Universidad Autónoma de Sinaloa

Facultad de Ciencias Químico Biológicas

Programa Regional de Posgrado en Biotecnología

Doctorado en Ciencias en Biotecnología

Valorización de *Moringa oleifera*: Bioprocesos para la Producción de Etanol, Enzimas y Alimento Animal

T E S I S

que presenta

MC Raymundo Pérez Ángel

como requisito para

obtener el grado de

Doctor en Ciencias en Biotecnología Ambiental

Director de Tesis

Dr Ignacio Contreras Andrade

Dra Claudia Castro Martínez

Culiacán de Rosales, SIN, MEX **Febrero 2021**

Presentación

Los trabajos de investigación que dieron lugar a la presente tesis, titulada **“Valorización de *Moringa oleifera*: Bioprocesos para la Producción de Etanol, Enzimas y Alimento Animal”** se llevaron a cabo en el “Laboratorio de Biocombustibles”, Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa, en la “Unidad Avícola Experimental”, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Sinaloa y en el “Laboratorio de Biocombustibles”, Centro de Investigaciones Interdisciplinarias para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR), Instituto Politécnico Nacional (IPN), Unidad Sinaloa. Como Directores de Tesis participaron el Dr Ignacio Contreras Andrade y la Dra Claudia Castro Martínez y como Asesores Académicos el Dr Lorenzo Antonio Picos Corrales, Dra Bianca Anabel Amézquita López, Dra Johana Marcela Soto Beltrán y Dr José Pablo Ruelas Leyva. Este trabajo de investigación forma parte del proyecto integral **“Tecnologías para el Cultivo, Manejo Poscosecha, Producción de Biocombustibles y Coproductos de moringa en México”,** Proyecto Interinstitucional Universidad Autónoma de Sinaloa / CIIDIR-IPN Unidad Sinaloa, financiado por el Fondo Sectorial SAGARPA-CONACYT, clave 175519.

Agradecimientos

Agradezco a las siguientes personas que hicieron posible que este trabajo de investigación llegara a buen término:

Al Dr. Ignacio Contreras Andrade por tenerme la confianza y darme su apoyo y amistad durante el proceso de la presente investigación. A la Dra. Claudia Castro por sus invaluables orientaciones y apoyos durante la realización del presente trabajo, siendo además codirectora de este proyecto de investigación, así como por su amistad sincera. A la Dra. J. Marcela Soto Beltrán por su desinteresada ayuda y amistad. A la Dra. Bianca A. Amézquita López, por el apoyo y colaboración en este proyecto y durante mis estudios. Al Dr. José Pablo Ruelas Leyva, por su invaluable ayuda en la revisión de este manuscrito y por sus sugerencias y participación en el proyecto general de investigación sobre moringa del cual es parte este trabajo. Al Dr. Jesús José Portillo y el MC Carlos Bell Castro por su asesoría, apoyo y por facilitar las instalaciones de la unidad avícola experimental donde se realizaron parte de los experimentos. Al Dr. Cuauhtémoc Reyes Moreno. Sin su apoyo quizá no hubiera sido posible la culminación de este trabajo. Al Dr. Ricardo Valenzuela Garza del IPN, quien me orientó sobre la identificación morfológica de hongos. A mis compañeros de laboratorio y estudiantes, los que además de brindarme su amistad, participaron activamente en el desarrollo de los muchos trabajos que dieron lugar a la presente tesis: Manuel Fonseca, Yesmith Santos, Marahí Pérez Tamayo, Thelma Arce, Milagros Monteón, Karely Urías, Maricarmen Rodríguez, Alfonso Altamirano, Gustavo Cañedo, Erik Sosa, Dulce Medina, Denisse Norzagaray y Miguel Cantabrana.

Al Fondo Sectorial de Investigación en Materias Agrícola, Pecuaria, Acuacultura, Agrobiotecnología y Recursos Fitogenéticos y al CONACYT por su apoyo económico a través del recurso otorgado al proyecto clave 175519, del cual formó parte el presente trabajo de investigación.

A mi esposa Marina y mis hijos Nayeli, Luis y Marahí que me apoyaron siempre y me toleraron con amor durante los momentos difíciles de esta etapa de mi vida. A mi madre que siempre me impulsó a alcanzar grandes metas.

A Dios, que me dio la vida, su protección y fortaleza en todo momento.

INDICE GENERAL

		Pág.
	INDICE DE CUADROS	11
	INDICE DE FIGURAS	17
I	**RESUMEN**	18
	ABSTRACT	21
II	**INTRODUCCION**	23
III	**REVISIÓN DE LA LITERATURA**	30
	A RENDIMIENTOS Y COMPOSICIÓN QUÍMICA DE BIOMASA DE *M. oleifera*	30
	1 Antecedentes	30
	2 Morfología	32
	3 Ecología	34
	4 Crecimiento y rendimiento agronómico	34
	5 Partes de la planta y usos	31
	a Hojas	35
	b Ramas	36
	c Semillas	36
	6 Aptitud de *M. oleifera* para biorrefinería	37
	B USO DE HONGOS PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL	40
	1 Antecedentes	40
	2 Bioetanol de primera generación	40
	3 Bioetanol de segunda generación	43
	a Pretratamiento	45
	1) Métodos físicos	45
	a) Trituración	45
	b) Extrusión	47
	c) Pirólisis	47
	d) Ultrasonido	48
	e) Pretratamiento térmico	48
	f) Explosión de vapor	48
	g) Agua líquida a temperatura alta	48
	2) Métodos fisicoquímicos	49
	a) Explosión de fibra con amoníaco (AFEx)	49
	b) Explosión con CO2	49
	3) Métodos químicos	50
	a) Hidrólisis ácida	50
	b) Oxidación húmeda	50
	c) Ozonólisis	50

	d) Hidrólisis alcalina	51
	e) Solventes orgánicos (Organosolv)	51
	4) Pretratamientos biológicos	52
	5) Solventes orgánicos y hongos	53
	b Hidrólisis enzimática y fermentación	53
	1) Características de la hidrólisis enzimática	53
	2) Procesos utilizados (SHF, SSF, SSCF y CBP)	54
	4 Fuentes de biomasa lignocelulósica	57
	5 Composición de la lignocelulosa	61
	a Celulosa	62
	b Hemicelulosa	65
	c Lignina	66
	d Otros componentes	67
	6 Componentes de la lignocelulosa en plantas y residuos	67
	7 Enzimas lignocelulolíticas	69
	8 Mecanismos de degradación enzimática de la lignocelulosa	69
	a Celulasas	70
	1) Endoglucanasas	71
	2) Exoglucanasas	73
	3) b-glucosidasas	73
	b Hemicelulasas	73
	c Ligninasas	76
	1) Lignino peroxidasa (LIP)	78
	2) Manganeso peroxidasas	80
	3) Peroxidasa versátil	83
	4) Lacasas	85

	C PRODUCCIÓN DE LACASA DE *T. polyzona* EN *M. oleifera*	88
	1 Producción de enzimas a escala industrial	88
	2 Tipos de fermentación	89
	a Fermentación en medio sumergido	89
	b Fermentación en estado sólido	89
	3 Selección del tipo de fermentación	90
	4 Sustratos agroindustriales	91
	5 Optimización de las condiciones de cultivo	93
	a Tiempo de incubación	97
	b pH inicial	98
	c Temperatura	98
	d Concentración de inóculo	99
	e Fuente y concentración de carbono	100
	f Fuente y concentración de nitrógeno	101
	g Agitación	103
	D USO DE RESIDUOS DE *M. oleifera* EN LA ALIMENTACIÓN ANIMAL	104
	1 Antecedentes	104
	2 Contenido nutrimental de *M. oleifera*	106
	3 *M. oleifera* en la alimentación animal	109
	a Rumiantes	109
	b Monogástricos	110
	c Peces	111
	d Aves	111
	1) Gallinas ponedoras	111
	2) Aves de engorda	112
IV	**OBJETIVOS**	114
	A OBJETIVO GENERAL	114
	B OBJETIVOS ESPECÍFICOS	114
V	**MATERIALES Y MÉTODOS**	118
	A CRECIMIENTO, RENDIMIENTOS Y ANÁLISIS QUÍMICO DE *M. oleifera*	118
	1 Ubicación del área experimental	118

	2 Material biológico	118
	3 Material agronómico	118
	4 Medición de crecimiento de árboles	118
	5 Cuantificación de la biomasa	120
	6 Análisis proximal de material lignocelulósico	120
	7 Perfil de ácidos grasos del aceite	121
	a Extracción de aceite	123
	b Cuantificación cromatográfica	123
	8 Perfil lignocelulósico de tallos	124
	a Extraíbles	124
	b Holocelulosa	124
	c Celulosa	125
	d Lignina	125
	9 Diseño y análisis experimental	126
	B PRODUCCIÓN ENZIMÁTICA Y ETANOL DE HONGOS NATIVOS EN MORINGA	127
	1 Recolección y preparación de material lignocelulósico	127
	2 Recolección de hongos	127
	3 Aislamiento y purificación de hongos	127
	4 Identificación morfológica de hongos basidiomicetos	128
	5 Identificación molecular	128
	a Ascomicetos C6a, C7a y C1502	128
	b Basidiomiceto Coc-1	130
	c Análisis de secuencias de ADN	131
	6 Evaluación cualitativa de producción de enzimas	131
	a Celulasas	131
	b Xilanasas	133
	c Manganeso peroxidasas	133
	d Lacasas	133
	7 Determinación de producción de etanol	133
	a Sacarosa	134
	b Glucosa y xilosa	134
	c Producción de etanol en SMF con *M. oleifera*	134

	1) Fermentación sin *S. cereviseae*	134
	2) Fermentación con *S. cereviseae*	134
	3) Análisis estadístico	135
	8 Cuantificación de actividad lignocelulolítica de hongos nativos en medio sumergido con madera de *M. oleifera*	135
	a Preparación del inóculo	135
	b Fermentación en medio sumergido	137
	c Medición de la actividad enzimática y azúcares reductores	138
	1) Actividad endo β-1,4 glucanasa (CMCasa)	138
	2) Actividad de xilanasa	138
	3) Azúcares reductores	138
	4) Cálculo de actividades celulasa y xilanasa	138
	5) Actividad de MnP	139
	6) Actividad de lacasa	139
	7) Cálculo de la actividad enzimática de MnP y lacasa	140
	8) Diseño y análisis experimental	140
	C OPTIMIZACIÓN DE PRODUCCIÓN DE LACASAS DE *T. polyzona*	142
	1 Optimización mediante el modelo ortogonal de Taguchi	142
	a Condiciones generales	142
	b Optimización de nutrientes	143
	c Análisis del modelo y predicción de valores optimizados	149
	d Validación	149
	2 Deslignificación de madera de moringa	149
	a Deslignificación con extracto enzimático	149
	b Cuantificación de lignina	152
	c Diseño y análisis experimental	152
	D USO DE RESIDUOS DE BIORREFINERÍA DE *M oleifera* EN LA ALIMENTACIÓN DE CODORNICES JAPONESAS	154
	1 Materias primas	154
	2 Preparación de harina hidrolizada de *M. oleifera*	154
	3 Análisis proximal de materias primas y procesadas	155
	4 Formulación de dietas	155
	5 Medición de los parámetros de crecimiento	156

	a Manejo de las aves	156
	b Medición de parámetros de crecimiento	156
	1) Alimento consumido	156
	2) Ganancia de peso (g)	157
	3) Tasa de conversión alimenticia (TCA)	157
	4) Mortalidad	157
	5) Diseño y análisis experimental	157
	6 Rendimientos de canal	157
	a Sacrificio de aves	157
	b Cálculos de rendimientos de canal	158
VI	**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**	160
	A RENDIMIENTOS Y ANÁLISIS DE BIOMASA DE MORINGA	160
	1 Crecimiento aéreo	160
	2 Componentes de la biomasa aérea	160
	3 Análisis proximales	166
	4 Perfil de ácidos grasos de aceite de semilla	170
	5 Perfil lignocelulósico de tallo de moringa	173
	6 Productividad de biomasa lignocelulósica	178
	7 Productividad de macronutrientes de hojas	178
	8 Productividad de macronutrientes de semillas	180
	9 Selección de ecotipos de *M. oleifera* para biomasa y aceite	182
	B PRODUCCIÓN ENZIMÁTICA Y DE ETANOL DE HONGOS NATIVOS EN *Moringa oleifera*	184
	1 Recolección	188
	2 Identificación morfológica	196
	3 Identificación molecular	202
	4 Evaluación cualitativa de enzimas lignocelulolíticas	204
	5 Cuantificación de etanol	204
	a Fermentación de sacarosa	204
	b Fermentación de glucosa y xilosa	204
	c Fermentación en medio sumergido con *M. oleifera*	207
	6 Cuantificación de actividad enzimática y azúcares reductores	211

	a Actividad de celulasa	211
	b Actividad de xilanasa	214
	c Actividad de manganeso peroxidasa	217
	d Actividad de lacasa	218
	e Azúcares reductores	224
	7 Selección de cepa para el pretratamiento	227
	C OPTIMIZACIÓN DE CONDICIONES DE CULTIVO DE *T. polyzona* COC-1 PARA LA PRODUCCIÓN DE LACASAS	228
	1 Optimización de pH, temperatura y cobre	228
	2 Optimización de nutrientes	234
	3 Análisis del modelo y predicción	234
	4 Validación	241
	5 Capacidad de remoción de lignina	246
	D USO DE RESIDUOS DE BIORREFINERÍA DE *M oleifera* EN LA ALIMENTACIÓN DE CODORNICES JAPONESAS	255
	1 Rendimientos de harina desgrasada de semilla de moringa	255
	2 Rendimientos del fermentado de biomasa de moringa	255
	3 Análisis proximales de materia primas	258
	4 Composición de las dietas de iniciación y finalización	258
	5 Parámetros de crecimiento	258
	a Peso vivo	258
	b Ganancia de peso	261
	c Conversión alimenticia	263
	d Mortalidad	263
	6 Rendimientos de canal	265
	a Pesos de canal fría y caliente vivo	265
	b Rendimientos de canal fría y caliente	266
	c Absorción de agua	266
VII	**CONCLUSIONES**	268
VIII	**LITERATURA CITADA**	271
	Abreviaturas	303
	Anexos	305

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Descripción	Pág.
1	Principales métodos de pretratamiento de lignocelulosa	46
2	Bioprocesos para la producción de etanol de lignocelulosa	58
3	Clasificación de materias lignocelulósicas por su origen	60
4	Composición de lignocelulosa de diversos orígenes	68
5	Microorganismos utilizados industrialmente en la producción de endoglucanasas	72
6	Hongos de pudrición blanca (PB) y descomponedores de la basura del suelo (SL) productores de manganeso peroxidasa (MnP) en estado líquido (L) y sólido (S)	84
7	Sustratos de bajo costo utilizados para la producción de enzimas por varios hongos y bacterias	92
8	Condiciones óptimas de cultivo para especies de bacterias para la producción de enzimas	94
9	Condiciones óptimas de cultivo para especies de hongos en la producción de enzimas	95
10	Comparación nutrimental de *M. oleifera* con otras fuentes alternativas de forraje	105
11	Composición nutricional de hojas secas y semilla de *M. oleifera*	107
12	Contenido de factores antinutricionales de moringa	108
13	Especies de hongos utilizadas para la cuantificación de la actividad lignocelulolítica en madera de moringa	135
14	Diseño central compuesto utilizado para optimizar pH, temperatura y concentración de CuSO4 (mM) en el crecimiento de Coc-1	144
15	Niveles asignados de los factores de cultivo	147
16	Tratamientos del arreglo ortogonal de Taguchi utilizado	148
17	Composición de enzima y tiempo de incubación de tratamientos de deslignificación de madera de *M. oleifera*	151
18	Talla de árbol y diámetro de tallo al dia 180 de la siembra de seis ecotipos de *Moringa oleifera*	161

