	<i>Terrei</i>	Grupo <i>A. terreus</i>	<i>A. terreus</i>		
	<i>Flavipedes</i>	Grupo <i>A. flavipes</i>	<i>A. flavipes</i>		
<b>Circumdati</b>	<i>Wentii</i>	Grupo <i>A. wentii</i>	<i>A. wentii</i>	<i>Petromyces</i>	
	<i>Flavi</i>	Grupo <i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>		
	<i>Negri</i>	Grupo <i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>		
	<i>Circumdati</i>	Grupo <i>A. ochraceus</i>	<i>A. ochraceus</i>		
	<i>Candidi</i>	Grupo <i>A. candidus</i>	<i>A. candidus</i>		
	<i>Cremei</i>	Grupo <i>A. cremeus</i>	<i>A. cremeus</i>		<i>Chaeosartorya</i>
	<i>Sparsi</i>	Grupo <i>A. sparsus</i>	<i>A. sparsus</i>		

Los hongos del género *Aspergillus* son generalmente saprófitos y se encuentran naturalmente y de forma abundante en suelos y en casi cualquier ambiente. Su forma de reproducción es mediante conidios cuya germinación da origen a las hifas (Martínez Padrón *et al*, 2012). Su capacidad para crecer en múltiples ambientes es gracias a su tolerancia a un amplio rango de temperatura, que va de aproximadamente de 0 a 45°C y su requerimiento de humedad relativa del alrededor del 70% (Carrillo, 2003).

### ***Aspergillus* sección *Fumigati***

*Aspergillus fumigatus* es un hongo que se propaga de forma asexual mediante esporas, denominadas conidias, que pueden dispersarse a distancias largas y tienen la facultad de germinar bajo una amplia gama de condiciones ambientales. Luego de germinar producen hifas septadas que se ramifican formando el micelio. Se trata de un hongo saprófito y patógeno que ocasiona enfermedades invasoras que llegan a ser letales en pacientes inmunocomprometidos (Porteros, 2017).

Cabe mencionar que el grado de inmunosupresión en las personas afectadas por este hongo es determinante para que se logre una invasión efectiva, sin embargo es gracias a las características biológicas del hongo lo que provoca un alto grado de virulencia. En primera instancia los conidios son del tamaño adecuado para llegar hasta los alveolos pulmonares, además de que el pH fisiológico (pH 7,3 - 7,6) es óptimo para la obtención de nutrientes por parte del cuerpo hospedero, así como la temperatura corporal, que ronda los 36°C y es perfecto para su crecimiento, extendiéndose de forma rápida también con la ayuda de las catalasas que el hongo genera y le permite deshacerse de la respuesta inmunológica oxidativa del organismo atacado. (Stergiopoulou *et al*, 2007).

### **Aspergillus sección Flavi**

Esta sección incluye 22 especies productoras de aflatoxinas, como *Aspergillus flavus* que crece en casi cualquier cultivo agrícola.

En la naturaleza, *Aspergillus flavus* se encuentra en el suelo, es un hongo saprófito y filamentoso oportunista que crece fácilmente en presencia de carbono y nitrógeno, se conoce principalmente porque suele desarrollarse extensamente en gramíneas como el maíz (Rojas-Contreras, 2020).

Se reproduce por ciclo asexual por formación de conidios que sobreviven en el ambiente por largos periodos de tiempo y en extremas condiciones. Crece de manera óptima en un rango de temperatura de 25 a 37°C.

El maíz es de igual manera uno de los productos agrícolas que más contaminados se ven por *A. flavus*. El hongo produce las micotoxinas (aflatoxinas) en el maíz en el campo, almacenamiento o transporte de los granos (Rangel-Muñoz, 2019).

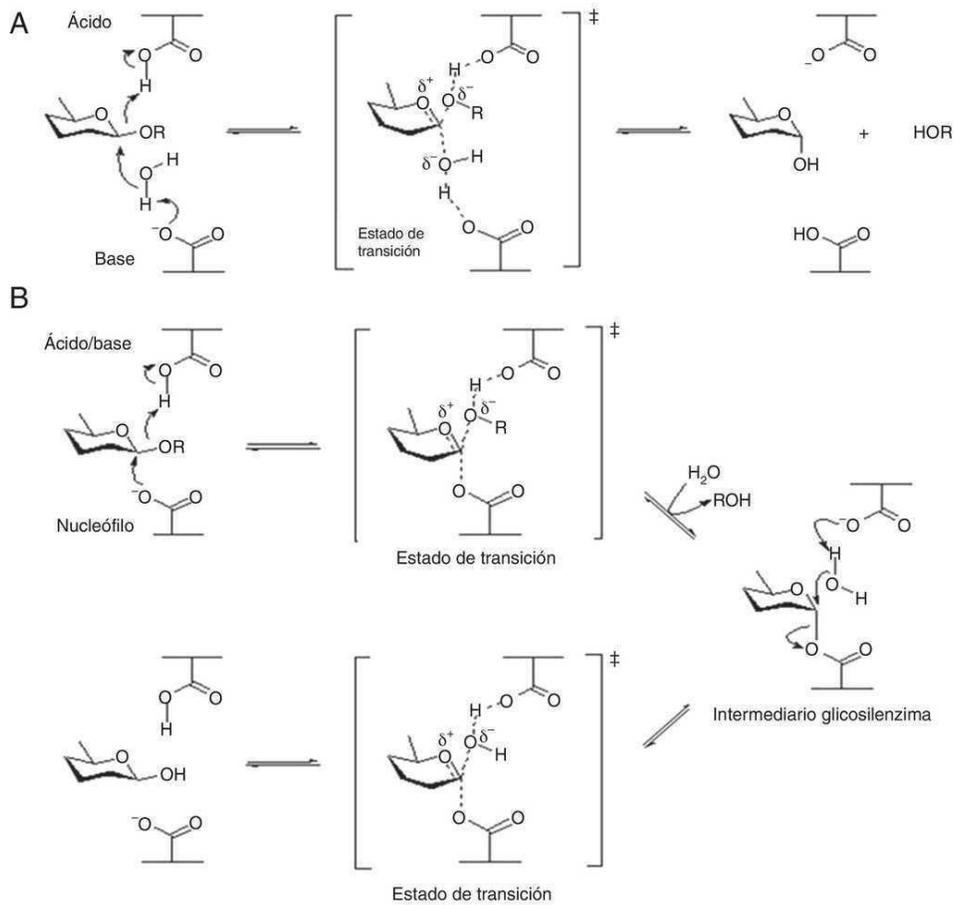
Las aflatoxinas son metabolitos secundarios producidos en la fase estacionaria del desarrollo del hongo y ante la finalización o interrupción del crecimiento por la falta de nutrientes, de modo que no tienen una función directa vital fisiológica del hongo, sino que son una respuesta de defensa. La expresión del gen regulador de aflatoxinas perturba también la esporulación y el proceso de transcripción celular (Rangel-Muñoz, 2019).

### **Hidrólisis enzimática**

Como se ha mencionado anteriormente, la celulosa cuenta de una parte cristalina y una amorfa. La cristalinidad afecta a la hidrólisis de la celulosa conforme decrece el acceso de las enzimas al sustrato, ocasionando que se degrade primero y rápidamente la sección amorfa de la celulosa, por lo que al aumentar el grado de cristalinidad la celulosa se hace cada vez más resistente a la hidrólisis (Gutiérrez-Rojas *et al*, 2013).