19	Componentes del rendimiento promedio por árbol de la biomasa para plantas de 16 meses de seis ecotipos de *M. oleifera*	164
20	Composición proximal de tallo, hoja y semillas de seis ecotipos de *M. oleifera*	167
21	Ácidos grasos detectados por CG del aceite de semilla de cuatro ecotipos de *M. oleifera*	172
22	Proporciones de celulosa, hemicelulosa y lignina de la parte libre de extraíbles de tallo de seis ecotipos regionales de *M. oleifera*	174
23	Productividad calculada por árbol y por hectárea de celulosa, hemicelulosa, lignina y holocelulosa de tallos de seis ecotipos de *M. oleifera* al momento de la primera cosecha de semilla	177
24	Productividad calculada por árbol y por hectárea de lípidos, Proteínas y carbohidratos de hojas de seis ecotipos de *M. oleifera* a los 16 meses	179
25	Productividad de proteínas y lípidos por árbol y por hectárea de las semillas descascaradas de seis ecotipos de *M. oleifera*	181
26	Cepas fúngicas recolectadas de material lignocelulósico en diferentes sitios del Estado de Sinaloa (primera etapa)	185
27	Cepas de basidiomicetes de la segunda etapa de recolección en diferentes sitios del Estado de Sinaloa	189
28	Mayores similitudes de cepas fúngicas aisladas obtenidas por BLAST-N (NCBI) usando el algoritmo Megablast de secuencias ITSrDNA	201
29	Reacciones enzimáticas cualitativas de hongos colectados	203
30	Máxima concentración, rendimiento y productividad de etanol en glucosa y xilosa de cultivos seleccionados de hongos ascomicetes	206
31	Concentración de etanol, rendimiento y productividad de hongos seleccionados y en consorcio con *S. cerevisiae* en cultivo de medio sumergido con lignocelulosa *M. oleifera*	208
32	Actividad de celulasas (CMCasas) de cepas de hongos autóctonos en medio sumergido conteniendo madera de *M. oleifera*	212

33	Actividad de xilanasas de cepas de hongos autóctonos y adquiridos en medio sumergido conteniendo madera de *M. oleifera*	215
34	Actividad de manganeso peroxidasa de cepas nativas y adquiridas cultivadas en medio sumergido con madera de *M. oleifera*	219
35	Actividad de lacasa de cepas nativas y adquiridas cultivadas en medio sumergido con madera de *M. oleifera*	221
36	Producción de azúcares reductores por cepas de hongos autóctonos en medio sumergido con madera de *M. oleifera*	225
37	Actividad de lacasa de *T. polyzona* Coc-1 a las 168 h en medio sumergido con *M. oleifera* en un diseño de superficie de respuesta para los factores pH, temperatura y concentración molar de cobre	229
38	Regresión de superficie de respuesta: AE de lacasas de *T. polyzona* Coc-1 a las 168 h vs. pH, temperatura y concentración molar de cobre	230
39	Valores pronosticados óptimos de producción de lacasas por *T. polyzona* obtenidos del modelo de superficie de respuesta a las 168 h	233
40	Actividad de lacasa de *T. polyzona* Coc-1 en medio sumergido con *M. oleifera* y otros nutrientes en un modelo de Taguchi	235
41	ANDEVA del modelo general lineal para la actividad de lacasa utilizando diferentes nutrientes a los 11 días de crecimiento	236
42	Orden de contribución de factores utilizando el valor Delta	238
43	Niveles óptimos de factores y rendimiento predicho de lacasa	242
44	Cinética de producción de lacasa (U L-1) del tratamiento optimizado y del testigo (tratamiento 12)	244
45	Deslignificación de tallos de *M. oleifera* con extracto enzimático	248
46	ANDEVA del modelo general lineal para la remoción de lignina de los tratamientos utilizado	251
47	Modelo de regresión para la remoción de lignina de madera de *M. oleifera*	252

48	Composición proximal de las materias primas a base de moringa utilizadas	257
49	Composición de las fórmulas de las dietas de iniciación (1) y finalización (2) (g/100g)	259
50	Contenido nutrimental calculado de las dietas de iniciación y finalización (g/100 g)	260
51	Peso vivo individual por semana de codornices alimentadas con diferentes dietas conteniendo *M. oleifera*	261
52	Ganancia de peso, alimento consumido, conversión alimenticia y mortalidad durante las etapas de iniciación (0-14 d), finalización (15-35 d) y acumuladas (0-35 d) de codornices japonesas	263
53	Peso y rendimiento de canal y absorción de agua de codornices japonesas alimentadas con diferentes dietas conteniendo *M. oleifera*	268

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig.	Descripción	Pág.
1	Frutos (a), semillas (b) y flores (c) de *M. oleifera*	33
2	Algunas posibilidades de transformación de partes de *M. oleifera* en una probable biorrefinería	39
3	Diagrama de proceso para la producción de bioetanol de primera generación	42
4	Etapas del proceso de producción de bioetanol de segunda generación	44
5	Configuraciones de procesamiento de lignocelulosa para su conversión en etanol. SHF, hidrólisis y fermentación sepradas; SSF, sacarificación y fermentación simultáneas; SSCF, sacarificación y cofermentación simultáneas; CBP, bioproceso consolidado	55
6	Estructura de la celulosa	63
7	Estructuras de la celulosa, hemicelulosa y lignina	64
8	Estructura de xilano mostrando los sitios que son atacados por las enzimas xilanolíticas específicas para lograr la hidrólisis completa de sus constituyentes	75
9	LiP de *Phanerochaete chrysosporium*. (a) Estructura terciaria de LiP: azul, proximal, dominio C-terminal; verde, distal, dominio N-terminal; grupo hemo es indicado como barras con esferas amarillas. (b) Detalles del entorno hemo	79
10	MnP de *Phanerochaete chrysosporium*. (a) Estructura terciaria, azul, proximal, dominio C-terminal; verde, distal, dominio N-terminal; grupo hemo es indicado como barras con esferas amarillas. (b) sitio activo de MnP	81
11	Ciclo catalítico de la MnP.	82
12	Estructura molecular y sitio activo de lacasa	86
13	Distribución de los árboles de los seis ecotipos utilizados en el lote experimental	119
14	Estrategia experimental para comparación de crecimiento y productividad de ecotipos de *M. oleifera*	127
15	Ubicaciones de los muestreos de hongos y biomasa de moringa	130

16	Estrategia experimental para la evaluación de la capacidad lignocelulolítica y etanologénica de cepas de hongos regionales	141
17	Incubación de Coc-1 para la optimización de nutrientes	146
18	Estrategia experimental para la optimización de la producción de lacasas de *T. polyzona*	153
19	Estrategia experimental para la evaluación de la inclusión de residuos fermentados de biomasa y torta de prensado de semilla de *M. oleifera* en el crecimiento de codornices japonesas	159
20	Evolución del crecimiento de seis ecotipos de *M. oleifera* hasta los 180 días, (a) Altura de árbol y (b) diámetro del tallo	162
21	Altura y diámetro de tallo de árboles de seis ecotipos regionales de *M. oleifera* a los 180 días de crecimiento	163
22	Perfil lignocelulósico de tallo de ecotipos regionales de *M. oleifera*	175
23	Rendimientos por hectárea (kg) de los principales componentes químicos de tallo, hoja y semilla de ecotipos de *M. oleifera* a los 16 meses	183
24	Cultivo en PDA y vista al microscopio (40X) de hongos ascomicetes de la primera etapa de recolección	186
25	Carpóforos, cultivo en PDA y vista al microscopio (40X) de hongos basidiomicetes de la primera etapa de recolección	187
26	Hongos basidiomicetes de la segunda etapa de recolección. En la primera columna se muestran los basidiocarpos; en la segunda el cultivo en PDA; en la tercera, estructuras vegetativas y/o esporas características	190
27	Producción de etanol en sacarosa de hongos regionales aislados	205
28	Cinéticas de producción de azúcares reductores, etanol, CMCasa y crecimiento celular de *S. cerevisiae*, de cepas C3a (a), C3d (b), C6a (c), C7a (d), C1502 (e) y consorcio con todas las anteriores (f) en medio sumergido con madera de *M. oleifera*	209
29	Cinética de la actividad de CMCasas de cepas de hongos autóctonos y adquiridos, en medio sumergido conteniendo *M. oleifera*	213
30	Cinética de la actividad de xilanasas de cepas de hongos autóctonos y adquiridos, en medio sumergido conteniendo *M. oleifera*	216

31	Actividad de MnP (U L-1) de 14 cepas aisladas de hongos de hongos autóctonos y adquiridos, en medio sumergido conteniendo madera de *M. oleifera*	220
32	Actividad de lacasa de cepas de hongos nativas y adquiridas, en medio sumergido con lignocelulosa de *M. oleifera*	222
33	Producción de azúcares reductores de cepas de hongos en medio sumergido con lignocelulosa de *M. oleifera*	226
34	Gráfica de superficie de respuesta para la actividad de lacasa (a) pH*Temperatura; (b) pH*[Cu] y (c) Temperatura*[Cu]	232
35	Gráfica de efectos principales sobre medias de los tratamientos	239
36	Interacciones entre factores para la producción de lacasas de *T. polyzona* en medio sumergido	242
37	Cinética para la producción de lacasas de *T. polyzona* Coc-1 a las condiciones óptimas predichas comparadas con el mejor tratamiento de la etapa previa (Tratamiento 12)	245
38	Gráfica de contorno para los factores Tiempo*Lacasas en el pretratamiento de madera de *M. oleifera* con lacasa de *T. polyzona*	250
39	Gráfica de dispersión de lignina removida (%) vs. Tiempo en función de la concentración de lacasa utilizada	253
40	Balance de materia para la producción del residuo fermentado	256
41	Canales de codorniz alimentadas con dietas conteniendo (a) semilla desgrasada por prensado de M. oleifera (SMOD); (b) harina de M. oleifera no tratada (HMNT); (c) harina de M. oleifera hidrolizada y fermentada (HMHF) y (d) testigo (TEST)	265

I RESUMEN

La sección A consiste en un estudio cuyo objetivo fue seleccionar entre ecotipos de *Moringa oleifera* introducidos al estado de Sinaloa, a los más aptos para la producción de biomasa, semilla y aceite, y caracterizarlos químicamente. Para ello, se estableció un huerto con 288 árboles de 6 ecotipos de *M. oleifera* (MO) distribuidos al azar. A los 16 meses de edad se determinaron los rendimientos agronómicos de tallos, hojas y semillas, la composición proximal de cada fracción, el perfil lignocelulósico de tallos y el contenido de ácidos grasos del aceite de la semilla. Se observaron diferencias significativas entre ecotipos para todos los parámetros, encontrándose que “Sinaloa” produjo la mayor cantidad de semilla y “Mojolo” los mayores rendimientos de tallos y hojas. El análisis proximal mostró la mayor concentración de lípidos en semilla (48.2%) y de ácido oleico en el aceite del ecotipo “Elota”. El perfil de los componentes de la lignocelulosa de tallos indicó que “Sonora”, “Elota” y “Sinaloa” tienen la mayor proporción de holocelulosa. “Sinaloa” obtuvo los más altos rendimientos por hectárea de semilla y aceite, mientras que, de la hoja, el ecotipo “Mojolo” logró la más alta productividad por hectárea de proteínas, lípidos y carbohidratos. El ecotipo “Mojolo” fue el mejor para la producción de biomasa y “Sinaloa” para semilla y aceite. El ecotipo “Elota” presentó los mayores porcentajes de aceite en la semilla. Se sugiere la experimentación con cruzas entre ellos para buscar mejoras genéticas.

La sección B de este trabajo consistió en la búsqueda de alternativas biológicas con potencial de utilizarse en las etapas de obtención de etanol de segunda generación a partir de madera de *M. oleifera*, utilizando cepas de hongos ascomicetos y basidiomicetos nativos del estado de Sinaloa como productores de enzimas. Para ello se realizó una colecta, aislamiento y purificación de hongos en diferentes puntos del Estado de Sinaloa identificándose taxonómicamente. Los hongos aislados se preseleccionaron cualitativamente por su capacidad de degradar celulosa, hemicelulosa y lignina en cultivo en placa. Los hongos con mayor capacidad enzimática se sometieron a un estudio comparativo mediante

cultivo en medio sumergido con lignocelulosa de moringa, determinándose cuantitativamente el tipo y cantidad de enzimas producidas. Se seleccionaron e identificaron molecularmente las cepas con mayor capacidad de producción de etanol y de actividad de lacasa, siendo éstos, *Fusarium equiseti, F. verticillioides y Mucor circinelloides* como productores de etanol, y *Trametes polyzona* como productor de lacasa.

En la Sección C se aplicó la metodología de superficie de respuesta para determinar el pH y temperatura y concentración de cobre óptimas para la producción de lacasa del hongo seleccionado *Trametes polyzona* Coc-1. Se desarrolló y optimizó un medio de cultivo para la producción de enzimas lignocelulolíticas del hongo seleccionado para lacasas por fermentación en medio sumergido (FMS) utilizando un diseño ortogonal de Taguchi, variándose el porcentaje de ocho fuentes de nutrientes y minerales: porcentaje de lignocelulosa de *M. oleifera*, $(NH_4)_2SO_4$ como fuente de nitrógeno no proteico, extracto de levadura como fuente de nitrógeno proteico, KH_2PO_4 como amortiguador de pH y fuente de fósforo y los minerales $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ y $MnSO4 \cdot H_2O$ como fuentes de magnesio, cobre y manganeso respectivamente. Las condiciones óptimas de pH, temperatura y concentración de cobre determinadas por MSR fueron 5.5, 34 °C y 0.93 mM, respectivamente. Mediante la optimización por la metodología de Taguchi, se obtuvo una actividad de lacasas de 74139 U L^{-1} a los 11 días, siendo la concentración de extracto de levadura el factor más influyente.

En la Sección D, con el objetivo de valorizar dos subproductos proteínicos de biorrefinería de *Moringa oleifera*, se probó el efecto de la inclusión en la dieta de semilla desgrasada por prensado (SMOD) y hoja fermentada por *Mucor circinelloides-Saccharomyces cerevisiae* (HMHF) en codornices japonesas y se comparó con hoja no tratada (HMNT) y una dieta tradicional (TEST). Para ello, 180 codornices fueron alimentadas durante 35 días con dietas formuladas para el período de iniciación (1 a 14 d) y de crecimiento (15 a 35 d). Durante la fase de iniciación y en el acumulativo final, la dieta con HMNT presentó las menores ganancias de peso. SMOD obtuvo los mayores promedios de peso vivo final

(244.42 g), ganancia de peso (231.58 g) y menor tasa de conversión alimenticia (2.95). Durante la fase de crecimiento HMNT presentó la mortalidad más alta. SMOD obtuvo los pesos más altos de canal caliente y fría (146.41 y 159.31 g). HMNT presentó los porcentajes más altos de canal caliente y fría (62.7 y 67.7%). Las harinas de semilla desgrasada por prensado y de hoja hidrolizada de *M. oleifera* pueden usarse a los niveles de inclusión probados, en dietas para alimentar codornices japonesas sin efectos negativos en su crecimiento.