Esta reacción de descomposición es desempeñada por un grupo de enzimas llamadas celulasas que catalizan la hidrólisis del enlace glucosídico de la celulosa. Existen dos mecanismos de hidrólisis diferenciados por la distancia entre los 2 aminoácidos, uno ácido general y otro base, que se encuentran en el sitio catalítico. El primer mecanismo es el de conservación, cuando la distancia entre los aminoácidos es de  $\approx 5,5 \text{ \AA}$ . A su vez este mecanismo se da en dos etapas, en la primera, que se llama glucosilación, el aminoácido base ataca el centro anomérico, proveyendo la formación de una enzima glucosídica intermedia ácida, dada por un carboxilato ácido. En la segunda, deglucosilación, el ahora desprotonado carboxilato ácido actúa como base y se une a una molécula de agua nucleofílica para hidrolizar la enzima intermedia, logrando la hidrólisis (fig. 5 (B)).

El mecanismo de inversión ocurre cuando la distancia entre los aminoácidos es de  $\approx 10 \text{ \AA}$ , en este la hidrólisis se produce en una sola etapa, puesto que por haber mayor distancia la molécula de agua puede ser acomodada entre la base y el azúcar (fig. 5 (A)) (Gutiérrez-Rojas *et al*, 2013).



Rev Iberoam Micol. 2015;32:1-12

Figura 5. Mecanismos de hidrólisis enzimática de la  $\beta$ -glucosidasa. A. Mecanismo de inversión. B. Mecanismo de conservación (Gutiérrez-Rojas *et al*, 2013).

## Celulasas

El término celulasas hace referencia al grupo de enzimas que, en acción conjunta, hidrolizan la celulosa. Usualmente estas enzimas se definen como  $\beta$ -1,4 glucanohidrolasas que catalizan la hidrólisis de celulosa y algunos polisacáridos relacionados (Herrera *et al*, 2019).

El complejo de celulasas se conforma por 3 tipos de enzimas: 1) endoglucanasas o 1,4- $\beta$ -D-glucano-4-glucanohidrolasas (EC.3.2.1.4); 2) exoglucanasas, que incluyen 1,4- $\beta$ -D-glucano-glucanohidrolasas (celodextrinas) (EC 3.2.1.74) y 1,4- $\beta$ -D-glucano-

celobiohidrolasas (celobiohidrolasas) (EC.3.2.1.91), y 3)  $\beta$ -glucosidasas o  $\beta$ -glucosidasa hidrolasas (EC.3.2.1.21) (Gutiérrez-Rojas *et al*, 2013).

“Las endoglucanasas cortan al azar en el interior de la celulosa amorfa, generando oligosacáridos de varias longitudes y, en consecuencia, nuevos extremos de cadena. Las exoglucanasas actúan de una manera progresiva en los extremos reductores y no reductores de las cadenas del polisacárido, liberando glucosa (glucanohidrolasas) o celobiosa (celobiohidrolasas). Las  $\beta$ -glucosidasas hidrolizan las celodextrinas solubles y la celobiosa a glucosa” (Gutiérrez-Rojas *et al*, 2013).

“Los sistemas de celulasas funcionan coordinadamente para lograr la hidrólisis exitosamente. Hay 4 tipos de sinergia dentro de las celulasas: 1) endo-exo, correlación entre endoglucanasas y exoglucanasas; 2) sinergia exo-exo, aquella entre exoglucanasas que procesan los extremos reductores y no reductores de la cadena; 3) sinergia entre exoglucanasas y  $\beta$ -glucosidasas que eliminan celobiosa y celodextrinas, y 4) sinergia intramolecular entre los dominios catalíticos y los dominios de unión a la celulosa” (Gutiérrez-Rojas *et al*, 2013).

### **Aplicaciones industriales de celulasas**

Durante siglos la utilización de enzimas de origen microbiano ha sido reportado ampliamente, sin embargo, el uso comercial de estas enzimas es reciente. Las celulasas se han empleado en diversos sectores comerciales, como en la industria cervecera, lavandería (detergentes), agricultura, papel e industria textil. El uso de las celulasas inmovilizadas ha ampliado aún más su aplicación en el procesamiento de frutas y verduras, ya que potencia el poder catalítico y reduce los costos (Ejaz, *et al*, 2021).

### **Extracción y clarificación de jugos de fruta y vegetales**

La producción de jugos de fruta y vegetales requiere métodos de extracción, clarificación y estabilización. Una combinación de celulasas con pectinasas y hemicelulasas provenientes de microorganismos de grado alimenticio, son utilizadas en los procesos de clarificación y extracción de los jugos. (Bhat, 2000).

Las celulasas son empleadas para macerar la pulpa de la fruta por licuefacción parcial o completa, lo que no sólo incrementa el rendimiento del jugo y reduce el tiempo del proceso, sino que además mejora la extracción de componentes importantes de la fruta. (Bhat, 2000).

Así mismo las celulasas ayudan a estabilizar la nube, textura y a facilitar la concentración de néctares y purés, además de disminuir la viscosidad de estos en poco tiempo. (Bhat, 2000).

### **Biocombustibles y biorrefinerías**

Las celulasas están involucradas en la bioconversión de biomasa lignocelulósica cuya degradación consiste en el pretratamiento de dicha biomasa, sacarificación (donde se emplean directamente las celulasas) y la fermentación (Ejaz, *et al*, 2021). Se estima que este proceso de la biomasa lignocelulósica realizado por microorganismos celulolíticos puede reducir el 40% de los costos (Menendez *et al*, 2015).

## VI. JUSTIFICACIÓN

En las últimas décadas la biosfera ha sufrido cambios significativos como resultado de la producción y el consumo de bienes y servicios. La magnitud y escala de los efectos en el planeta son tan evidentes y duraderos que incluso se ha propuesto que ecológicamente se distinga al actual periodo como una nueva era geológica denominada “antropoceno” (Steffen *et al*, 2008).

De acuerdo con la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (2017), en México se generan diariamente 102,895.00 toneladas de residuos, de los cuales se recolectan 83.93% y se disponen en sitios de disposición final 78.54%, reciclando únicamente el 9.63% de los residuos generados.

De acuerdo con las cifras más recientes, publicadas en 2017, se registró un aumento del 35.6% en la generación de RSU, alcanzando un total de 44.6 millones de toneladas en comparación con el año 2003. Siendo el Estado de México la entidad federativa que más residuos produce, con 6.98 millones de toneladas. De esta cantidad de residuos a nivel nacional, el 51.6% estuvo conformado por residuos orgánicos, mientras que el papel y sus derivados representaron el 14.2%. Para 2012, del número total de residuos generados a nivel nacional, solo el 9.6% se recicló. En 2017, del total de residuos valorizables, el 28.3% correspondió al papel, y sus derivados. (SEMARNAT, 2018).

Frente a esta problemática se vuelve imprescindible la búsqueda de alternativas de gestión para los residuos sólidos urbanos, que permitan evacuarlos favorablemente.

El compostaje es considerado como la descomposición biológica aerobia en donde parte de la materia orgánica es transformada a sustancias estables parecidas a los ácidos húmicos (Farrell y Jones, 2009) y como una herramienta biotecnológica en la transformación de los residuos sólidos orgánicos en productos agrícolas apropiados (Baffi *et al.*, 2007).

Los hongos lignocelulósicos son relevantes en este punto por su producción de enzimas lignocelulósicas que pueden emplearse para el manejo y degradación de los residuos. *Aspergillus fumigatus*, termófilo, ha sido encontrado frecuentemente en compostas (Golueke *et al.*, 1954).

El objetivo de este trabajo es analizar el crecimiento y la producción enzimática de dos cepas de hongos lignocelulolíticos, de mayor y menor actividad enzimática, de acuerdo a lo reportado por Galván (2018), esperando que una de dichas cepas sea candidata para su potencial uso en la descomposición de residuos sólidos.

## VII. HIPÓTESIS

*Aspergillus fumigatus* tiene mayor producción de proteínas y crece a una velocidad mayor en comparación a *Aspergillus flavus*, como un reflejo de su cualidad cosmopolita.

## VIII. OBJETIVOS

### Objetivo General

- Evaluar la actividad celulolítica de dos cepas de *Aspergillus* spp. en fermentación sumergida

### Objetivos Específicos

- Evaluar la cinética de crecimiento, consumo de sustrato y producción de proteínas, de *Aspergillus flavus* en fermentación sumergida con celulosa microcristalina.
- Evaluar la cinética de crecimiento, consumo de sustrato y producción de proteínas, de *Aspergillus fumigatus* en fermentación sumergida con celulosa microcristalina.
- Determinar la cepa de *Aspergillus* spp. con mayor producción de proteínas, consumo de sustrato, actividad celulolítica, y menor tiempo de fermentación, mediante el análisis comparativo entre *Aspergillus fumigatus* y *Aspergillus flavus*.

## IX. MATERIALES Y MÉTODO

### Obtención e Identificación de cepas fúngicas

Se realizaron muestreos dirigidos en la corteza de árboles de *P. hartwegii* en el Área de Protección de Flora y Fauna del Nevado de Toluca y en el Volcán Pico de Orizaba. Las cortezas de *P. hartwegii* se seleccionaron tomando como criterio el desarrollo de hongos en la superficie de la corteza y su deterioro, manifestado por el cambio de color, crecimiento invasivo del hongo y textura de la misma. Las muestras fueron tomadas y depositadas en bolsas ziploc para su posterior procesamiento. La identificación de cada cepa fúngica se realizó a través de técnicas clásicas de micología siguiendo la metodología de Espadas-Reséndiz et al. (2003), elaborando microcultivos con las muestras obtenidas de corteza de *Pinus hartwegii* procesadas en el laboratorio de Microbiología del Instituto de Ciencias Agropecuarias y Rurales (ICAR) de la UAEMéx. Se llevó a cabo la identificación taxonómica con claves especializadas y de acuerdo al Index Fungorum (2022) y a Mycobank (2022).

### **Aislamiento y conservación de cepas fúngicas.**

Las dos muestras obtenidas de corteza de *Pinus hartwegii* fueron procesadas en el laboratorio de Microbiología del Instituto de Ciencias Agropecuarias y Rurales (ICAR) de la UAEMéx.

De acuerdo a las características macroscópicas y microscópicas que presentaron los aislados fúngicos, las cepas empleadas en este trabajo se establecieron del género

Tabla 3. Clasificación de cepas fúngicas a través de claves dicotómicas, como se muestra en la siguiente tabla.

<b>Cepa</b>	<b>Clave</b>	<b>Especie determinada</b>	<b>Lugar de origen</b>	<b>Clasificación</b>
1	NTNVr	<i>Aspergillus flavus</i>	Área de Protección de Flora y Fauna "Nevado de Toluca"	Ascomiceto
2	POHCeVr	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Volcán Pico de Orizaba	Ascomiceto

Para el aislamiento se tomó aproximadamente 1 g de las muestras en placa de *Aspergillus fumigatus* y *Aspergillus flavus*. Con ayuda de una asa bacteriológica en condiciones estériles, depositando el inóculo en matraces de 250 ml con 100 ml de medio de cultivo, empleando el medio descrito por Mandels and Weber (1969). Después se incubaron los matraces a 28°C con agitación a 120 rpm por una semana hasta la aparición de esporas y micelio fúngico.

### **Fermentación sumergida.**

Se realizaron cinéticas de producción en fermentación sumergida colocando 2.5 ml de los aislados anteriormente mencionados en matraces con capacidad de 500 ml que contenían 250 ml de medio de cultivo, descrito por Mandels and Webber (1969). Estos matraces se colocaron en una incubadora con agitación a 120 rpm y 28°C.

### **Medición de Biomasa**

Durante seis días y por triplicado, de cada matraz Erlenmeyer se extrajeron 10 ml de inóculo que se recolectaron en tubos Falcon, previamente pesados, para posteriormente someterlos a centrifugación por 30 minutos a 4000 rpm. Acto seguido, los tubos se

decantaron con el fin de emplear los pellets de biomasa para la medición de esta a través de peso seco. Los tubos falcon se introdujeron en estufa a 70°C durante 20 h., pasado el tiempo estos se pesaron, para poder analizar la biomasa seca por medio de la técnica de diferencia de pesos.

### **Determinación de azúcares reductores por método de DNS**

Se llevó a cabo una curva de calibración utilizando una solución de 100 ml de glucosa con concentración de 0.1 g/L de la cual se realizaron diluciones en once tubos de ensaye, que comprenden desde la concentración 0 a 1g/L de glucosa, junto con 0.5 ml del reactivo DNS, para luego calentarlos en baño de agua en ebullición durante 5 min. Después se agregaron 5 ml de agua destilada y con ello se obtuvo la ecuación de la recta para los posteriores cálculos.

Los sobrenadantes del ensayo de biomasa se utilizaron para el análisis de actividad enzimática por cuantificación de azúcares reductores. En tubos de cristal de 10 ml se adicionaron 0.5 ml de muestra y 0.5 ml del reactivo de DNS.

Los tubos se colocaron en baño María de 100 °C por 5 min. Se enfriaron hasta temperatura ambiente y se les añadió 5 ml de agua destilada. Se agitaron y se realizó la lectura a 540 nm en un espectrofotómetro digital uv-visible Thermo GENESYS 10S (Miller, 1959).

### **Análisis de proteínas**

Para el análisis de proteínas totales se realizó una curva de calibración con 9 diluciones de albúmina, que van desde una nula concentración de albumina, hasta 800 mg/L de esta.

Posteriormente, para cada tubo de ensaye de 10 ml se colocaron 5 ml de la dilución y se añadieron 5 ml de NaOH 1 N para luego agitar y llevar a baño de agua a 100°C por 5 min. Después, de dicho tubo se tomaron 1ml y se agregaron en otro tubo al que se le colocaron 5 ml del reactivo C, que se preparó al mezclar los reactivos A: 2 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  con 0.4 g de NaOH; B<sub>1</sub>: 2 g  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  y B<sub>2</sub>:  $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \times 4\text{H}_2\text{O}$ , empleando 50 ml de A, 0.5 ml de B y 0.5 ml del reactivo C. El tubo se mezcló con un vortex por 30 s y se dejó reposar 10 min, posteriormente se añadieron 0.5 ml del reactivo Folin-Ciocalteu y se protegieron las muestras de la luz durante 30 min. Finalmente, la absorbancia se midió en espectrofotómetro a 740 nm. Las muestras con suspensión celular se sometieron al mismo tratamiento. Todo esto de acuerdo al método de Lowry (1951).

## Análisis Estadístico

Los análisis de producción de biomasa, la concentración de proteínas totales y de azúcares reductores se construyeron por triplicado. Los resultados de cada medición fueron promediados y se utilizaron los valores medios como parámetro para los gráficos. Los datos obtenidos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de factor único,  $P < 0.05$ .

## X. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Características macroscópicas de *Aspergillus fumigatus* y *Aspergillus flavus* en fermentación sumergida

El crecimiento de *Aspergillus fumigatus* (POHCeVr) se presenta en forma de pellets compactos blanquecinos, no muy definidos, como se muestra en la figura 6. Mientras que el crecimiento de *Aspergillus flavus* se da en agregados dispersos color beige, de nula compactación (Figura 7). En algún momento del crecimiento de ambas cepas parte de su micelio se adhiere a las paredes del matraz.