ABSTRACT

Section A consists of a study whose objective was to select, among the ecotypes of *Moringa oleifera* introduced to Sinaloa, the most suitable for biomass, seed, and oil production, and chemically characterize them. An orchard was established with 48 trees of 6 ecotypes of *M. oleifera* distributed randomly. At 16 months of age, the agronomic yields of stems, leaves, and seeds, the proximal composition of each fraction, the lignocellulosic profile of stems and the fatty acid content of the seed oil were determined. Significant differences were found between ecotypes for all parameters, highlighting “Sinaloa” who produced the highest weight of seed, and “Mojolo” the highest yields of stems and leaves. The proximal analysis showed the highest lipid content in seed (48.2%) and oleic acid in the oil of the “Elota” ecotype. The profile of the lignocellulose components of stems indicated that “Sonora”, “Elota” and “Sinaloa” have the highest proportion of holocellulose. “Sinaloa” obtained the highest yields per hectare of seed and oil, while, from the leaf, the “Mojolo” ecotype achieved the highest productivity per hectare of proteins, lipids, and carbohydrates. “Mojolo” ecotype was the best for biomass production, and “Sinaloa” for seed and oil. The “Elota” ecotype presented the highest percentages of oil in the seed. Cross-experimentation between them is suggested to look for genetic improvements**.**

Section B of this work consisted of the search for biological alternatives with the potential to be used in the stages of obtaining second-generation ethanol from *M. oleifera* wood, using strains of ascomycetes and basidiomycetes native to the state of Sinaloa as enzyme producers. For this, a collection, isolation, and purification of fungi were carried out in different parts of the State of Sinaloa, identifying them taxonomically. Isolated fungi were qualitatively preselected for their ability to degrade cellulose, hemicellulose, and lignin in plate culture. The fungi with the highest enzymatic capacity were subjected to a comparative study on submerged cultivation with moringa lignocellulose, quantitatively determining the type and quantity of produced enzymes. The fungic selected strains with the highest ethanol production were molecularly identified as *Fusarium equiseti* (C6a)*,*

F. verticillioides (C7a) and *Mucor circinelloides* (C1502), while *Trametes polyzona* (Coc-1) was selected for its high laccase activity.

In Section C, the response surface methodology was applied to determine the optimal pH and temperature and copper concentration for laccase production from the selected fungus *Trametes polyzona* Coc-1. A submerged medium fermentation (SMF) was developed and optimized for laccase production of *T. polyzona* using an orthogonal Taguchi design, varying the percentage of eight sources of nutrients and minerals: percentage of lignocellulose of *M. oleifera*, $(NH_4)_2SO_4$ as a non-protein nitrogen source, yeast extract as a protein nitrogen source, KH_2PO_4 as a pH buffer and phosphorus source and the minerals $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $CuSO4 \cdot 5H_2O$ and $MnSO_4 \cdot H_2O$ as magnesium sources, copper and manganese respectively. The optimal conditions of pH, temperature and copper concentration determined by SRM were 5.5, 34 °C and 0.93 mM, respectively. Through optimization by Taguchi methodology, laccase activity obtained was 74139 U L^{-1} at 11 days, being yeast extract concentration the most influential factor.

In Section D, to evaluate the press defatted seed paste (SMOD), and a residue flour from leaves fermented by *Mucor circinelloides-Saccharomyces cerevisiae* (HMHF), biorefined by-products of the biodiésel and bioethanol production processes from *Moringa oleifera* (MO), the effect of its inclusion in starter and finisher diets for Japanese quail was tested, measuring development parameters and carcass yields. The results were compared with diets containing unfermented MO flour (HMNT) and a conventional diet (TEST). For this, 180 quails were fed for 35 days with the formulated diets. During the starter stage, the HMNT diet showed the least weight gain and the highest mortality. SMOD obtained the highest average final live weight, weight gain, and lowest feed conversion. SMOD presented the highest weights and HMNT the highest percentages of hot and cold carcasses. It is concluded that pressing defatted seed paste and fermented MO leaves flour can be used at proven inclusion levels, in diets to feed Japanese quail without negative effects on growth.

II INTRODUCCIÓN

Moringa oleifera (MO) es un árbol originario del sur del Himalaya que se encuentra actualmente distribuido en la mayoría de los países tropicales y subtropicales del mundo, siendo la especie más ampliamente cultivada de la familia *Moringaceae*. Es una planta que durante siglos ha sido aprovechada por sus usos alimenticios y medicinales, especialmente en la India, Pakistán, Filipinas y algunos países de África. Tiene la ventaja de crecer aceleradamente produciendo altos rendimientos de biomasa, tolera factores de estrés como la sequía, altas temperaturas, suelos pobres y salobres (Nouman y col., 2012). Durante siglos el aceite de moringa o "Ben" fue utilizado como combustible y lubricante, hasta que fue prácticamente olvidado a raíz del uso generalizado de los combustibles fósiles. En las últimas décadas, debido al creciente interés en los bioenergéticos, se han intensificado los estudios sobre el cultivo de plantas productoras de aceite para su transformación en biodiésel y la conversión de residuos lignocelulósicos de cultivos agrícolas y forestales en bioetanol, mediante el proceso conocido como de "segunda generación" (Chen, 2014). El aceite de la semilla de moringa por sus características se considera una alternativa viable para la producción de biodiésel (Azad y col., 2015). La productividad de semilla de *M. oleifera* es muy variable, dependiendo de las condiciones agroclimáticas (Leone y col., 2016). En diferentes regiones en Nigeria, Ndubuaku y col. (2014) reportan rendimientos de semilla entre 6.7 y 24.0 t ha^{-1}. Asimismo, en función de la variedad genética y condiciones agroculturales, el rendimiento y cualidades de la semilla y su aceite pueden cambiar (Leone y col., 2016). Del total de ácidos grasos presentes en el aceite de moringa, alrededor 65 al 75% es oleico, el 9% behénico, 9% palmítico y 7% esteárico. El alto contenido de ácido oleico y tocoferoles, le confieren al aceite de moringa una alta estabilidad a la oxidación por lo que es atractivo para la producción de biodiésel y refinados farmacéuticos (Raman y col., 2017). Asimismo, las proteínas en la pasta desgrasada suman alrededor de un 60%, pudiéndose usar en alimentos para humanos y animales (Ogunsina y col.,

2010). Por otro lado, el residuo lignocelulósico del árbol de moringa comprende alrededor de un 70% de la biomasa. Ensayos en Nicaragua, con 1 millón de plantas ha^{-1} produjeron más de 500 t ha^{-1} $año^{-1}$ de biomasa, la que mediante el uso de un proceso de segunda generación tiene el potencial para producir hasta 20,000 litros de bioetanol, además de proteínas y ligninas como coproductos (Foidl y col., 2001). En México se han realizado algunos estudios sobre la productividad de biomasa de *M. oleifera* en condiciones medio ambientales localizados, lo cual es importante cuando se pretende establecer plantaciones adaptadas a las condiciones de una región determinada (Meza-Carranco y col., 2016). En Sinaloa, una región semiárida de México, se han introducido accesiones de distintos orígenes, sin embargo, a excepción del ecotipo "Culiacán", no se tiene información sobre su productividad (Pérez-Ángel, 2011). El objetivo de esta parte del presente trabajo fue seleccionar ecotipos de *M. oleifera* con altos rendimientos de semilla y aceite para la posible producción de biodiésel y de biomasa lignocelulósica para la transformación en bioetanol y otros coproductos.

Debido a los graves efectos ambientales atribuibles al uso desmedido de las energías provenientes de los combustibles fósiles, el aprovechamiento de las energías renovables es una prioridad mundial. En el año 2018 contribuyeron con el 26.0% energía global producida; de éstas, sólo el 1.0% proviene de biocombustibles, mayoritariamente de primera generación que utilizan fuentes alimentarias como el maíz y la caña de azúcar (REN-21, 2019). Los biocombustibles de segunda generación, que transforman por fermentación los carbohidratos vegetales complejos como celulosa y hemicelulosa en etanol tienen un potencial enorme ya que se calcula que a nivel mundial la biomasa asciende a más de 1.8 $x10^{11}$ toneladas, de las cuales la mitad están sobre tierra. No obstante, la tecnología para su producción no está plenamente dominada, debido a la naturaleza recalcitrante de la lignocelulosa que la compone (Chen, 2014). Es por ello, que la investigación actual está enfocada a encontrar formas efectivas, económicas y benignas con el ambiente de realizar las etapas más importantes

del proceso, que son el pretratamiento, la hidrólisis y la fermentación. Para realizar el segundo, los métodos más utilizados son la hidrólisis ácida y alcalina, donde se emplean ácidos o álcalis diluidos que dejan como productos de la reacción oligosacáridos, hexosas y pentosas contenidos en las moléculas de celulosa y hemicelulosa y como productos secundarios algunas sustancias que resultan inhibitorias para la mayoría de las levaduras fermentativas. Además de ese inconveniente, este tipo de proceso es contaminante para el ambiente (Kumari y Singh, 2018).

Saccaromyces cerevisiae es el microorganismo más representativo entre los fermentadores de etanol a partir de hexosas. Sin embargo, de manera natural esta levadura no tiene capacidad para degradar la xilosa u otras pentosas, componentes de las hemicelulosas. Se han encontrado otras levaduras que pueden realizar esta función, como *Pichia stipitis* y *Candida shehatae* (Buaban y col., 2010; Chandel y col., 2011; Hickert y col., 2014).

Es de gran interés la búsqueda de microorganismos con alta capacidad enzimática y etanologénica, que pudieran utilizarse en una sola etapa o bioproceso consolidado (CBP) (Bilal y col., 2018; Busic y col., 2018; Horisawa y col., 2019). Algunas especies de hongos, como *Neurospora crassa* y *Fusarium oxysporum* fueron reportados desde 1989 porque pueden hidrolizar la lignocelulosa y además realizan la fermentación alcohólica simultáneamente y las enzimas celulasas y xilanasas involucradas han sido caracterizadas (Christakopoulos y col., 1989). Algunos hongos ascomicetos como *Trichoderma sp*., *Neurospora sp*., *Rhizopus sp*., *Aspergillus oryzae*, *Mucor circinelloides*, *Paecilomyces variotii*, *Fusarium verticillioides* y basidiomicetos de pudrición blanca como *Schizophyllum commune, Trametes versicolor, T. suaveolens*, *Flammulina velutipes*, *Phlebia sp*., *Peniophora cinerea* han sido estudiados y se han obtenido resultados prometedores (Chen, 2014; Horisawa y col., 2019). Por otro lado, hay pocos trabajos sobre la sinergia entre microorganismos que puedan cooperar en un CBP para la producción de etanol. Se han obtenido buenos resultados con combinaciones entre hongos productores de etanol como

Fusarium oxysporum y cepas recombinantes de *S. cerevisiae* (Panagiotou y col., 2011). Es por ello que, en la segunda parte de este proyecto, se realizó una investigación en la que se aislaron y seleccionaron cepas de hongos regionales capaces de realizar eficientemente alguna o varias de las etapas de pretratamiento, hidrólisis y fermentación, del proceso de producción de etanol de segunda generación a partir de madera de moringa y encontrar la productividad y rendimientos de etanol en un CBP, de consorcios de estos hongos con una cepa comercial de *Saccharomyces cerevisiae*.

En la naturaleza, la degradación de la biomasa lignocelulósica es lograda por una mezcla de enzimas hidrolíticas en sinergia con enzimas oxidasas producidas por microorganismos que cuentan con la capacidad enzimática necesaria para dicho propósito. Dentro de las enzimas oxidativas se encuentran principalmente la lignino peroxidasa, la manganeso peroxidasa y las lacasas. Estas últimas han llamado poderosamente la atención últimamente por las múltiples aplicaciones que se le han encontrado en los campos de la bioconversión, biorremediación y la medicina. Esta enzima, junto con la enzima manganeso peroxidasa y la lignino peroxidasa, son las principales responsables de la degradación de la lignina contenida en la lignocelulosa por lo que tiene un gran potencial de aplicación en la producción de bioetanol de segunda generación. Las enzimas lignolíticas como la lacasa son producidas principalmente por hongos xilófagos, en especial los de pudrición blanca y parda, los cuales se alimentan mediante la absorción directa de nutrientes obtenidos por la acción de las enzimas que secretan (Pellezar y col., 1996). Muchas de las investigaciones recientes están destinadas a encontrar nuevas cepas con alta capacidad ligninolítica susceptibles de ser utilizadas a escala industrial, ya sea, para la producción de enzimas que puedan ser utilizadas en el pretratamiento para la producción de etanol.

Aunque los hongos de pudrición blanca tienen en común el hecho de que degradan madera, no degradan por igual los diversos tipos. Además, cada cepa de microorganismo puede presentar diferentes necesidades nutritivas y fisicoquímicas para su desarrollo, por lo que para una máxima producción de

enzimas ligninolíticas es necesario establecer las condiciones nutricionales y fisicoquímicas idóneas. Se conoce que *T. polyzona* tiene capacidad de producción de lacasas, manganeso peroxidasas y lignino peroxidasas (Orth y col., 1993; Pinar y col., 2017; Lueangjaroenkit y col., 2018; Lueangjaroenkit y col., 2019). Es por ello, que en la tercera parte de este trabajo de investigación se buscó encontrar las condiciones óptimas para la producción de lacasa del hongo nativo seleccionado *Trametes polyzona* (Sin. *Coriolopsis polyzona*), utilizando como sustrato madera de *Moringa oleifera*. Adicionalmente, se probó la capacidad de degradación *T. polyzona* en la degradación de lignina de madera de *M. oleifera*, para su posible utilización en el pretratamiento de producción de etanol a partir de esta planta.

Otra de las muchas aplicaciones que tiene el árbol de *M. oleifera* es en la alimentación humana y animal, ya que la planta de moringa es rica en nutrientes y compuestos bioactivos que ofrecen un gran potencial para su uso como recurso alimentario. Las hojas, semillas y corteza de *M. oleifera* son fácilmente consumidas por el ganado vacuno (Pérez y col., 2010), ovino (Pérez-Ángel, 2011), caprino (Aregheore, 2002), porcino (Muthukumar y col., 2012), aviar (Gakuya y col., 2014) y conejos (Adeniji y Lawal, 2012) como ingrediente de la dieta y se ha utilizado para mejorar el estado de salud, el rendimiento en el crecimiento, la producción de leche y carne (Panagiotou y col., 2005; Pérez-Ángel, 2011; Al-Juhaimi y col., 2015; Falowo y col., 2018). También se ha probado en la alimentación de peces (Adeshina y col., 2018). Esto es debido a que esta planta posee un alto contenido de proteína digerible, calcio, hierro, vitamina C, carotenoides y muchos otros compuestos bioactivos (Raman y col., 2017). Los análisis proximales indican que las hojas deshidratadas de *M. oleifera* contienen 28.65% de proteína (Borges y col., 2014). Por su parte, Ogunsina y col. (2010) reportan que las semillas de *M. oleifera* contienen 34.8% de lípidos y 31.6% de proteína. Sumado a ello, las hojas de moringa tienen muy bajos niveles de metales pesados como cadmio, arsénico y mercurio, por lo que su integración en

las dietas para aves de corral es segura y podrían mejorar el rendimiento de la producción avícola (Abd El-Hack y col., 2018).

Se han realizado diversos ensayos para determinar el efecto de hoja y semilla de moringa en la dieta sobre parámetros de crecimiento en aves. Oghenebrorhie y Oghenesuvwe (2016) encontraron que la inclusión de hasta un 10% de harina de hoja de MO en la dieta de pollos de engorde no tuvo efecto negativo sobre la ganancia de peso, conversión alimenticia (CA) y el peso vivo final. Castillo y col. (2018) observaron que la inclusión de la hoja de *M. oleifera* en la etapa inicial en codornices japonesas inhibió la ganancia de peso (GP) y aumentó la CA; sin embargo, en el período de engorde no se vieron afectados estos parámetros.

Asimismo, Abbas y Ahmed (2012) reportaron que, durante el período de iniciación, el uso de 1.5% de harina de semilla de *M. oleifera* (HSMO) limitó significativamente la GP, el peso corporal y la CA de pollos de engorda. Durante la etapa de finalización (22-35 días) y en el global (8-35 días), los niveles de suplementación con 0.37%, 0.75% y 1.5% de HSMO no produjeron ningún efecto negativo.

Por otro lado, el aceite extraído de la semilla se ha estudiado como alternativa para la producción de biodiésel (Azad y col., 2015). Así mismo, las hojas de esta planta son una fuente atractiva para la producción de alimentos para humanos (Boateng y col., 2017), animales y productos farmacéuticos (Saini y col., 2014). De la biomasa lignocelulósica se pueden obtener biocombustibles sólidos y bioetanol (Ali y Kemat, 2017). Por todo ello, y por su adaptabilidad a condiciones de clima y suelos desfavorables, *M. oleifera* es una opción prometedora para el desarrollo de biorrefinerías en regiones tropicales del mundo (Raman y col., 2017). Dentro de una biorrefinería de moringa, se obtiene un subproducto de la extracción de aceite de las semillas, el cual puede destinarse a la alimentación animal debido a su alto contenido de proteína. Así mismo, durante el bioproceso consolidado de hidrólisis y fermentación alcohólica de la biomasa de moringa se obtiene como subproducto una pasta de fermentación que contiene mayormente proteínas (Anasontzis y col., 2016).

En la segunda parte de este trabajo, se evaluaron 5 cepas autóctonas de hongos etanologénicos en consorcio con *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 200062), utilizando biomasa lignocelulósica de moringa como sustrato. La cepa C1502, identificada molecularmente como *Mucor circinelloides,* mostró el mayor rendimiento y productividad de etanol de todas las estudiadas (Fonseca-Peralta, 2017). Como subproducto del bioproceso consolidado desarrollado, se obtiene aproximadamente 65% de subproducto proteico, el cual podría aprovecharse en la alimentación animal.

Por lo anterior, se propuso en la cuarta parte de este trabajo de investigación, evaluar dos subproductos de una potencial biorrefinería de *Moringa oleifera.* Dichos subproductos son:1) pasta de semilla desgrasada por prensado y 2) hojas de moringa fermentadas por *Mucor circinelloides-Saccharomyces cerevisiae*. Se evaluó su posible utilización en las dietas de crecimiento de codorniz japonesa (*Coturnix coturnix japonica*), que se utilizó como modelo animal, midiendo parámetros productivos y de rendimiento en canal.

III REVISIÓN DE LITERATURA

A RENDIMIENTOS Y COMPOSICIÓN QUÍMICA DE BIOMASA DE *M. oleifera*

1 Antecedentes

Moringa oleifera es un árbol originario del sur del Himalaya que se encuentra actualmente distribuido en la mayoría de los países tropicales y subtropicales del mundo. Esta planta, también conocida como marango, malunggay o árbol de Ben. *M. oleifera* Lam forma parte de la familia *Moringaceae*, un grupo pequeño de plantas dentro del inmenso orden Brassicales que incluye la familia de la col y del rábano (Olson y Fahey, 2011). La familia más cercanamente emparentada con *Moringaceae* es *Caricaceae* a la cual pertenece la papaya con quien comparte la característica de presentar glándula en el ápice del pecíolo. *Moringaceae* comprende únicamente el género *Moringa*, con 13 especies (Olson, 2002), que se caracteriza porque en la mayoría de ellas, las semillas presentan 3 alas longitudinales (Figura 1b).

M. oleifera ha sido utilizada durante siglos por sus propiedades alimenticias, medicinales e industriales (Olson y Fahey, 2011). Por otra parte, la planta de moringa protege al suelo de la erosión, por lo que es ideal para usarse en programas de reforestación (Gandji y col., 2018), tiene también la cualidad de crecer aceleradamente, produciendo altos rendimientos de biomasa; se reproduce con facilidad, tolera factores de estrés como la sequía, altas temperaturas, suelos pobres y salobres (Anwar y col., 2007; Abd El-Hack y col., 2018; Falowo y col., 2018). Se cree que la planta fue por primera vez introducida en México en tiempos de la conquista española, al traerse ejemplares provenientes de Filipinas en la ruta Manila-Acapulco en tiempo de la conquista (Olson y Alvarado-Cárdenas, 2016). Otra teoría, supone que los genotipos de moringa presentes en México fueron introducidos de las colonias inglesas del Caribe y América del Sur, donde durante el siglo XIX y XX se cultivaban para obtener el aceite de Ben. Actualmente se encuentra ampliamente distribuida en varios lugares de México, especialmente en los estados de Sinaloa, Sonora,

Jalisco, Michoacán, Chiapas y Yucatán (Olson y Alvarado-Cárdenas, 2016), sin embargo, en la mayoría de los casos, no se tiene certeza de donde provienen estos ejemplares, ni se cuenta con una relación de los lugares exactos en que se encuentran ni la extensión de los cultivos, mucho menos una descripción de las características botánicas, agronómicas, bioquímicas o genéticas de los mismos (Olson y Fahey, 2011).

La moringa, como todas las plantas que se reproducen por polinización cruzada, tiene descendencia con características variables que repercuten en aspectos como productividad y contenido de aceite de la semilla. Ese es el caso de los genotipos presentes en México, en que se observan diferencias notorias en las características de las plantas de distintos regiones. El árbol de moringa es perenne, pero no muy longevo, ya que vive unos veinte años (Parrotta, 2009). Hay también híbridos de ciclo anual que se han desarrollado en la India (PKM-1 y PKM2) que se están utilizando en cultivos intensivos para la producción de frutos (vainas frescas) para el mercado de alimentos. *M. oleifera* crece tan rápido que puede alcanzar hasta 5 metros en un año (Pérez-Ángel y col., 2010). En ensayos realizados en Nicaragua (Pérez y col., 2010) con 1 millón de plantas/ha, la producción promedio anual de materia fresca fue de 580 toneladas/ha, equivalentes a 99 toneladas de materia seca. Esta cantidad de materia seca contiene un promedio de 16.8 toneladas de proteínas, 9.9 toneladas de azúcares, 7.9 toneladas de almidón y 4.9 toneladas de lípidos. Debido a que el contenido de lignina es muy bajo (alrededor del 5%), la fracción de hemicelulosa + celulosa es muy alta. Mediante el uso de un proceso de segunda generación (cofermentación para transformar el almidón, hemicelulosa y la celulosa en azúcares y después en alcohol), existe el potencial para la producción de más de 20.000 litros de alcohol por hectárea al año (Foidl y col., 2001). El resto de la torta de fermentación contiene principalmente lignina y proteínas que se pueden utilizar como materias primas para la elaboración de alimentos para animales.

Poco se sabe de la moringa en estado silvestre, sin embargo se ha registrado desde tiempos antiguos su presencia en los bosques tropicales caducifolios del

noroeste de la India, al sur del Himalaya. Ahora se distribuye ampliamente en los trópicos del sur, de Sudamérica y Centroamérica, África, Asia y las Islas del Pacífico (Lim, 2012). En algunos lugares de México esta planta es cultivada tradicionalmente, principalmente con fines ornamentales. Se encuentra abundantemente desde el sur de Sonora hasta Chiapas, y en la península de Baja California. La planta también se cultiva en depresiones tropicales secas, como la del Balsas y la central de Chiapas. Es probable que la planta haya llegado a México por primera vez en los viajes de la Nao de China entre Manila y Acapulco en tiempos de la conquista española, y fuera utilizada por la tripulación para su propia alimentación. Ahora se usa casi exclusivamente como ornamental (Olson y Fahey, 2011). Por otro lado, Martínez (1959) menciona que el Ferrocarril del Sud Pacífico introdujo y aclimató esta planta en los estados de Sinaloa y Sonora a mediados del siglo pasado, por lo que es muy difícil saber de donde provienen los ejemplares actuales que persisten en México..

2 Morfología

Las hojas son compuestas tripinadas y en ocasiones bipinadas y tienen hasta 45 cm de largo. Los folíolos miden de 1.2 a 2.0 cm de largo y desde 0.6 a 1.0 cm de ancho, los pecíolos miden de 4-15 cm de largo. Las flores son de color blanco amarillento y nacen en los tallos delgados de los racimos axilares (Parrotta, 2009).

Las flores individuales son de 0.7 a 1 cm de largo y de 2 cm de ancho, normalmente se encuentran 5 flores en un racimo (Figura 1c). Los frutos son cápsulas pendulares, lineales, de tres lados con nueve crestas longitudinales, por lo general miden de 20 a 50 cm de largo, pero en raras ocasiones hasta 1 m o más y 2.0 a 2.5 cm de ancho (Figura 1a) . Las cápsulas contienen en promedio 10 a 30 semillas, dependiendo de genotipo, son de color verde oscuro durante su desarrollo y duran aproximadamente 3 meses en madurar después de la floración (Khan y col., 1975).

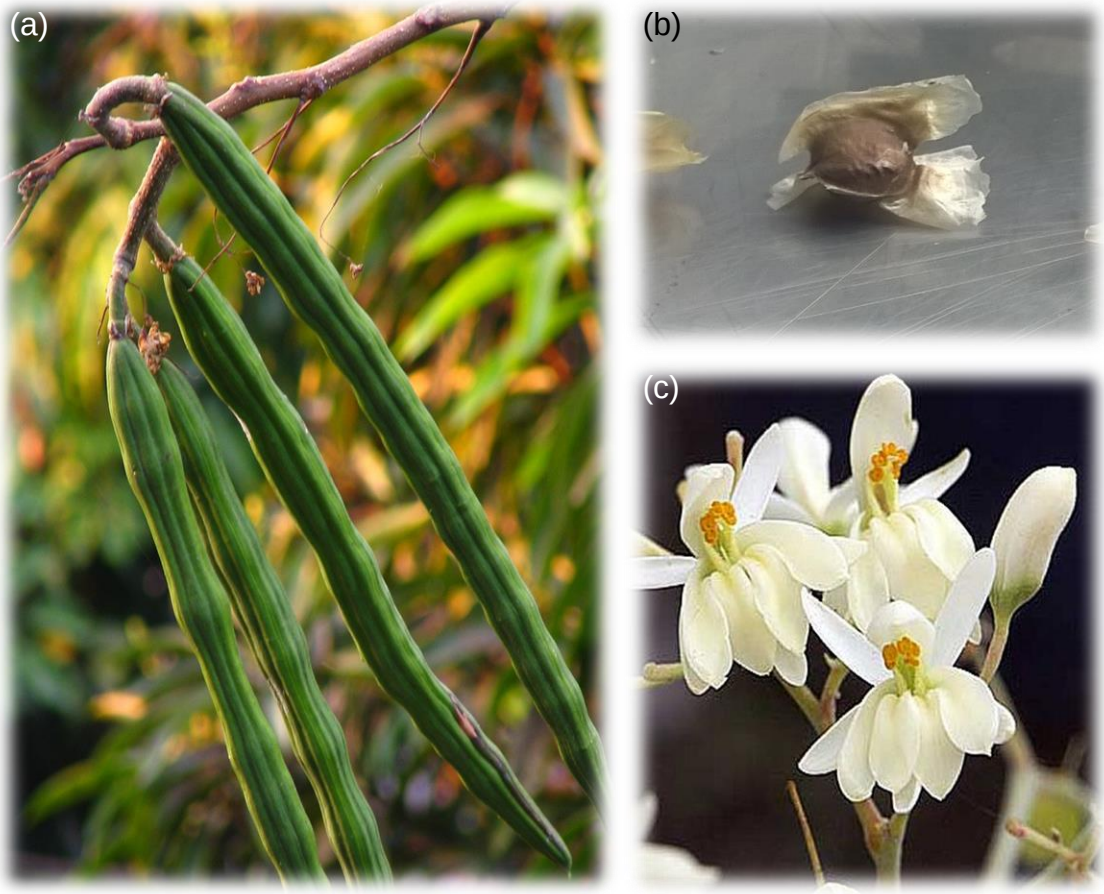


Figura 1. Frutos (a), semillas (b) y flores (c) de *M. oleifera*

Los frutos se vuelven color café cuando maduran y se abren longitudinalmente liberando así las semillas que contienen en su interior. Las semillas miden alrededor de 1 cm de diamétro, con tres alas con textura parecida a la del papel en los ángulos. Los pesos de las semillas difieren desde 3,000 a 9,000 semillas por kilogramo (Parrotta, 2009).

Es muy fácil de reconocer este género, debido a la peculiar combinación de hojas pinnadas, frutos trivalvados y semillas con 3 alas. También se distinge la familia porque presenta glándulas foliares características, localizadas a ambos lados de la base del pecíolo y en las articulaciones del raquis. Otra característica distintiva es que la flor posee estilo hueco y anteras con dos esporangios en lugar de 4 que es lo común en las angiospermas (Olson y Fahey, 2011).

3 Ecología

Las temperaturas en las áreas nativas de moringa, fluctúan desde -1 °C durante el invierno y hasta 48 °C en el verano. En esta región (al sur de Asia), la precipitación pluvial va desde 750 a 2200 mm al año. Aunque la moringa es altamente tolerable a la sequía y también se cultiva en regiones semiáridas de la Inda, Pakistán, Afganistán, Arabia Saudita y al este de África donde hay una precipitación anual de hasta 300 mm. Crece en sitios que se encuentran al nivel del mar hasta en lugares con altitudes de 1400 m (Booth y Wickens, 1988). Olson y Alvarado-Cárdenas (2016) identificaron 133 municipios de zonas tropicales de México con las condiciones óptimas para el desarrollo de *M. oleifera*, destacando por su extensión territorial los estados de Guerrero, Michoacán, Oaxaca y Jalisco. En cuanto a las condiciones del suelo, este árbol se desarrolla bien en en aquellos con textura de ligera a mediana, pero el mejor crecimiento ocurre en suelos franco arenosos (Parrotta, 2009). En un estudio se encontró que la moringa se puede desarrollar en suelos con moderados niveles de salinidad aunque presentó variaciones composicionales en la cantidad de minerales, proteínas, compuestos fenólicos, clorofila y en la actividad de la enzima superóxido dismutasa con respecto a la cultivada en terrenos con baja salinidad (Nouman y col., 2012).

4 Crecimiento y rendimiento agronómico

M. oleifera se desarrolla con rapidez en sitios favorables para su crecimiento, su altura aumenta de 1 a 4 m por año durante los primeros 4 años de vida (Pérez-Ángel, 2011). Aunque los árboles raramente crecen más de 12 m de altura, en ocasiones alcanzan los 16 m (Morton, 1991). Las frutas alcanzan la madurez aproximadamente 3 meses después de florecer. Un solo árbol puede tener un rendimiento entre 600 y 1,600 frutos cada año. Las vainas (frutos) maduras con semillas permanecen en el árbol por varios meses antes de partirse y liberar las semillas las cuales son dispersadas por el viento, agua y probablemente animales. La profundidad óptima para sembrar las semillas de *M. oleifera* es de 1 a 2 cm, la tasa de germinación usualmente es de entre 60 y 90% para semillas frescas. Tanto la germinación como el desarrollo inicial de las plantas se ven beneficiadaos por condiciones parciales de sombra (Parrotta, 2009). Los árboles pueden producir semilla de buena calidad por 12 años (Morton, 1991). De acuerdo a estudios realizados por Foidl y col. (2001), en cultivo intensivo la planta es capaz de producir por año hasta 600 toneladas por hectárea de biomasa fresca, que corresponde alrededor de 120 toneladas de masa seca. De ésta masa más del 50% corresponde a tallos y ramas. En experimentos realizados en el Estado de Sinaloa, México, una región semiárida, Pérez-Ángel (2011), México, encontró que en cultivo intensivo de la planta producía hasta 200 toneladas por hectárea de biomasa fresca.