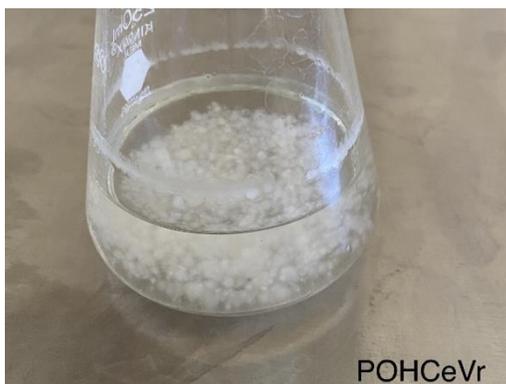


Figura 6. *Aspergillus fumigatus* en fermentación sumergida

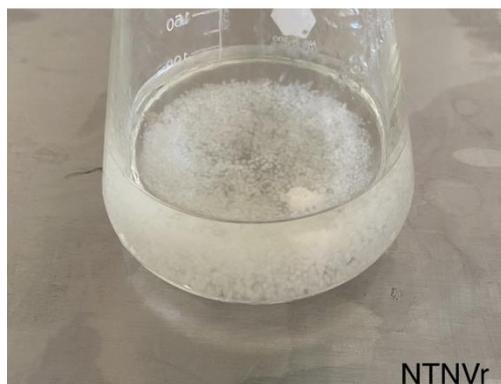


Figura 7. *Aspergillus flavus* en fermentación sumergida

Para *A. fumigatus*, a pesar de que a las 48 horas se observa la aparición de esporas recolectadas en la pared del matraz (figura 8), cuando se esperaría que el hongo ha alcanzado su mayor crecimiento al haber agotado sus recursos, la cepa continúa su crecimiento hasta las 96 horas. Mientras que en la cepa *A. flavus* la aparición de esporas se da a las 72 horas (figura 11), y aunque por los resultados del peso seco se señala que el punto máximo de crecimiento se alcanza hasta las 96 horas, es visible que en las 96 horas la gran mayoría de lo contenido en los matraces se conforma por esporas (Figuras

13). Esto claramente indica que durante las primeras 96 horas si hay crecimiento y después inicia la fase de muerte, ello es imperceptible en los resultados de Galván Quintero (2018), ya que en el crecimiento en fermentación sólida no existe degradación lítica.

A partir de las 76 h la biomasa dentro de los matraces se volvió dispersa, perdiendo la forma de pellets, tal como se observa en las figuras 10, 11, 12, 13 y 14.

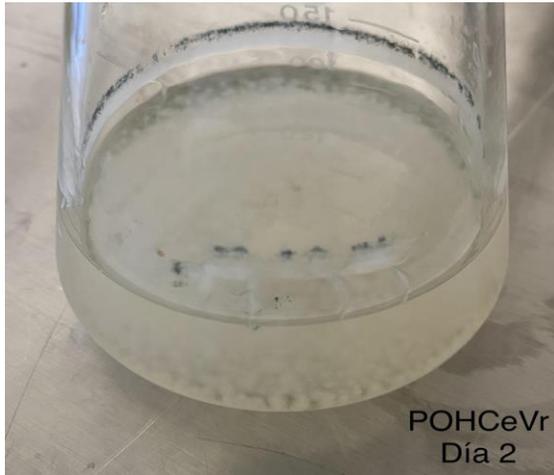


Figura 8. Cepa *Aspergillus fumigatus* en fermentación sumergida, 48 hrs después del inóculo.

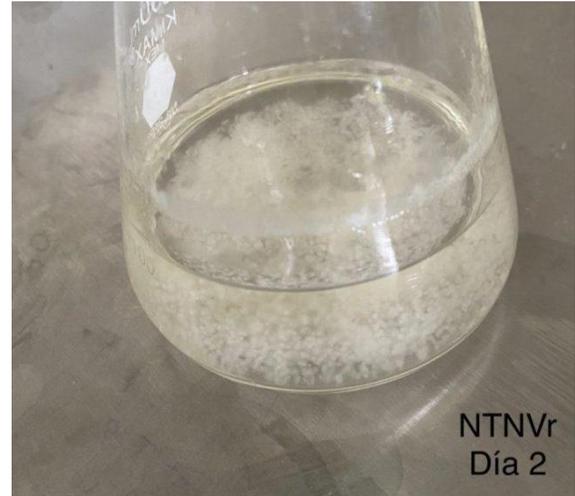


Figura 9. Cepa *Aspergillus flavus* en fermentación sumergida, 48 hrs después del inóculo.

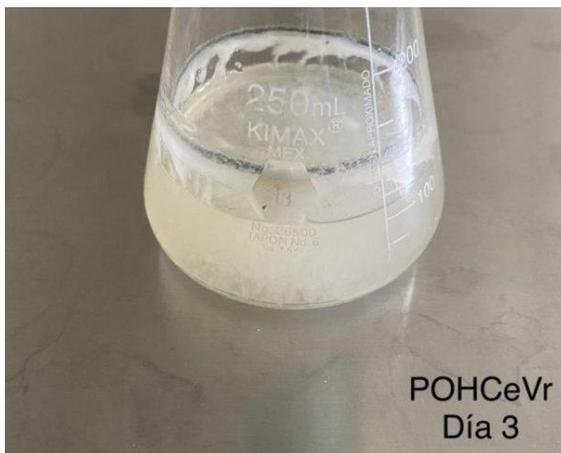


Figura 10. Cepa *Aspergillus fumigatus* en fermentación sumergida, 72 hrs después del inóculo.

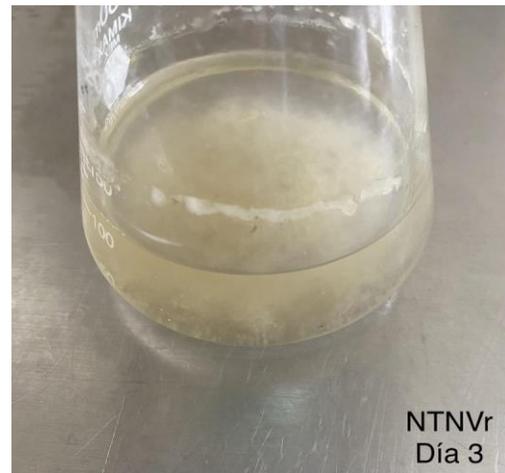


Figura 11. Cepa *Aspergillus flavus* en fermentación sumergida, 72 hrs después del inóculo.

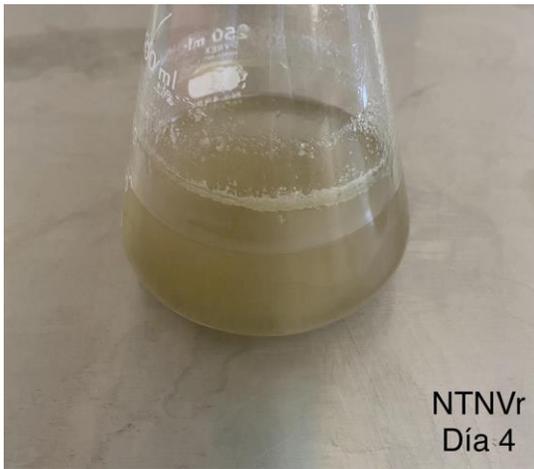


Figura 12. Ceba *Aspergillus flavus* en fermentación sumergida, 96 hrs después del inóculo.

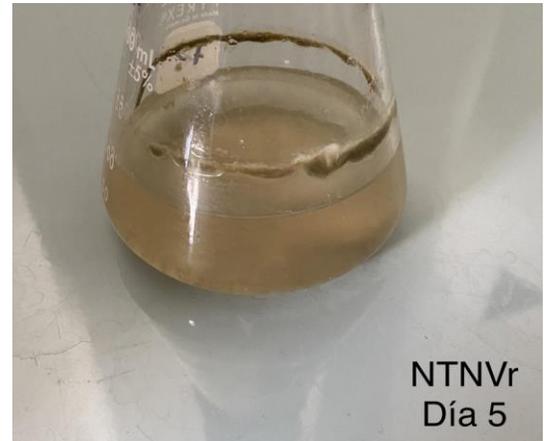


Figura 13. Ceba *Aspergillus flavus* en fermentación sumergida, 120 hrs después del inóculo.