5 Partes de la planta y usos

Prácticamente todas las partes de la planta son comestibles: hoja, tallos, semillas, flores, frutos y raíces tiernas, pero en el presente trabajo nos enfocaremos a la biomasa aérea, en particular a la hoja, rama o madera y a la semilla y su aceite.

a Hojas

En Indonesia, se recolectan las hojas tiernas y las flores se cocinan y se comen como otros vegetales o en sopa. En India y Bangladesh, las hojas son finamente picadas y se agregan a las ensaladas. Las hojas de moringa contienen

muchos compuestos que son considerados beneficiosos para la salud. Por cada 100 g de hoja de moringa seca, hay aproximadamente 30 g de proteína, la cual contiene los aminoácidos esenciales, incluso en valores más elevados que los recomendados por la FAO/OMS/ONU para niños de 2-5 años. Además de ser ricas en proteína, las hojas de moringa contienen grandes cantidades de minerales y vitaminas. Como resultado de esto, se utiliza la adición de hojas de moringa a dietas como complemento alimentario para humanos (Liu y col., 2011; Devisetti y col., 2016; Gopalakrishnan y col., 2016) y animales (Nouman y col., 2014; Al-Juhaimi y col., 2017; Castillo y col., 2018; Falowo y col., 2018). En la alimentación animal se ha probado exitosamente la incorporación en la dieta de hojas de moringa en muchas especies pecuarias, como rumiantes, cerdos, aves de corral, peces, etc. (Falowo y col., 2018).

b Ramas

Los tallos de moringa, cuando están jóvenes todavía contienen buena proporción de proteínas, por lo que son apropiados para la alimentación animal. Conforme van envejeciendo, el contenido proteico disminuye y aumenta el contenido de fibra cruda o lignocelulosa (Pérez-Ángel y col., 2010). Los rumiantes pueden asimilar parcialmente los carbohidratos contenidos en la lignocelulosa debido a su aparato digestivo dotado de microorganismos especializados capaces de degradarla parcialmente.

c Semillas

Cuando la semilla de moringa alcanza la madurez, es rica en aceite y contiene alrededor de 40% de grasa cruda, por lo que es una fuente rica en estos compuestos y por ello una opción interesante para la producción de biodiésel (Azad y col., 2015; Ivase, 2015). Al examinar la composición del aceite de semilla de moringa, se ha encontrado que contienen una alta proporción de ácidos grasos monoinsaturados, particularmente en ácido oleico (Mohd Ghazali y Mohammed, 2011). De acuerdo con Lim (2012), la semilla seca contiene en promedio; 29% de proteínas, 7.5% de fibra y del 36 al 42% de aceite, 4.43% de cenizas y 21.12%. Del total de ácidos grasos presentes en el aceite de moringa alrededor 65 al 75%

es ácido oleico, el 9% ácido behénico, 9% ácido palmítico, 7% esteárico y también se observan pequeñas cantidades de ácido lignocérico y mirístico. En un estudio realizado con *Moringa oleifera* endémica de Kenia, se encontró que el porcentaje de aceite en la semilla variaba según el proceso de extracción. El rango fue de 25.8% cuando se utilizó el prensado en frío y de 31.2% cuando se empleó un método que utilizaba cloroformo y metanol (Tsaknis y col., 1999). También se ha encontrado que el aceite de semilla de moringa presenta alto contenido en ácidos grasos insaturados, principalmente ácido oleico. El behénico y palmítico son los ácidos grasos saturados que mayormente se encuentran en el aceite de moringa, con un porcentaje de alrededor del 6% cada uno. El aceite de moringa también contiene altos niveles de β-sitosterol (hasta 50.07%), estigmasterol (17.27%) y un porcentaje de 15.12% de campesterol. Se detectaron altos niveles de α-, γ-, δ-tocoferol (105.0, 39.54 y 77.60 mg/kg, respectivamente) (Makkar y Becker, 1996).

Por otra parte, la proporción de proteínas en la semilla de moringa es también relativamente alta, y se sabe que la pasta desgrasada contiene más de 60% de este componente alimenticio, por lo que podría ser utilizada para fortificar diversos alimentos para humanos y animales (Ogunsina y col., 2010; Leone y col., 2016; Falowo y col., 2018).

6 Aptitud de *M. oleifera* para biorrefinería

Debido a la necesidad de cubrir las demandas alimenticias de la creciente población mundial, y a las numerosas y benéficas cualidades de la moringa, el cultivo de esta planta ha sido incentivado en los últimos años (Boateng y col., 2017). Aparte de su uso en la alimentación humana y animal, la moringa ha sido ampliamente estudiada por su posibilidad de utilizarse en aplicaciones tan diversas que sería factible contemplar una biorrefinería basada en ella. La Figura 2 muestra algunas de los múltiples productos que pueden elaborarse a partir de *M. oleifera* en una biorrefinería. Estos pueden clasificarse en productos alimenticios, bioenergéticos, para la agricultura, biorrenovables y medicinales (Raman y col., 2017). A partir de la hoja se ha reportado la adición de harina como fortificante de alimentos para humanos (Devisetti y col., 2016; Al-Juhaimi y col.,

2017) y animales (Falowo y col., 2018), antioxidantes para biodiésel (França y col., 2017), biofertilizantes (Foidl y col., 2001), películas biocidas en el empacado de quesos (Lee y col., 2016), aleloquímicos (Farooq y col., 2013) y diversos compuestos de interés farmacológico y nutricional como carotenoides y tocoferoles, (Saini y col., 2014). De las flores y frutos se han aislado e identificado compuestos antioxidantes (Siddhuraju y col., 2014). El fruto fresco se utiliza como alimento para humanos y animales (Makkar y col., 2007) y tiene capacidad hipoglucemiante (Gupta y col., 2011). De la semilla se extrae aceite para biodiésel (Rashid y col., 2008), biolubricante (Sharma y col., 2009), aceite comestible (Nadeem y Imran, 2016), así como pasta de prensado que puede utilizarse como aditivo en alimentos (Falowo y col., 2018) y en el tratamiento de aguas (Ruelas-Leyva y col., 2017).

De la cáscara del fruto y de la cascarilla de la semilla se han obtenido biofertilizantes (Martín y col., 2013) y bioetanol (Ali y Kemat, 2017). Finalmente, de las ramas y raíces, al ser una buena fuente de celulosa y hemicelulosa se puede obtener briquetas caloríficas, carbón (Raman y col., 2017) y una gran cantidad de productos biorrefinados como azúcares y sus derivados, tales como glucosa, xilosa, sorbitol, etanol, etileno y butanol, plásticos, etc. (Yusuf y Inambao, 2019). También se pueden aprovechar estos carbohidratos para la producción de enzimas especializadas (Vázquez y col., 2019; Yusuf y Inambao, 2019). Así mismo, de la madera es factible obtener papel (Benítez y col., 2014).

De la raíz se han purificado sustancias con propiedades biopesticidas (Jayashree y col., 2014) y anticancerígenas (Bhattacharya y col., 2018). Como se puede constatar, el potencial que posee *M. oleifera* es enorme, y es especialmente atractivo para los países tropicales y subtropicales que son aptos para su cultivo, entre los que se encuentra México, donde hay amplias zonas con las condiciones climatológicas adecuadas para el establecimiento de los cultivos que podrían proveer de la materia prima para el desarrollo de una biorrefinería que explote esta planta (Olson y Alvarado-Cárdenas, 2016).

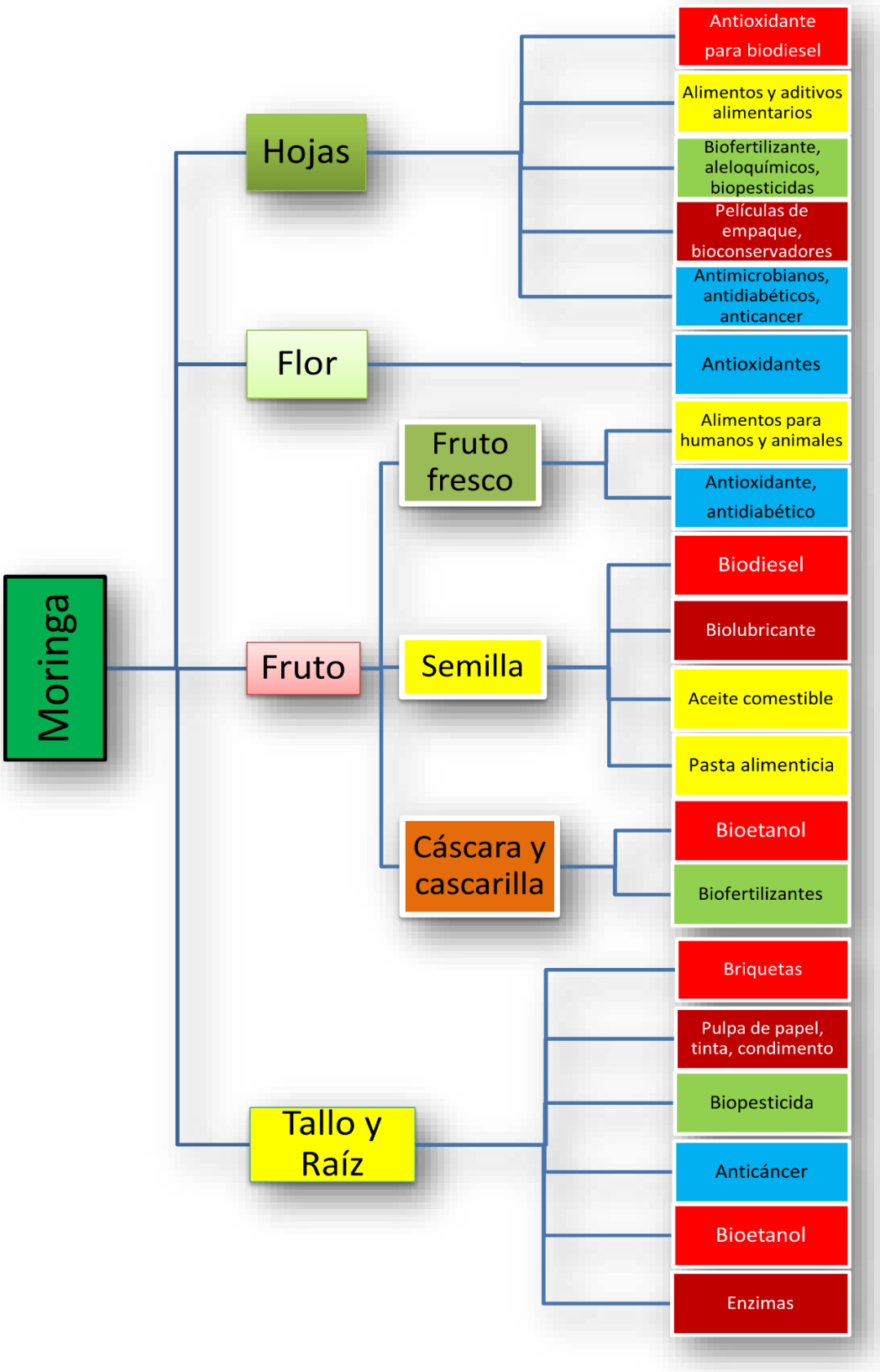


Figura 2. Algunas posibilidades de transformación de partes de *M. oleifera* en una probable biorrefinería (modificado de Raman y col. (2017)).

B USO DE HONGOS PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL

1 Antecedentes

Debido al inminente agotamiento de los combustibles fósiles, muchas investigaciones en la actualidad se están enfocando a la búsqueda de nuevas alternativas de energéticos o fuentes de energía renovables, tales como el biodiésel, obtenido a partir de lípidos, y el bioetanol, producido por la fermentación de materiales ricos en carbohidratos. Éstos pueden provenir de materias primas alimenticias como la caña de azúcar y el maíz, con los cuales se produce actualmente alrededor del 80% del bioetanol. A este tipo de biocombustibles se les conoce también como de primera generación. Sin embargo, además del elevado costo de estas materias primas, entran en juego impedimentos de tipo moral y ético, ya que éstas están ligadas al mercado alimentario (Phitsuwan y col., 2013). En el caso del bioetanol, el costo de las materias primas representa entre el 60 y 70% del costo total (Becerra-Pérez, 2009). Por esta razón, se han venido desarrollando en los últimos años las tecnologías de segunda generación para la producción de este combustible a partir de biomasa lignocelulósica, la cual es muy abundante y barata, ya que se puede obtener de muchas fuentes tales como residuos de producción agrícola y forestal, además de cultivos “energéticos” (especialmente seleccionados para la producción de biocombustibles). Se ha calculado que el potencial de producción de bioetanol de estos materiales es 16 veces mayor que el actual, donde de emplean almidones y azúcares.

2 Bioetanol de primera generación

Las plantas de etanol de primera generación utilizan cualquiera de los azúcares o almidón. Las plantas productoras de etanol a base de azúcar de caña se encuentran principalmente en Brasil. El etanol a base de almidón es producido a partir del maíz y otros granos, y está dominado por los E.E.U.U., seguido de otros importantes países como China, Canadá, Francia, Alemania y Suecia. En el mercado mundial se producen 21 millones de m^3 de etanol a partir de caña de azúcar, mientras que a partir de maíz y granos se producen 60 millones de m^3. Hay más de 200 plantas en los EE. UU., con una capacidad promedio de alrededor de 260.000 m^3 año de etanol a partir del maíz o sorgo

(Lennartsson y col., 2014). El uso para el proceso de materias primas utilizadas comúnmente para la alimentación humana ha dado lugar a muchas discusiones éticas. Se le conoce normalmente como el debate "alimentos versus combustible", con puntos de vista diversos y fuertemente polarizados. El suministro de la materia prima también puede convertirse en un factor que limita el potencial en comparación con el de la demanda potencial.

El primer paso de la producción de etanol a partir de granos (Figura 3) en el proceso llamado molinos secos, es la molienda del sustrato y la subsiguiente es la licuefacción del almidón. La licuefacción es seguida por la hidrólisis o sacarificación, que libera los monómeros del azúcar (glucosa) en la solución. Durante la fermentación posterior o simultánea con la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*), los monómeros de azúcar se convierten en etanol y dióxido de carbono.

Por lo general, se obtiene una concentración de etanol cercana al 10% (p/v) al final de la fermentación. El líquido de la fermentación, o mosto fermentado, se destila para separar y purificar el etanol, que es entonces deshidratado hasta concentraciones superiores al 99.7% para poderse utilizar como combustible, de acuerdo con la norma europea EN 15376 (SIS, 2011). En la parte inferior de la columna de destilación se acumula la vinaza que contiene aproximadamente 10% de sólidos totales, incluyendo sustrato residual, levadura y subproductos de fermentación. Algunas de las partículas sólidas se eliminan del líquido a través de centrifugación por un decantador y la vinaza delgada restante se envía a un evaporador. La torta de centrifugación y el jarabe resultante de la evaporación normalmente se mezclan para producir los granos destilados secos con solubles (DDGS). Los DDGS, que son principalmente fuente de proteínas para la alimentación animal, juegan un papel crucial en la economía general del proceso (Taherzadeh y col., 2013). Teniendo en cuenta la el dominio en la producción industrial de etanol de primera generación, son muy pocas las incertidumbres del proceso, por lo que tiene un riesgo relativamente bajo, que radica principalmente en la incertidumbre del costo de la materia prima y el precio de los productos: el etanol y los piensos (DDGS).

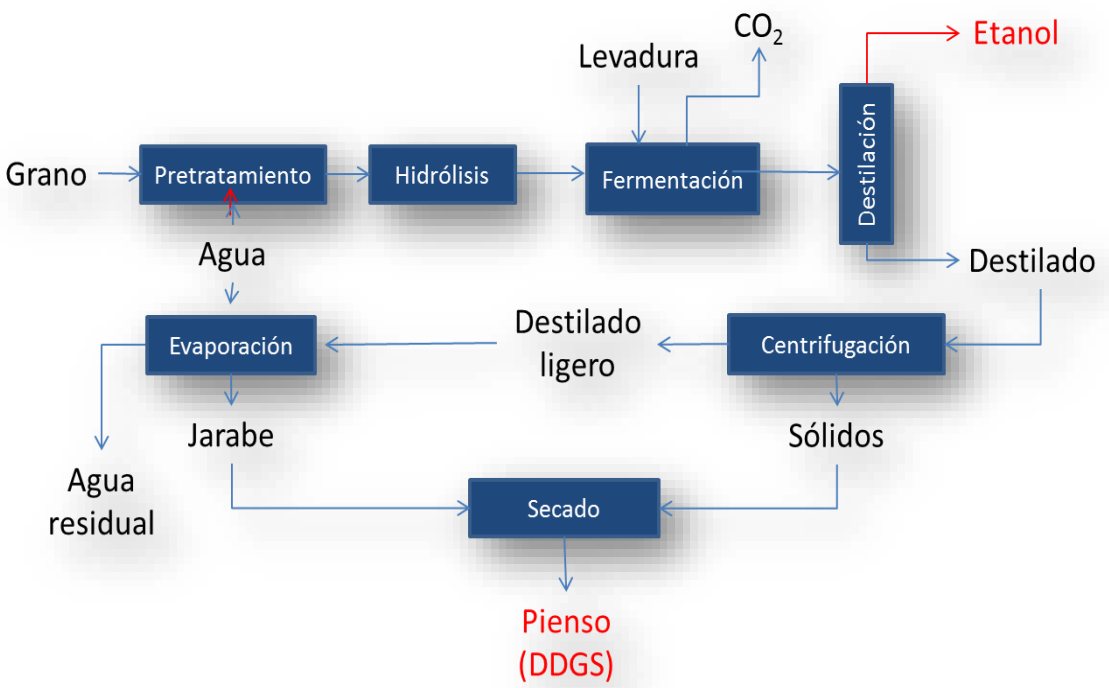


Figura 3. Diagrama de proceso para la producción de bioetanol de primera generación (adaptado de Lennartsson y col. (2014)).

3 Bioetanol de segunda generación

En general, el proceso de bioetanol de segunda generación (Figura 4) es muy parecido al proceso de primera generación, pero utiliza como insumos subproductos de las fábricas de papel al sulfito y otras materias primas lignocelulósicas (Lennartsson y col., 2014). Teóricamente, para la producción de etanol de segunda generación no se tendrían problemas con el suministro de materia prima ya que se calcula que en el planeta están disponibles entre 7 y 18 mil millones de toneladas año^{-1} de biomasa lignocelulósica. Sin embargo, al momento actual, el proceso se encuentra limitado por problemas económicos como el costo de la materia prima lignocelulósica y su transporte (Cheng y Timilsina, 2011; Chen, 2014). Sin embargo, uno de los desafíos técnicos más importantes es la dificultad que presenta la biomasa para degradarse, debido a su contenido de lignina. Para ello es necesario recurrir a pretratamientos severos de la materia prima. Estos pretratamientos, a su vez, resultan en la formación de compuestos inhibidores, lo que provoca problemas durante la fermentación (Taherzadeh y Karimi, 2008). El segundo desafío radica en la producción de enzimas eficientes para hidrolizar la celulosa, a un coste competitivo respecto a las enzimas usadas para la hidrólisis de primera generación del almidón. Aunque se han logrado mejorías por parte de los fabricantes de enzimas, reduciendo el costo de la enzima a 0.13 USD/L de etanol, este costo es aún alto (Geddes y col., 2011). El tercer desafío lo representa la necesidad de alcanzar concentraciones suficientemente altas de etanol en el mosto fermentado con el fin de reducir el costo de la destilación y el tratamiento de las aguas residuales. Se considera que el objetivo es alcanzar entre 4-4.5% (p/v). Para ello se requieren cargas de sustrato por encima del 15%, además de los problemas inherentes en el mezclado y en la producción de inhibidores de crecimiento para las levaduras producidos por los pretratamientos (Viikari y col., 2012). Aunado a lo anterior, se tiene la liberación de azúcares de pentosa durante la hidrólisis de muchos de los materiales utilizados, tales como el rastrojo de maíz, la paja de trigo y el pasto varilla (*Panicum virgatum*) con contenidos superiores a 20% de xilano (Mosier y col., 2005).

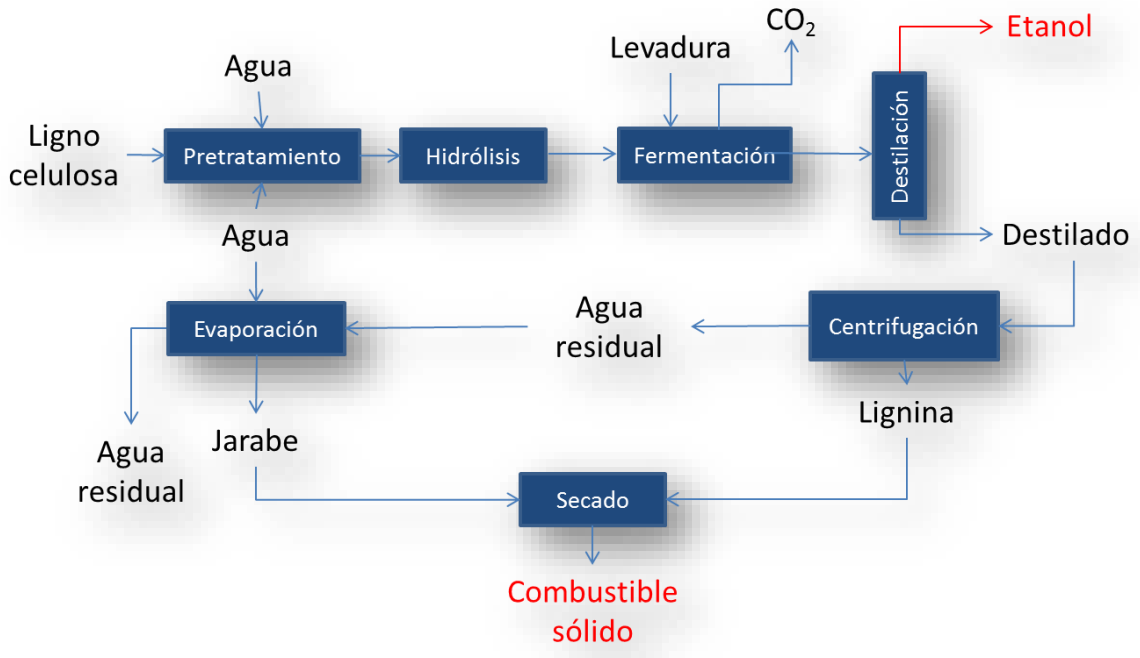


Figura 4. Etapas del proceso de producción de bioetanol de segunda generación (adaptado de Lennartsson y col. (2014)).

Dado que el microorganismo de elección, *S. cerevisiae*, es incapaz de utilizar pentosas, esto puede convertirse en un problema. Existe una gran lista de ejemplos de microorganismos manipulados genéticamente que se han utilizado para intentar superar esta limitación (Madhavan y col., 2011).

Actualmente se producen sólo cantidades insignificantes de bioetanol de segunda generación en varias plantas de demostración en todo el mundo que trabajan industrialmente, pero aún no son comercialmente factibles. Por el momento, la empresa noruega Borregaard, declara ser la mayor productora de etanol de segunda generación, con una producción anual de 20.000 m^3 (Rødsrud y col., 2012). En este caso, el etanol se produce a partir de los monómeros de azúcar liberados como subproducto durante el proceso al sulfito del papel. Lo anterior no es nuevo. Históricamente se han producido grandes cantidades de etanol a partir de materia prima lignocelulósica. Como ejemplo, se puede citar que durante la década de 1940 estaban en operación en Suecia más de 30 molinos de papel al sulfito, que incluían la producción de etanol y a finales de la década de 1980 las plantas de papel al sulfito soviéticos tenían una capacidad de producción de hasta 190.000 m^3/año (Chen, 2014).

a Pretratamiento

La etapa de pretratamiento es indispensable para el procesamiento de biomasa lignocelulósica, ya que facilita la hidrólisis enzimática y posibilita la obtención de altos rendimientos. Ésta es importante porque la lignina de las paredes celulares forma barreras contra en ataque enzimático. Un pretratamiento ideal es reducir el contenido de lignina, disminuir la cristalinidad de la celulosa e incrementar el área superficial (Krishna y col., 2001). En el Cuadro 1 se resumen los principales métodos de pretratamiento que se utilizan para degradar la hemicelulosa, sus ventajas y desventajas.

1) Métodos físicos

a) Trituración

La molienda se utiliza para reducir el tamaño de la partícula, aunque su acción sobre los rendimientos de la hidrólisis de la biomasa es mínima.

Cuadro 1. Principales métodos de pretratamiento de lignocelulosa

Tipo	Modo de acción	Ventajas	Desventajas	Ref.
Mecánicos	Molienda, trituración, reducción del tamaño de partícula	• Exposición del área y digestibilidad de la biomasa • Reducción de la cristalinidad y grado de polimerización de la celulasa	• Alto consumo energético • Económicamente ineficiente	1,2
Pirólisis	Tratamiento a temperaturas >300 °C	• Muy buenos rendimientos de producción de azúcares • Eliminación de descarga de efluentes	• Parámetros del biorreactor requieren ser altamente eficientes • Requiere aditivos como CMC para asegurar el flujo continuo de material por el extrusor	2
Extrusión	Mezcla, cizallamiento y calor causa fibrilación y reducción de las fibras	• No hay descarga de efluentes, por lo que hay menor contaminación ambiental, lo cual reduce costos y mermas por pérdida de sólidos	• Requiere aditivos para asegurar un buen flujo de materiales por el extrusor	2,14,15
Agua caliente	Altas temperaturas con agua caliente (160-240 °C) a alta presión remueve hemicelulosa haciendo más accesible la celulosa	• Mejor control de pH minimiza la degradación no específica de polisacáridos • Alta recuperación de pentosas • No se requiere de equipos anticorrosivos	• Requerimientos altos de energía • No factible a escala comercial	3,4
Explosión de vapor	Exposición de biomasa triturada a vapor de 160-260 °C a alta presión por un tiempo seguido de liberación de presión causa hidrólisis de grupos acetilo de hemicelulosa, separando las fibras y rompiendo la pared celular	• Mejora la hidrólisis enzimática • Menor impacto ambiental • Menos químicos peligrosos • Alto rendimiento de azúcares • Factible económicamente	• Menos efectivo para maderas blandas • Forma compuestos inhibitorios como HMF • Degradación parcial de hemicelulosa y lignina	5,6
Expansión de fibra con amoniaco (AFEX)	Tratamiento con amoniaco líquido a temperaturas entre 60 y 100 °C a presión alta (250-300 psi) 30-60 min seguido por disminución rápida de presión causa disrupción de biomasa y descristalización	• Incremento del área disponible para las enzimas lo que incrementa digestibilidad • Menor formación de compuestos inhibitorios	• No es muy efectiva con alta lignina • La hemicelulosa no es reducida significativamente • Costos muy elevado por el amoniaco	1,2
Ácidos	Solubilización de hemicelulosa y lignina por acción de ácidos diluidos y tratamientos de alta temperatura (~180 °C) corto tiempo o temperatura moderada (~120 °C) por tiempo prolongado	• Aumenta la hidrólisis de hemicelulosa y de celulosa amorfa • Altos rendimientos de azúcares	• Alto costo energético • Requiere equipo anticorrosivo • Formación de compuestos inhibidores	2,7,8
Álcalis	Rompe los enlaces de éster y glucosídicos de cadenas laterales causando alteración en estructura de la lignina, hinchando la celulosa, descristalizándola parcialmente y solubilizando hemicelulosa	• Remoción eficiente de lignina • Incremento de accesibilidad de hemicelulasas • Mejora la digestibilidad enzimática de lignina y hemicelulosa • Disminuye el grado de polimerización y cristalinidad de celulosa	• Costos de refinación posteriores altos • No es eficiente a escala industrial	9,10
Organosolv	La lignina es extraída con mezclas acuosas de solvente orgánico (etanol, etilenglicol, acetona, metanol, etc.) con ácidos inorgánicos	• Mejora la eficiencia de la digestión enzimática de lignina y hemicelulosas	• Alto costo de solventes y catalizadores • Riesgo de incendios y explosiones por los solventes utilizados	2
Ozonólisis	Degrada la lignina atacando anillos aromáticos	• No se producen residuos tóxicos • La reacción se realiza a temperatura ambiente	• Muy costoso debido a requerimientos de ozono	11,15,16
Biológicos	Lacasas y manganeso peroxidasas, ligninoperoxidasas producidas por hongos de pudrición blanca causan degradación de lignina	• No se producen residuos tóxicos • La reacción se realiza a temperatura ambiente	• Baja tasa de hidrólisis • Requiere optimización de procesos • Costos altos de operación a gran escala • Se requiere de varios microorganismos para mejorar deslignificación	2,12,13

1 (Singh y col., 2014); 2 (Prasad y col., 2015); 3 (Mosier y col., 2005); 4 (Yu y col., 2009); 5 (Martín-Medina y col., 2002); 6 (Pan y col., 2005); 7 (Yang y Wyman, 2008); 8 (Sivers y Zacchi, 1995); 9 (Bhatia y col., 2012); 10 (McIntosh y Vancov, 2010); 11 (García-Cubero y col., 2008); 12 (Kumar y Wyman, 2009); 13 (Sindhu y col., 2016); 14 (Busic y col., 2018); 15 (Kumari y Singh, 2018); 16 (Sun y Cheng, 2002)

Existen diferentes tipos de métodos mecánicos de reducción de tamaño, como troceado, astillado, triturado, molienda, tendientes a mejorar la digestibilidad del material lignocelulósico. Estas técnicas de pretratamiento aumentan el área expuesta, así como disminuyen el grado de polimerización y cristalinidad de la celulosa. Después del triturado, el tamaño de los materiales es aproximadamente de 10 a 30 mm, mientras que después la molienda es de 0.2 a 2 mm. Dependiendo de las características de la biomasa y del tamaño final de las partículas a obtener, el factor más importante a considerar para realizar esta operación es el requerimiento de energía, siendo frecuentemente incosteable. Por otro lado se requiere más energía para maderas duras que para residuos agrícolas (Sánchez-Riaño y col., 2010; Singh y col., 2014).

b) Extrusión

La extrusión se utiliza para calentar y moler biomasa lignocelulósica que contenga más de un 15-20% de humedad. Este es un pretratamiento termofísico que incluye mezcla, calentamiento y cizallamiento del material, resultando en la alteración física y química del mismo. Tiene la ventaja que no hay descarga de efluentes, por lo que hay menor contaminación ambiental, lo cual reduce costos y mermas por pérdida de sólidos. La extrusión es ventajosa porque el corte mecánico conduce al rompimiento de la estructura de la biomasa produciendo desfibrilación y reducción del tamaño de las fibras. Requiere menos energía que la trituración mecánica. La extrusión se vislumbra como uno de los métodos más eficientes y económicos que existen para el pretratamiento de biomasa lignocelulósica (Busic y col., 2018; Kumari y Singh, 2018).

c) Pirólisis

La pirólisis es un proceso endotérmico ahorrador de energía; en el que la biomasa lignocelulósica se trata a una temperatura superior a 300 °C. En este proceso, la descomposición de la celulosa de la biomasa en gases produce los productos H_2, CO y carbón. El carbón residual así formado es adicionalmente tratado con ácido suave y lixiviado con agua. El agua lixiviada contiene glucosa como componente principal que se puede utilizar como fuente de carbono para la producción de biocombustibles.