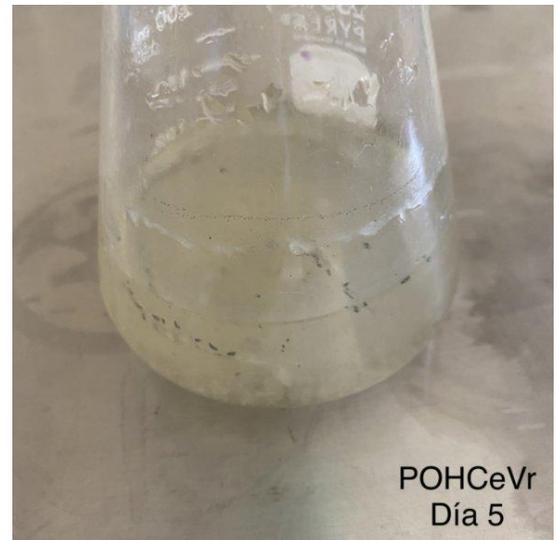


Figura 14. Ceba *Aspergillus fumigatus* en fermentación sumergida, 120 hrs después del inóculo.

### **Cinética de crecimiento**

Como puede observarse en la cinética de crecimiento de fermentación sumergida, para ambas cepas se presentan dos etapas de crecimiento característico de los crecimientos de tipo diaúxico, de las 24-96 horas, y de las 120-144 horas (figura 15). La primera etapa se ve finalizada por el punto máximo de crecimiento. De acuerdo con Lynd y colaboradores (2002), el crecimiento fúngico presenta mayor velocidad de crecimiento en las primeras 96 horas, lo cual permite el ataque a la estructura amorfa de la celulosa microcristalina, permitiendo la formación de microporos y capilares para la penetración de las enzimas celulolíticas en la celulosa haciéndola más fácil de degradar para obtener los azúcares requeridos por los microorganismos.

Posteriormente hay decaimiento en la biomasa, hasta las 120 horas, seguramente debido a la síntesis de las celulasas que degradan la parte cristalina de la celulosa, aunado a la pérdida de nutrientes y a la existencia de enzimas proteolíticas que degradan al hongo, generadas gracias a las características del medio líquido.

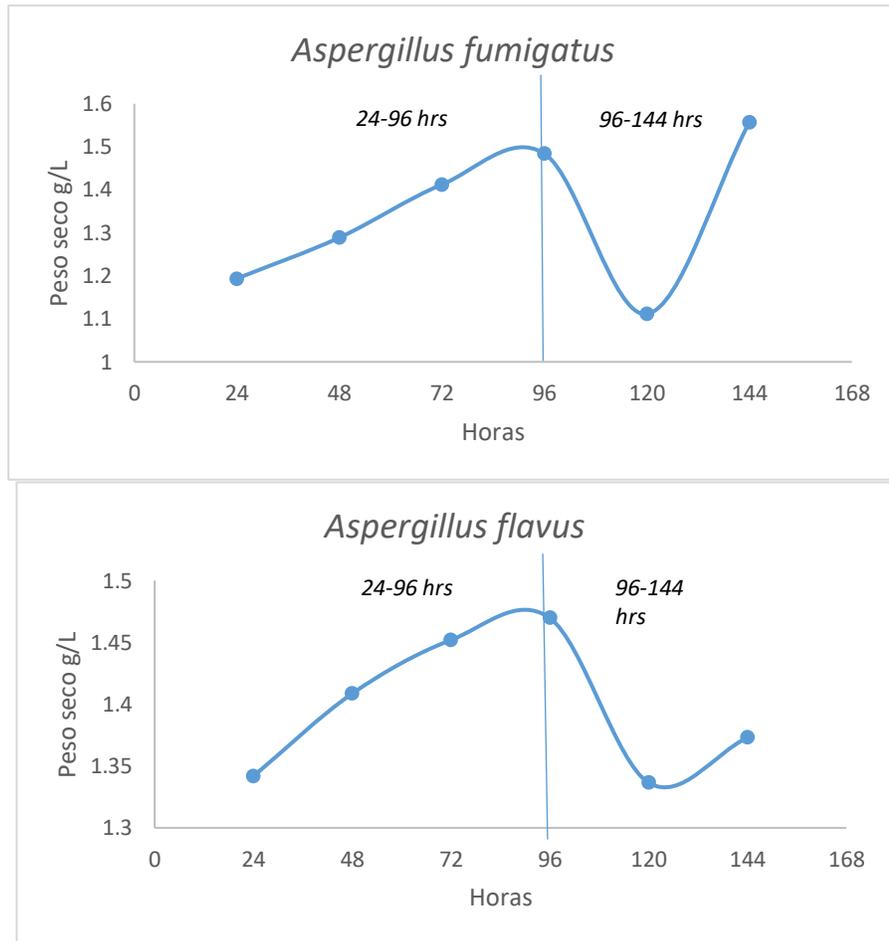


Figura 15. Cinéticas de crecimiento, medido por peso seco (g/L) de biomasa generada, de *Aspergillus fumigatus* y *Aspergillus flavus*.

*Aspergillus flavus* presenta una etapa de 24 a 96 horas, con velocidad de crecimiento de  $0.0041 \text{ g/l} \cdot \text{h}$ , y una velocidad de crecimiento de  $0.018 \text{ g/l} \cdot \text{h}$  para la segunda etapa de 120 a 144 horas, que es mucho mayor en comparación con la primera etapa. Estos resultados coinciden con el perfil diaúxico encontrado por el crecimiento en fermentación sólida de Galván-Quintero (2018) (Tabla 2), pero contradictorios con las velocidades de crecimiento, puesto que en fermentación sólida en la primer etapa (24 a 96 hrs.) se presenta mayor velocidad también para *Aspergillus flavus*. Para *Aspergillus fumigatus* en fermentación sumergida su crecimiento se desarrolla en gránulos compactos (pellets).

En la generación de biomasa, la cepa *A. flavus* presenta mayor concentración de biomasa a las 96 h. ( $0.1484 \text{ g/l}$ ), con respecto a *A. fumigatus* ( $0.1469 \text{ g/l}$ ), (teniendo una diferencia de  $0.0015 \text{ g/l}$ ). De acuerdo al análisis de varianza, se sabe que existe una diferencia significativa entre los pesos secos de *A. fumigatus* y *A. flavus*.

La velocidad de crecimiento de *A. fumigatus* es 1.25 veces más alta que la de *A. flavus* en fermentación sólida (Tabla 2). En fermentación sumergida la velocidad de crecimiento de *A. fumigatus* es 2.27 veces mayor que *A. flavus*, para la primera etapa; en la segunda etapa *A. fumigatus* fue 12 veces más rápido que *A. flavus*. Esto puede explicarse por las características propias de la fermentación sumergida.

Tabla 2. Velocidad de crecimiento y halos de hidrólisis de celulosa en hongos celulolíticos. (Galván Quintero, 2018).

Cepa Fúngica	ETAPA 24-96 horas (E1)		ETAPA 96-144 horas (E2)		24-96 horas	96-144 horas
	Velocidad de crecimiento (mm/hora)	Halo de hidrólisis (mm/hora)	Velocidad de crecimiento (mm/hora)	Halo de hidrólisis (mm/hora)	E1/E2	H1/H2
NTNvr <i>Aspergillus flavus</i>	0.517 bcd	0.341 c	0.172 f	0.393 ba	3.016 a	0.8796 c
POHCeVr <i>Aspergillus fumigatus</i>	0.648 ab	0.61 a	0.277 ced	0.270 ced	2.341 ba	2.2653 a

Esto señala que el crecimiento fúngico no siempre se ve favorecido en fermentación sólida, aun cuando suele presentar rendimientos más altos para el caso de hongos filamentosos, como lo son ambas cepas empleadas en este trabajo. Si bien la fermentación en estado sólido simula el hábitat natural de los hongos filamentosos (Pandey, 2003), esta tiene problemas de difusión y transporte de metabolitos, así como de los requerimientos de algunos hongos de superficie de soporte; frente a la fermentación en estado líquido, que consigue sistemas perfectamente mezclados logrando en cada parte del reactor y en un tiempo dado la misma cantidad de microorganismo, nutrientes, y metabolitos (Gervais y Molin, 2003). La diferencia principal entre las fermentaciones sumergidas y las fermentaciones sólidas reside en su capacidad de mantener una distribución homogénea de solutos, incluyendo el sustrato y el oxígeno requeridos para obtener la energía de crecimiento y mantenimiento, así como de síntesis.