d) Ultrasonido

Se emplea para extraer hemicelulosa y lignina, pero su eficacia es menor a otros métodos de pretratamiento. La aplicación de ultrasonido como método de pretratamiento de biomasa da como resultado una disminución del tiempo de fermentación debido a la desintegración de las estructuras lignocelulósicas. La eficiencia del pretratamiento depende de la selección de la frecuencia de oscilación, la temperatura del proceso y tiempo, así como el tipo de material tratado. Por lo general, se aplica una frecuencia de sonicación de 20 a 40 kHz, la cual rompe los enlaces de hidrógeno internos del biopolímero. La biomasa sufre el aflojamiento, hinchazón y ruptura de fibras. Los mejores resultados de deslignificación se han observado para una frecuencia de sonicación de 40 kHz (Kucharska y col., 2018).

e) Pretratamiento térmico

La biomasa se calienta a temperaturas de hasta 180 °C, lo que provoca que la lignina y hemicelulosa se degraden (Bobleter, 1994). Parte de la hemicelulosa se solubiliza también durante estos procesos, pero a temperaturas superiores a 180 °C, formando a su vez ácidos, que ayudan a catalizar la hidrólisis de hemicelulosa (Gregg y Saddler, 1996).

e) Explosión de vapor

La materia prima se somete a temperaturas entre 160-260 °C, mediante la inyección directa de vapor saturado, por un intervalo de tiempo entre 1 y 10 minutos. Seguidamente se lleva el producto a una rápida descompresión hasta presión atmosférica. Como resultado se obtiene biomasa con alteraciones físicas (desagregación y ruptura de las fibras), y químicas (despolimerización y rotura de enlaces) y una celulosa más accesible a la hidrólisis enzimática. Las variables por controlar en este tipo de procedimiento son la temperatura, el tiempo de residencia, el tamaño de partícula, y la humedad (Duff y Murray, 1996; Isikhuemhen y col., 2014).

f) Agua líquida a alta temperatura

En este proceso se somete la biomasa al efecto de agua caliente a una temperatura entre 170 – 230 °C por un tiempo de 46 min. El objetivo de este pretratamiento es solubilizar principalmente la hemicelulosa de la celulosa para hacerla más accesible y evitar la formación de inhibidores. Para evitar la formación de inhibidores, el pH debe mantenerse entre 4 y 7 durante el pretratamiento. Mantener el pH entre 4 y 7 minimiza la formación de monosacáridos y, por lo tanto, también la formación de productos de degradación que puede seguir catalizando la hidrólisis del material celulósico durante el pretratamiento (Mosier y col., 2005).

2) Métodos fisicoquímicos

a) Explosión de fibra con amoníaco (AFEx)

En este pretratamiento se aplican amoniaco líquido y un proceso de explosión de vapor. Es un ti po de pretratamiento térmico alcalino y la optimización del proceso se puede realizar variando carga de agua, carga de amoníaco, temperatura de reacción y tiempo de residencia. Este proceso no requiere un tamaño de partícula pequeño para ser eficiente y no se forman inhibidores durante el proceso, pero tiene algunas desventajas como una menor eficiencia con materiales con alto contenido de lignina, como las maderas blandas. AFEx puede ser una técnica rentable para el pretratamiento de biomasa siempre y cuando se pueda recuperar el amoniaco después del proceso de pretratamiento (Kumar y col., 2009; Kumari y Singh, 2018).

Para este pretratamiento se emplean cargas de amoníaco:biomasa de alrededor de 1, a temperaturas que van desde la temperatura ambiente con una durante 10 a 60 días, hasta 120 °C, por varios minutos (Alizadeh y col., 2005), obteniéndose aumentos de seis veces en la hidrólisis enzimática y rendimiento de etanol de hasta de 2.5 veces mayor (Sánchez-Riaño y col., 2010).

b) Explosión con CO_2

Se lleva a cabo con alta presión y altas temperaturas de hasta 200 °C, con una duración de varios minutos. Este pretratamiento produce líquidos que pueden ser ácidos, estos ácidos hidrolizan especialmente la hemicelulosa. El

CO_2 también se aplica en un proceso supercrítico (35 °C, 73 bares), este incrementa el rendimiento de glucosa en 50-70% de bagazo, el 14% de pino amarillo y el 70% de álamo, esto es probablemente causado por el aumento del tamaño de poros (Zheng y col., 1998; Kim y Hong, 2001; Kumari y Singh, 2018).

3) Métodos químicos

a) Hidrólisis ácida

Utiliza ácidos como clorhídrico, sulfúrico, sulfuroso, nítrico, fosfórico y fórmico, aunque a escala industrial se usan solamente los dos primeros. Industrialmente la hidrólisis ácida se realiza de dos maneras: los que utilizan los ácidos concentrados (10-30%) a bajas temperaturas (170-190 °C) con mayor tiempo de reacción, y los que emplean los ácidos diluidos (1-5%), a temperaturas altas (160-240 °C) y tiempos de residencia cortos (6-12 segundos). La reacción produce hemicelulosa, principalmente xilano. La hemicelulosa da subproductos inhibidores de levaduras como furfural, hidroximetil furfural y otros, mientras que la lignina es condensada y precipitada rápidamente (Liu y Wyman, 2003; Rastogi y Shrivastava, 2017).

b) Oxidación húmeda

Consiste en agregar un compuesto oxidante como aire, oxígeno o peróxido de hidrógeno a la biomasa en medio acuoso para el tratamiento de biomasa a temperaturas elevadas (por encima de 120 °C durante 30 min) durante el cual el agua se comporta como un ácido (por encima de 170 °C), rompiendo las hemicelulosas en monómeros de pentosa más pequeños y oxidando la celulosa. La eficiencia de la oxidación húmeda depende de la presión del oxígeno, la temperatura y tiempo de reacción. Sin embargo, este método no es factible a nivel industrial debido a la naturaleza combustible del oxígeno puro y el alto costo del peróxido de hidrógeno (Lai, 2001; Rastogi y Shrivastava, 2017).

c) Ozonólisis

El gas ozono se puede utilizar como oxidante para descomponer la lignina y hemicelulosas que dan como resultado un aumento de la biodegradabilidad de la celulosa. El ozono es un potente oxidante soluble en agua que puede

degradar la lignina y liberar compuestos solubles con menos peso molecular como ácido fórmico y ácido acético. El pretratamiento con ozono es caro y se utiliza una gran cantidad de ozono para tratar materiales lignocelulósicos, lo que limita el uso generalizado de la ozonólisis. Durante el pretratamiento con ozono, sus moléculas se desintegran en radicales hidroxilo (OH•) en el agua y estos radicales resultan en oxidación tanto para el ozono como para los radicales OH•. El pH de la solución determina en gran medida las reacciones que tienen lugar durante el pretratamiento de ozonólisis (Sun y Cheng, 2002; García-Cubero y col., 2008; Kumari y Singh, 2018).

d) Hidrólisis alcalina

Utiliza NaOH diluido a 60 °C por 24 h, lo que provoca un hinchamiento de la biomasa, produciendo saponificación y solvatación que favorecen el rompimiento de los enlaces cruzados entre las hemicelulosas y algunos otros componentes, que dan como resultado un aumento de la porosidad de la biomasa. La hinchazón de la biomasa, la hace penetrable por las enzimas y bacterias, dando lugar a una degradación de polisacáridos El álcali hace más accesible la celulosa a la acción de las enzimas para su sacarificación. La reacción alcalina de la biomasa lignocelulósica altera la pared celular al hidrolizarse polisacáridos como celulosa, hemicelulosa. Las principales desventajas de este método son la necesidad de un tiempo de residencia prolongada y que se requiere neutralizar la suspensión pretratada (Bhatia y col., 2012; Kumari y Singh, 2018).

e) Solventes orgánicos (Organosolv)

Este pretratamiento utiliza disolventes orgánicos (organosolv) como alcohol etílico, alcohol metílico, acetona, etilenglicol y alcohol tetrahidrofurfurílico con o sin la adición de un agente catalizador para la deslignificación de material lignocelulósico. Los catalizadores utilizados pueden ser orgánicos o inorgánicos, ácidos (HCl y H_2SO_4) o bases (NaOH, NH_3 y $CaCO_3$). Se ha utilizado este proceso para la deslignificación del rastrojo de maíz con una mezcla de n-propilamina y etanol con una eficacia de 81.7% de deslignificación y 83.2% de rendimiento total de azúcar (Xu y col., 2015). Este pretratamiento es especialmente eficaz para biomasa lignocelulósica con

alto contenido de lignina, ya que es capaz de romper los enlaces internos de lignina y hemicelulosas. La desventaja principal es el alto costo de los productos químicos utilizados (Prasad y col., 2015; Kumari y Singh, 2018).

4) Pretratamientos biológicos

La mayoría de los métodos convencionales fisicoquímicos para la degradación de lignina requieren grandes insumos de energía y también causan contaminación. El pretratamiento biológico está adquiriendo una gran relevancia porque es un enfoque eficaz, seguro y respetuoso con el medio ambiente. Los métodos de pretratamiento de hecho requieren equipos costosos, altos aportes de energía y, a veces, el uso de productos químicos agresivos resultando en contaminación ambiental. El pretratamiento biológico, en cambio, emplea microorganismos, como hongos, bacterias y actinomicetos, que sintetizan enzimas celulolíticas, hemicelulolíticas y ligninolíticas para degradar la lignocelulosa (Wan y Li, 2012; Sindhu y col., 2016). El grupo de microorganismos más eficiente en la degradación de la biomasa lignocelulósica es el de la división Basidiomicota o basidiomicetes, que son hongos filamentosos que causan la pudrición (blanca y parda) de la madera, especialmente los primeros (Tien y Kirk, 1984; Glenn y Gold, 1985; Kumar y col., 2020). Estos hongos, son los principales degradadores en los ecosistemas boscosos. Son capaces de degradar la celulosa, hemicelulosa y lignina, por lo que son los más utilizados en los pretratamientos biológicos de materiales lignocelulósicos. La eficiencia en la degradación de un material lignocelulósico está relacionada a la capacidad de cada especie y cepa de hongo de producir el tipo y cantidad de enzimas apropiadas, a las condiciones físicas y químicas en que se cultiva y a las características de composición de polisacáridos complejos del material que habrá de degradarse (Yasmeen y col., 2013). Dentro de las especies conocidas de basidiomicetes, *Phanerochaete chrysosporium* ha sido considerado el de mayor eficiencia debido a su alta tasa de crecimiento y a que es capaz de biodegradar la lignina (Kumari y Singh, 2018). Dentro de los factores que más afectan la degradación de lignina son el contenido de humedad, el tamaño de partícula, la temperatura y el tiempo de pretratamiento (Wan y Li, 2012). A pesar de las bondades de

este método de pretratamiento como son gran tolerancia a condiciones ambientales, poca cantidad de energía consumida y pocos requerimientos químicos, el pretratamiento biológico aún enfrenta algunas desventajas por las cuales aún no ha sido extensivamente utilizado, entre ellas, requerimientos grandes de espacio, largo tiempo de proceso y la necesidad de un monitoreo constante del crecimiento de microorganismos continuamente (Kumari y Singh, 2018).

5) Solventes orgánicos y hongos

En este tipo de pretratamiento se usan en combinación solventes orgánicos y hongos, los primeros para hidrolizar la hemicelulosa y los segundos para la descomposición de la lignina. En estudios con etanol como solvente y hongos basidiomicetes como *Ceriporiopsis subvermispora, Dichomitus squalens, Pleurotus ostreatus, Coriolus versicolor* y *Phanerochaete chrisosporium,* etc. El pretratamiento biológico puede ahorrar hasta un 15% de la energía requerida en el sistema. El etanol utilizado puede reutilizarse y no representa riesgo para el ambiente (Itoh y col., 2003).

b Hidrólisis enzimática y fermentación

1) Características de la hidrólisis enzimática

La hidrólisis de celulosa, también conocida como sacarificación, es un proceso en el cual se convierte la celulosa en glucosa. La hidrólisis enzimática es clave para una producción rentable de etanol a partir de sustratos lignocelulósicos a largo plazo, ya que es un proceso benigno con el medio ambiente, produce altos rendimientos y sus costos de mantenimiento son bajos en comparación con los tratamientos con ácidos o álcalis. El proceso es compatible con la mayoría de los métodos de pretratamiento, pero cuando los sustratos provienen de pretratamientos químicos, requiere la eliminación de compuestos tóxicos e inhibitorios de las enzimas. Los factores que más afectan el proceso de sacarificación enzimática son: la concentración de sustrato, la carga de enzimas, la temperatura y el tiempo de sacarificación (Saini y col., 2015).

2) Procesos utilizados (SHF,SSF, SSCF y CBP)

Los tipos de procesos más empleados en la fermentación e hidrólisis de lignocelulósicos son la sacarificación y fermentación simultánea (SSF) y la hidrólisis y fermentación separadas (SHF). Recientemente han emergido nuevos bioprocesos integrados como la sacarificación y cofermentación simultáneos (SSCF) y el bioproceso consolidado (CBP) (Den Haan y col., 2015). La Figura 5 esquematiza los cuatro tipos de bioprocesos mencionados. El SHF es un proceso en dos etapas, en el que la hidrólisis y la fermentación operan por separado, es decir, la biomasa lignocelulósica pretratada se degrada primero en unidades de monómero (glucosa y xilosa) a través de enzimas, seguido de la fermentación de estos azúcares en etanol. Después del pretratamiento de la lignocelulosa, se separa la fase líquida, que contiene principalmente pentosas y algunas hexosas, de la fase sólida que contiene básicamente lignina y celulosa. Luego, la celulosa se hidroliza mediante la adición de celulasas. En el SHF tanto la hidrólisis como la fermentación toman lugar por separado a sus respectivas temperaturas óptimas (50 °C para la hidrólisis y 28–32 °C para la fermentación), utilizándose microorganismos adecuados para las fermentaciones tanto de hexosas como de pentosas. Sin embargo, sigue siendo un inconveniente la acumulación de azúcares que inhiben la actividad enzimática, lo que finalmente afecta el rendimiento de etanol (Saini y col., 2015; Rastogi y Shrivastava, 2017). La necesidad de fermentaciones separadas se debe a que para la fermentación de pentosas se utilizan microorganismos que metabolizan hexosas y pentosas más lentamente que aquéllos que sólo asimilan hexosas. Además, estos microorganismos también son más sensibles al etanol y a los inhibidores. La acumulación de azúcares liberados (glucosa y celobiosa) durante la hidrólisis enzimática inhibe la actividad celulasa. El efecto inhibidor de la celobiosa sobre la celulasa es considerablemente mayor que el de la glucosa (Busic y col., 2018).

Al realizar la hidrólisis y la fermentación en un solo biorreactor, durante la SSF, los azúcares liberados de la hidrólisis enzimática son inmediatamente utilizados por el microorganismo.