Sin mencionar que en el trabajo de Galván-Quintero (2018) se empleó el método de diámetro de colonia para la cuantificación de biomasa, método que es indirecto, puesto que

no toma en cuenta la densidad de las colonias que incrementa con el pasar del tiempo (Taniwaki *et al*, 2006).

En las figuras 12 y 13 es visible que el contenido de los matraces, para ambas cepas, se ve modificado por la presencia de esporas a las 96 horas, que es cuando se alcanza el punto máximo de crecimiento, esto puede ser resultado de la disminución de nutrientes y sustrato, o también como resultado de la acumulación de sustancias tóxicas propias del metabolismo fúngico (Carlile *et al*, 2001), puesto que se presenta de nuevo un crecimiento fúngico a partir de las 120 horas tanto para *Aspergillus flavus* como *Aspergillus fumigatus* cuando las celulasas son capaces de emplear la parte cristalina de la celulosa restante.

### Producción de Azúcares Reductores

El gráfico correspondiente a la cepa de *A. fumigatus* (figura 16) presenta un decaimiento en la presencia de glucosa a partir de las 48 horas de crecimiento, que es también el punto máximo de concentración. Esto concuerda con los resultados presentados por Contreras-Domínguez y colaboradores (2006), que en el mismo intervalo se obtiene una disminución en la actividad enzimática extracelular de *A.fumigatus* (figura 17).

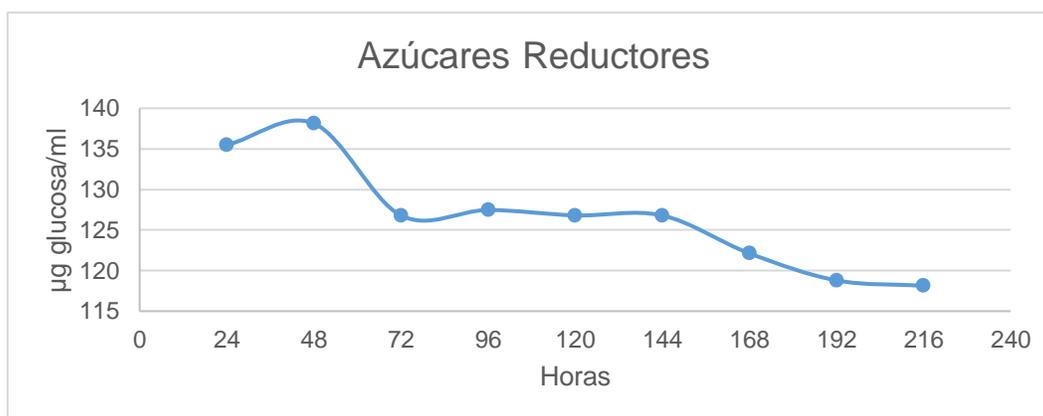


Figura 16. Producción de azúcares reductores por *Aspergillus fumigatus* mediante técnica de Miller (1959).

Con base en los resultados obtenidos por Gomathi y colaboradores (2012), de 144 horas de incubación, se esperaría que *Aspergillus flavus* presente máxima actividad de celulasas a las 72 horas, con 1 (UI/ML) de azúcares reductores, esto al emplear el método descrito

por Miller (1959), así como obtener mayor producción de celulasa a 30°C de incubación y un pH 6. En el mismo estudio se concluye que mientras la temperatura de incubación aumenta se presenta un decremento de la producción enzimática. Del mismo modo que el tamaño del inóculo es determinante en la producción, hallando una generación óptima de celulasa al inocular con 4% de la cepa, tomando como inóculo inicial  $10^6$  esporas/ml. Esto al emplear el medio de cultivo Czapek-Dox modificado utilizando salvado de trigo como fuente de carbono.

En contraste Shobana y Maheswari (2013) obtienen ( $0.54 \pm 0.05$  IU/ml) como mayor producción de celulasa para *Aspergillus fumigatus*, con un pH 8, a 35°C, de igual manera al modificar el medio de cultivo para fermentación sumergida, con salvado de trigo como fuente de carbono. También mediante el método DNS de azúcares reductores.

La figura 17 representa la cinética de crecimiento y actividad celulolítica de *A. fumigatus*, en la cual puede observarse que la producción de celulasas se encuentra asociada al crecimiento. Se observa que se alcanza un máximo de biomasa y actividad a las 36 h, posterior a lo cual se inicia la fase de decaimiento o muerte, y una reactivación del crecimiento a las 72 h, que analógicamente a lo que se observa con las cinéticas de crecimiento resultantes del presente trabajo (Fig.15) la gran diferencia es que el inicio de la segunda etapa esta desfasado en 50 h.

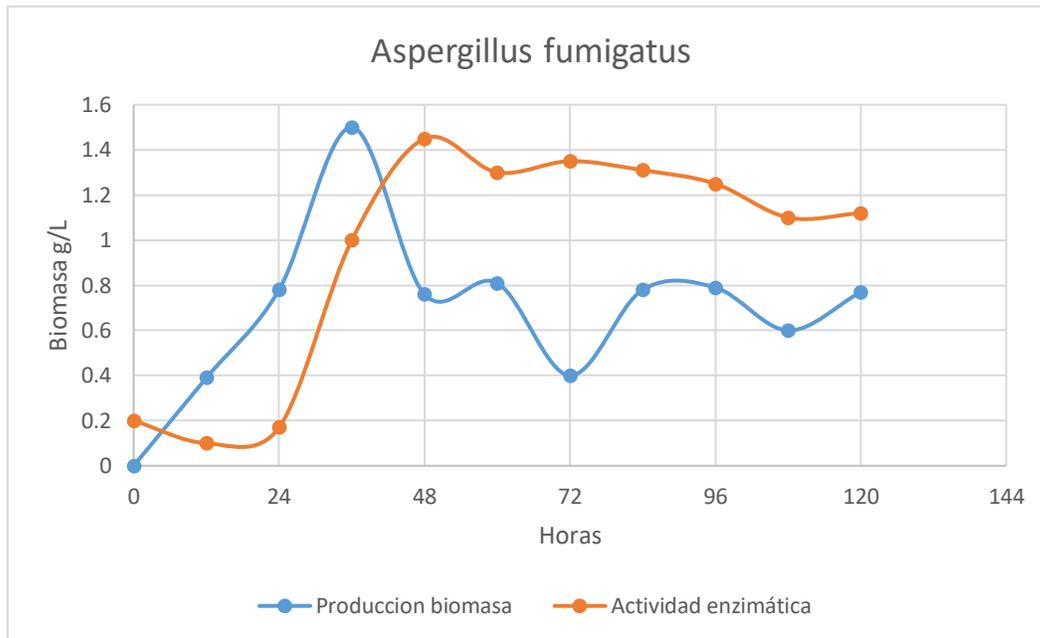


Figura 17. Producción de biomasa y actividad enzimática de *A. fumigatus*. (Contreras-Domínguez *et al*, 2006)

### Producción de proteínas totales

En el gráfico correspondiente a la producción de proteínas totales, (figura 19) se observa que el primer punto corresponde a una concentración de 610  $\mu\text{g}$  proteína/ml en las primeras 24 horas de inóculo que va descendiendo hasta las 96 horas, que contrasta con el gráfico de biomasa generada (figura 13) donde en el mismo intervalo de tiempo ocurre un aumento lineal, esto sugiere que en las primeras 24 horas después de la inoculación del microorganismo se produce una cantidad considerable de proteínas, dentro de las cuales se encontrarían las celulasas encargadas de hidrolizar los enlaces  $\beta$ -1,4-glucosídicos de la celulosa microcristalina presente en el medio líquido. Posteriormente hay un aumento en esta concentración proteica de las 96 a las 144 horas, justamente con el incremento de biomasa en el mismo periodo de tiempo, lo cual podría señalar la secreción de las celulasas que se encargan de degradar la celulosa microcristalina.

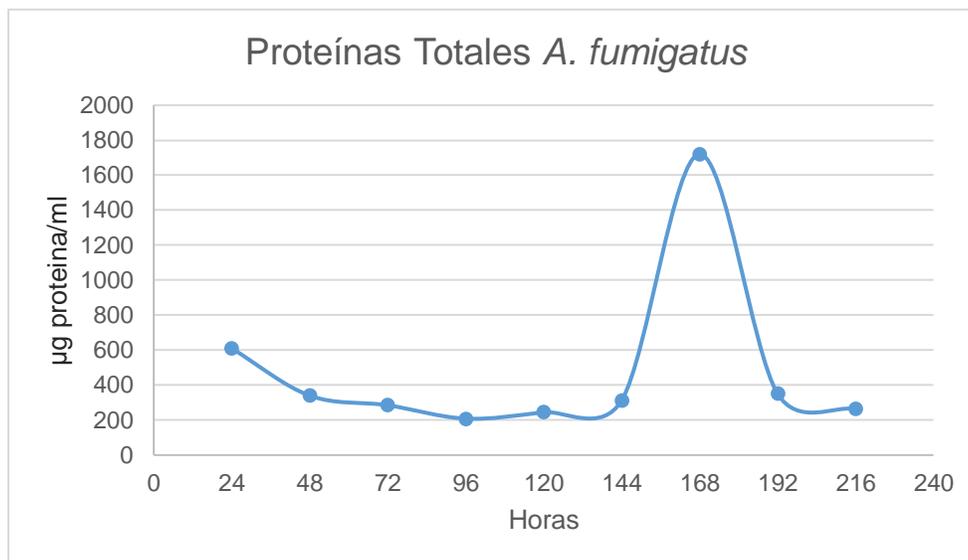


Figura 19. Producción de proteínas totales por *Aspergillus fumigatus* mediante técnica de Lowry (1951).

También es visible un pico de las 144 a las 192 hrs (figura 19), esto posiblemente, debido a que *Aspergillus fumigatus* sintetiza la celulasa durante dicho intervalo.

Cabe resaltar que el punto máximo de producción de proteínas por parte de *A. fumigatus* concuerda con una disminución en la producción de azúcares reductores, a partir de las 144 horas, probablemente porque es en este momento cuando el hongo utiliza la parte cristalina de la celulosa.

## XI. CONCLUSIONES

- Las cinéticas de crecimiento en fermentación sumergida de *Aspergillus flavus* indican que la producción de celulasas está asociada a crecimiento, y se observa un crecimiento diaxúico con una primera etapa de 24 a 96 h, con una concentración de biomasa máxima, a las 96 h, de 0.1484 g/l, y una segunda etapa de 96 a 144 h.
- Las cinéticas de crecimiento en fermentación sumergida de *Aspergillus fumigatus* indican que la producción de celulasas está asociada a crecimiento, y se observa un crecimiento diaxúico con una primera etapa de 24 a 96 h, con una concentración de biomasa máxima, a las 96 h, de 0.1469 g/l, y una segunda etapa de 96 a 144 h.
- *Aspergillus fumigatus* presenta mayor velocidad de crecimiento que *Aspergillus flavus* siendo 2.27 veces más rápido en la primer etapa de las 24 a 96 h y 12 veces más rápido de las 96 a 144 h. Mientras que, de acuerdo a la literatura referenciada,

*Aspergillus flavus* presenta la mayor actividad celulolítica a las 72 h. con 1 (UI/ML) al emplear residuos agrícolas como fuente de carbono.

Los resultados obtenidos en este trabajo pueden ser utilizados como base para futuras investigaciones en la producción de enzimas lignocelulósicas provenientes de *Aspergillus fumigatus*, que puedan llegar a ser más eficientes que las que ya se encuentran en el mercado para la industria, además de su utilización en la degradación de residuos sólidos, lo que podría tener aplicaciones significativas en la industria y en la conservación del medio ambiente.

## **XII. REFERENCIAS**

- Abarca, Ma. Lourdes. (2000). Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. Departament de Sanitat i d'Anatomia Animals Microbiologia, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra.
- Arana, Ainhoa. (2002). Aspectos generales de la biodegradación de la madera: Aplicaciones industriales de las lacasas. *Biotecnología*. Vol. 7. No. 3. P 41,42.
- Aust,S.D.(1995). Mechanisms of degradation by white rot fungi. *Environ Health Perspect*. 103, 59-61.
- Baffi, C., M. T. Dell'Abate, A. Nassisi, S. Silva, A. Benedetti, P. L. Genevini, and F. Adani. (2007). Determination of biological stability in compost: A comparison of methodologies. *Soil Biol. Biochem*. 39: 1284-1293
- Bhat, M.K. (2000). *Biotechnology Advances: Cellulases and related enzymes in biotechnology*. Volume 18. P. 355-383.
- Brigham, C. (2018). *Green Chemistry An Inclusive Approach. Biopolymers: Biodegradable Alternatives to Traditional Plastics*. University of Massachusetts. P. 753-770.
- Brown R.M. (2003). Cellulose structure and biosynthesis: What is in store for the 21st century *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*42, 487-495.
- Carlile MJ, Watkinson SC, Gooday GW. (2001). *Los hongos*. Londres: Prensa Académica. Pág. 588.
- Carrillo, L. (2003). Los hongos de los alimentos y forrajes: aspergillus. In *los hongos de los alimentos y forrajes* (Universida, pp. 44–60). Argentina: ISBN 987-9381-19-X
- Contreras-Domínguez, M., Guyot, S., Marnet, N., Le Petit, J., Perraud-Gaime, I., Roussos, S., Augur, C. (2006). Degradation of procyanidins by *Aspergillus fumigatus*: Identification of a novel aromatic ring cleavage product. *Biochimie*.
- Cowling, E. B. (1975). Physical and chemical constraints in the hydrolysis of cellulose and lignocellulosic materials. *Biotechnol Bioeng Symp*. 163-81.
- Delfín-Alcalá, I., DuránDe-Bazúa, C. (2003). Biodegradación de residuos urbanos lignocelulósicos por *Pleurotus*. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. UNAM. P.38.

- Espadas R. M., Zita-Padilla, M.A. (2003). Manual de Laboratorio de Micología Agrícola. Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Ciudad de México.
- Ejaz, U., Sohail, M., Ghanemi, A. (2021). Cellulases: From Bioactivity to a Variety of Industrial Applications. *Biomimetics*, 6(3), 44. MDPI AG. Recuperado de :<http://dx.doi.org/10.3390/biomimetics6030044>
- Farrel, M., D. L. J. (2009). Critical evaluation of municipal solid waste composting and potential compost markets. *Bioresour. Technol.* 100: 4301-4310.
- García-Espejo, C.N., Mamani-Mamani, M.M., Chávez-Lizárraga, G.A., Álvarez-Aliaga, M.T. (2016). Evaluación de la actividad enzimática del *Trichoderma inhamatum* (BOL-12 QD) como posible biocontrolador. *Journal of the Selva Andina Research Society*, 7(1), 20-32. Recuperado de [http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2072-92942016000100004&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2072-92942016000100004&lng=es&tlng=es).
- Galván-Quintero, B. (2018). Aislamiento, purificación y caracterización de actividad celulolítica de hongos de corteza de *Pinus hartwegii*. Universidad Autónoma del Estado de México. Facultad de Ciencias.
- Gellerstedt, G. & Henriksson, G. (2008). Lignins: Major sources, structure and properties. En M. Naceur Belgacem, & A. Gandini (Edits.), *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources* (págs. 201- 224). Amsterdam: Elsevier B.V.
- Gervais, P., Molin, P. (2003). The role of water in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. 85–101
- Gomathi, D. C., Muthulakshmi, D., Guru K., Ravikumar ,G., Kalaiselvi, M., Uma C. (2012). Submerged fermentation of wheat bran by *Aspergillus flavus* for production and characterization of carboxy methyl cellulase. Department of Biochemistry, Karpagam University, Coimbatore
- Grijalva Vallejos, N. (2013). Degradación de residuos vegetales mediante inoculación con cepas microbianas. *Revista Enfoque UTE* vol.4, núm. 1. Universidad Tecnológica Equinoccial.
- Gutiérrez-Rojas, I. (2013). Mecanismos y regulación de la hidrólisis enzimática de celulosa en hongos filamentosos: casos clásicos y nuevos modelos. *Revista Iberoamericana de Micología*.

- Herrera, L. M., Brañab, V., Franco, L., Castro-Sowinskiab, S. (2019). Validating biochemical features at the genome level in the Antarctic bacterium *Hymenobacter* sp. strain UV11 FEMS Microbiology Letters, Volume 366.
- Himmel, M. E., Ding, S. Y., Johnson, D. K., Adney, W. S., Nimlos, M. R., Brady, J. W. & Foust, T. D. (2007). Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science*. 315, 804-7.
- Heinze, T (2015). Cellulose: Structure and properties. Springer International Publishing Switzerland.
- Index Fungorum. (2022). Search Index Fungorum. En línea: <http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>
- Jaramillo, J. (2002). Guía para el diseño, construcción y operación de rellenos sanitarios manuales. Colombia. CEPIS, Organización Panamericana de la Salud, OMS.
- Kiss, K.G., Encarnación, G.(2006) Los productos y los impactos de la descomposición de residuos sólidos urbanos en los sitios de disposición final. *Gaceta Ecológica* 79: 39-51.
- Ley General Para La Prevención Y Gestión Integral De Los Residuos. Diario Oficial de la Federación. México. 18 de enero de 2021. Artículo 5, sección XXXIII
- Lowry et al.(1951), *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Lynd, L.R, Weimer, P.J., Van, W.H., y Pretorius, I.S. (2002). Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and molecular biology*. 66(3), 506–577.
- Malherbe, S., Cloete, T. (2002). Lignocellulose biodegradation: Fundamentals and applications. *Reviews in Environmental Science and BioVtechnology*, 1(2):105-114. doi: 10.1023/A:1020858910646
- Mandels, M., J. Weber. (1969). Cellulases and their applications. American Chemical Society. P. 391
- Martínez-Anaya, C., Balcazár-López, E., Dantán-González, E., Folch-Mallol, J. (2008). Celulasas fúngicas: Aspectos biológicos y aplicaciones en la industria energética. *Revista Latinoamericana de microbiología. ALAM*. P. 120.
- Martínez Padrón, Hadassa Yuef. Hernández Delgado, Sanjuana. Reyes Méndez, César Augusto y Vázquez Carrillo, Gricelda. (2012). El Género *Aspergillus* y sus Micotoxinas en Maíz en México: Problemática y Perspectivas. *Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional*.

- Miller, G. L. (1959). Determination of reducing sugar by DNS method. *Advances in Biological Chemistry.* , 31, 426- 428.
- Moon R.J., Martini A., Nairn J., Simonsen J., Youngblood J. (2011) Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites. *Chemical Society. Review.*
- Mycobank (2022). MYCOBANK Database. En Línea <http://www.mycobank.org/>
- Pandey, A. (2003). Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal.* Volumen 13: 81-84
- Peters, D. (2006). Carbohydrates for fermentation. *Biotechnology J.* 1, 806-814.
- Pettersen, R. C. (1984). The chemical composition of wood. In *The chemistry of solid wood Advances in chemistry series*, (ed. R. M. Rowell). Washington, D.C.: American Chemical Society.
- Porteros, Héctor. (2017). Estudio de la regulación por pH de la expresión de genes inducidos por la carencia de zinc en *Aspergillus fumigatus*. Departamento de microbiología y genética. instituto de biología funcional y genómica.
- Polko JK, Kieber JJ. The Regulation of Cellulose Biosynthesis in Plants. *Plant Cell.* (2019). Pág. 282-296. doi: 10.1105/tpc.18.00760. Epub 2019 Jan 15.
- Plomion, C., Leprovost, G., Stokes, A. (2001). Wood Formation in Trees. *Plant Physiol.* 127, 1513-1523.
- Rangel-Muñoz,E. (2019). Caracterización morfológica y molecular de aislados nativos de *Aspergillus flavus* eficaces para el control de la contaminación con aflatoxinas del ensilaje de maíz en Aguascalientes. Universidad Autónoma de Aguascalientes. Centro de Ciencias Básicas.
- Rojas-Contreras, L. (2020). Estudio de la incidencia de aflatoxinas, zearaleona y desoxinivalenol en el arroz producido en las principales zonas arroceras de Colombia. Universidad Autónoma de Barcelona. P. 33.
- Sánchez Carmen. (2008). Review Lignocellulosic residues: Biodegradation a bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances* 27:185 – 194.
- Scheller, H. V., & Ulvskov, P. (2010). Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology*, 61, 263-289. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112315>
- Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. Informe del Medio Ambiente. Edición (2018). Disponible en : <https://www.gob.mx/semarnat/acciones-y-programas/residuos-solidos-urbanos-rsu#:~:text=Informaci%C3%B3n%20sobre%20residuos%20s%C3%B3lidos%20urb>

[anos.&text=En%20M%C3%A9xico%20se%20generan%20diariamente,9.63%25%20de%20los%20residuos%20generados.](#)

- Shobana, P. and N. Uma Maheswari. (2013). Production of Cellulase from *Aspergillus fumigatus* Under Submerged and Solid State Fermentation Using Agricultural Waste. International journal of advances in pharmacy, biology and chemistry. Tamil Nadu, India.
- Sotelo, Cruz., Samantha Eugenia, & Ojeda Benítez, Sara (2013). Gestión sostenible de los residuos sólidos urbanos. Revista Internacional de Contaminación Ambiental, 29(3),7-8.[fecha de Consulta 12 de Marzo de 2021]. ISSN: 0188-4999. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=370/37029665017>
- Steffen, W; Crutzen, P; McNeill, J. (2008). The Anthropocene: Are Humans Now Overwhelming the Great Forces of Nature. *Ambio*. 36. 614-21. 10.1579/0044-7447(2007)36[614:TAAHNO]2.0.CO;2.
- Stergiopoulou T., Meletiadis J., Roilides E., Keiner D.E., Schaufele R., Roden M., Harrington S., Dad L., Segal B., Walsh T.J. (2007). Host-Dependent Patterns of Tissue Injury in Invasive Pulmonary Aspergillosis. *Am J Clin Pathol* 349–355
- Thomas, P. (2015). ¿Qué tiene que ver la basura con el cambio climático? Unidiversidad - sitio de noticias UNCUYO. Recuperado de: <https://www.unidiversidad.com.ar/que-tiene-que-ver-la-basura-con-el-cambio-climatico#:~:text=Los%20residuos%20terminan%20en%20basurales,en%20relaci%C3%B3n%20al%20cambio%20clim%C3%A1tico.>
- Vian-Pérez, J., Velasco-Pérez A., García- Herrera T. (2019) Residuos sólidos urbanos: una problemática ambiental y oportunidad energética. CIENCIA UANL. AÑO 22, No.97