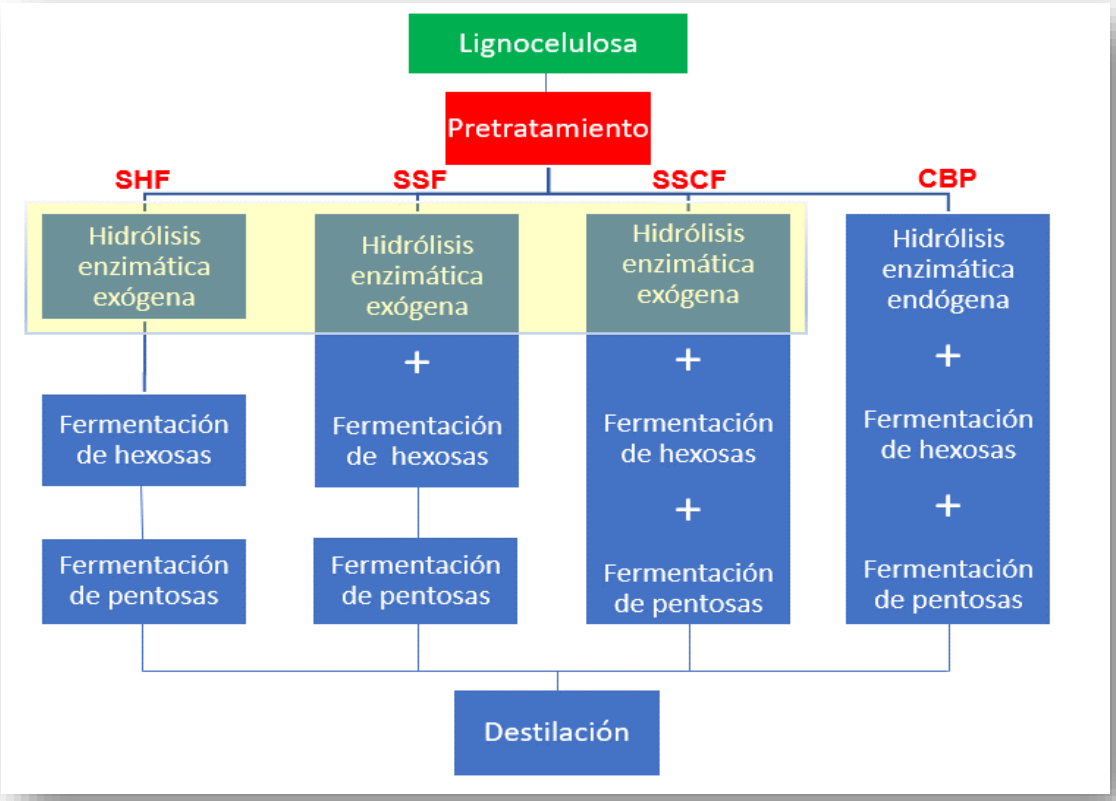


Figura 5. Configuraciones de procesamiento de lignocelulosa para su conversión en etanol. SHF, hidrólisis y fermentación separadas; SSF, sacarificación y fermentación simultáneas; SSCF, sacarificación y cofermentación simultáneas; CBP: bioproceso consolidado (modificado de Den Haan y col. (2015)).

Por lo tanto, en el caldo hay concentraciones de azúcar relativamente bajas y por ello se reduce la inhibición de la celulasa por los azúcares liberados. La temperatura frecuentemente utilizada para la SSF (alrededor de 38 °C) está alejada a la óptima para hidrólisis (45–50 °C, realizada por *T. reesei*) y la de fermentación (30 °C, efectuada por *S. cerevisiae*). Para acercar la temperatura de fermentación a la temperatura óptima de hidrólisis, se han probado levaduras y bacterias termotolerantes, como *Kluyveromyces marxianus* y *K. fragilis* las cuales presentan la más alta productividad de etanol a 42 °C (Ballesteros y col., 1991).

Tradicionalmente se ha empleado más el proceso SHF, pero el SSF es superior para la producción de etanol, ya que puede mejorar los rendimientos obtenidos al remover los compuestos inhibidores del producto final y eliminar la necesidad de reactores separados. El coeficiente de rendimiento de etanol superior de la SSF se debe en parte a una mayor conversión de xilosa a xilitol en las condiciones de SSF. Los estudios han demostrado que SSF es una mejor alternativa que el SHF. El consumo lento de xilosa durante la fermentación en SHF puede deberse a la presencia de compuestos tóxicos que inhiben el crecimiento y la fermentación del microorganismo (Saini y col., 2015). Los inconvenientes de la SSF se pueden eliminar mediante el uso de microorganismos termotolerantes como *Kluyveromyces marxianus* que soporta las temperaturas más altas utilizadas durante la hidrólisis enzimática (Buaban y col., 2010).

Además de la SSF y la SHF, existen alternativas como el bioproceso consolidado (CBP) y la sacarificación simultánea y cofermentación (SSCF) (Cardona y Sánchez, 2007). En el CBP, la producción de celulasa, la hidrólisis de la biomasa y la fermentación del etanol se llevan a cabo todas juntas en un solo reactor. El proceso también se conoce como conversión microbiana directa (DMC), y en él se utiliza un mono o cocultivo de microorganismos para fermentar celuCuadrolosa directamente a etanol. Una ventaja del CBP es que requiere menores gastos en inversión de equipo y de adquisición o producción de enzimas. Diversas bacterias como *Clostridium thermocellum* y algunos hongos como *Neurospora crassa*, *Fusarium oxysporum* y *Paecilomyces* sp.

han mostrado adaptarse a un CBP, sin embargo, este bioproceso no es aún eficiente debido a los bajos rendimientos de etanol y los largos períodos de fermentación (Sarkar y col., 2012; Bilal y col., 2018).

En la SSCF los microorganismos deben ser compatibles en términos de pH operativo y temperatura. Se ha reportado por ejemplo, buenos resultados con una combinación de *Candida shehatae* y *Saccharomyces cerevisiae* (Neves y col., 2007). También se ha empleado la fermentación secuencial con dos microorganismos diferentes en distintos períodos de tiempo del proceso de fermentación para una mejor utilización de las hexosas por parte de *S. cerevisiae* en la primera fase y en la segunda de las pentosas por parte de *C. shehatae*, pero los rendimientos de etanol alcanzados no son altos (Sánchez y col., 2006). Algunos microorganismos nativos o de tipo salvaje utilizados en la fermentación. son *S. cerevisiae*, *Escherichia coli, Zymomonas mobilis, Pachysolen tannophilus, C. shehatae, Pichia stipitis, Candida brassicae* y *Mucor indicus* (Sarkar y col., 2012). En el Cuadro 2 se muestran algunos de los procesos utilizados para la producción de etanol de segunda generación más representativos y los rendimientos obtenidos (Busic y col., 2018).

4 Fuentes de biomasa lignocelulósica

El concepto de biomasa se empezó a utilizar primeramente en la ecología, pero hoy en día es cada vez más usado en el ámbito de los recursos naturales y la industria. Se entiende como biomasa a los materiales orgánicos renovables, incluidos los productos y los desechos agrícolas, residuos de madera y animales, desechos urbanos y plantas acuáticas. Básicamente, la biomasa se sintetiza a través de la fotosíntesis de la energía solar, el agua y dióxido de carbono.

Cuadro 2. Bioprocesos para la producción de etanol de lignocelulosa

Fuente de lignocelulosa	Pretratamiento	Microorganismo	Bioproceso	Y_{etanol} (g/L)	*E* (%)	P_{max} G $L^{-1}h^{-1}$	Condiciones optimizadas	Ref
Bagazo de caña de azúcar	H_2SO_4 diluido seguido de deslignificación alcalina (NaOH), complejo de celulasa obtenida de *T. reesei*	*Saccharomyces cerevisiae* recombinante con gen para β-glucosidasa de *Humicola grisea*	SSF en Batch	51.7	-	0.94	-	1
Bagazo	H_3PO_4 con enzima Accellerase® 1500	*Z. mobilis* ATCC 29191 inmobilizado con alginato de calcio (AC) y alcohol polivinílico (APV)l	SHF	6.24 5.44	70.09 68.95	1.31 1.27	APV AC	2
Madera de *Eucaliptus globulos*	Organosolv (50% EOH, 200 °C, 45 min), celulasa y β-glusidasa	*S. cerevisiae* IR2T9-a	SSF	42	-	-	15% de sustrato 20 FPU de celulosa y 40 UI de β-glucosidasa	3
Paja de arroz	NaOH con enzima Accellerase® 1500	*S. cerevisiae, Candida tropicalis, S. stipitis*	SSCF en batch	28.6	86	-	*S. cerevisiae* / *S. stipitis* (3:1) agitación 116 rpm, 33.1 °C	4
Rastrojo de maíz	AFEX y mezcla de celulasas Pectinasas comerciales	*S. cerevisiae* Y35 genéticamente modificada	SHF SSCF	45.5 51.3	-	0.87 0.76	30 °C, 9% glucanos 35 °C 9% glucanos	5
Material celulósico, β-glucanos	-	*Kluyveromyces marxianus* K1 genéticamente modificado	CBP	4.24	92.2	0.55	48 °C	6
Rastrojo de maíz	AFEX	*Clostridium phytofermentans* (ATCC 700394)	CBP	7.0	-	-	4% de glucanos sin suplementación de nutrientes	7

E=eficiencia del bioproceso (*E*=*YP*/*S*/*YP*/*ST*.100; *YP*/*S*=coeficiente de conversión de sustrato en etanol (g C2H5OH/g azúcar), *YP*/*ST*=coeficiente teórico de conversión de sustrato en etanol (g C2H5OH/g azúcar), P_{max}=productividad máxima de etanol en el bioproceso. 1 (Ferreira y col., 2010); 2 (Wirawan y col., 2012); 3 (Yáñez-S y col., 2013); 4 (Suriyachai y col., 2013); 5 (Jin y col., 2013); 6 (Yanase y col., 2010); 7 (Jin y col., 2012).

La biomasa es considerada como un recurso renovable muy abundante. La energía solar capturada por la biomasa es suficiente para abastecer las necesidades de 1.5 x 10^{11} personas, más de 28 veces la población actual del mundo (Chen, 2014).

Los recursos de la biomasa, desde el punto de bioconversión, incluyen principalmente sustancias que almacenan energía, tales como proteínas, almidón y lípidos, así como también a los principales componentes de las paredes celulares vegetales, tales como celulosa, hemicelulosa y lignina (lignocelulosas). La proteína, almidón, y la grasa se han utilizado en el pasado ampliamente y de manera eficiente, mientras que las tres últimas están muy subutilizadas. La lignocelulosa es la más abundante materia orgánica renovable en la tierra. Una cantidad y variedad enorme de biomasa existe desde el bosque hasta el mar y constantemente se produce nueva mediante la fotosíntesis. De acuerdo con estadísticas, hay cerca de 1.8 x 10^{11} toneladas de biomasa sobre tierra, casi la misma cantidad bajo tierra y 4.0 10^{7} toneladas en los océanos. La mayoría de la lignocelulosa natural se descompone y se transforma por la acción de una variedad de microbios en el entorno natural y en última instancia se convierte en CO_2 y H_2O. Es una parte importante del ecosistema del ciclo del carbono, pero, sin duda, es un gran desperdicio para los seres humanos desde el punto de vista de la utilización de los recursos naturales (Chen, 2014). El etanol de segunda generación utiliza diferentes tipos de materiales lignocelulósicos como sustrato (Cuadro 3). Según Cardona y Sánchez (2007) la biomasa lignocelulósica se puede clasificar en 6 grupos:

- Residuos agrícolas: paja de cereal, bagazo de caña de azúcar, etc.
- Maderas duras: angiospermas como álamo, chopo, etc.
- Maderas blandas: gimnospermas como pino, abeto, picea, etc.
- Residuos celulósicos: residuos de papel, residuos de industrias de la madera y el papel, etc.
- Biomasa herbácea: Alfalfa, alpiste, pastos, etc.
- Residuos sólidos urbanos (Levasseur y col.).

Cuadro 3. Clasificación de materias lignocelulósicas por su origen

Origen	Tipo	Ejemplos
Residuos agrícolas	Agrícolas	Paja de cereal, bagazo de caña de azúcar, residuos de frutas, etc.
Restos de tratamientos silvícolas y forestales	Maderas duras	Angiospermas como álamo, chopo, etc.
	Maderas blandas	Gimnospermas como pino, abeto, picea, etc.
Residuos de industrias forestales	Celulósicos industriales	Residuos de las industrias del papel y la madera
Cultivos energéticos	Agrícolas	Alfalfa, cardo, alpiste, maíz, pastos, sorgo, girasol, etc.
	Forestales	Sauces, eucaliptos, robinias, etc.
Residuos sólidos urbanos	Lignocelulósicos urbanos	Papel, cartón, etc.

Las características deseables de las plantas de los cultivos energéticos incluyen: alto rendimiento de biomasa, un nivel elevado de contenido de azúcar, facilidad y rapidez de crecimiento, tolerancia a la sequía, a las altas temperaturas, inundaciones y estrés salino y bajos requerimientos de insumos (David y Marcia, 2008). La mayoría de los candidatos para cultivos energéticos son plantas de metabolismo C4, C3, y plantas herbáceas perennes.

En los EE.UU., *Miscanthus* y *Virgatum* son los cultivos energéticos principales que se han seleccionado para la producción de etanol (Clifton-Brown y Lewandowski, 2002; Keshwani y Cheng, 2009). En los países asiáticos, el sorgo dulce y *Miscanthus* se cultivan en China (Xie y Peng, 2011), mientras que la caña de azúcar silvestre es una planta prometedora en la India. En Tailandia, las variedades de yuca amarga se han promovido para la producción de etanol, debido a sus insumos mínimos para el crecimiento, posibilidad de plantación y cosecha durante todo el año y alto contenido de carbohidratos. Otros cultivos prometedores incluyen al álamo, sauce, la alfalfa, cáñamo y el jacinto de agua, que por su crecimiento en agua tiene una ventaja potencial sobre las plantas que compiten por uso de la tierra (Kumar y Sarma, 2013; Chen, 2014). En este mismo sentido, debido a la alta productividad agrícola de *Moringa oleifera*, es una opción interesante, ya que esta planta en zonas tropicales es capaz de producir hasta 600 toneladas anuales de biomasa fresca, equivalentes a 120 toneladas de biomasa seca (Foidl y col., 2001; Sánchez y col., 2006).

5 Composición de la lignocelulosa

La celulosa, la hemicelulosa y la lignina, constituyen los principales componentes de las paredes celulares de las plantas. La suma de estos tres componentes representa aproximadamente el 80% del peso total de las materias primas; correspondiendo a la celulosa de un 30 a 35%, a la hemicelulosa de 25 a 30% y a la lignina 10%. Además de los tres componentes principales, contiene proteínas, lípidos, cenizas, agua, pectina, carbohidratos de bajo peso molecular y otros compuestos (Chen, 2014). En la naturaleza no hay homogeneidad en la estructura biológica de los compuestos lignocelulósicos, lo que significa que cada tallo, hoja, espina, vaina, etc. difiere

en la composición química y la morfología de su fibra. Por lo general, el rastrojo o paja se cosecha sin separar los diferentes órganos, lo que resulta en la coexistencia de varios órganos y tejidos. En el caso de la madera, por ejemplo, la parte utilizada es el xilema del tronco después del proceso de pelado. Las características estructurales y composiciones de la lignocelulosa de diversos órganos, tejidos y células difieren significativamente, lo que obliga a utilizar diferentes tecnologías para su aprovechamiento.

a Celulosa

La celulosa (23-50% en peso de la materia seca de la biomasa lignocelulósica) es un compuesto macromolecular con la fórmula $(C_6H_{10}O_5)_n$, polisacárido homogéneo insoluble en agua que consiste en una cadena lineal de varios cientos hasta 15,000 unidades de β-d-glucosa unidas por enlaces glicosídicos β-1,4 (Figura 6). Las moléculas de celulosa a menudo existen en estado de agregación, disponiéndose juntas. La estructura de la celulosa por lo general incluye una región cristalina y una amorfa. Tiene extremos reductores y no reductores, y es extremadamente resistente a la degradación. La fuerza de la celulosa se debe a muchos grupos hidroxilo en la estructura de la glucosa que contribuyen a la formación de enlaces intramoleculares masivos (enlaces entre unidades de glucosa de la misma molécula) y enlaces de hidrógeno intermoleculares (entre unidades de glucosa de moléculas adyacentes), que son responsables de rigidez. Los enlaces intramoleculares son responsables de la formación de fibrillas (Figura 7), que son estructuras muy ordenadas. Según el grado de organización de los enlaces entre las cadenas de celulosa, la estructura puede ser cristalina (muy ordenada) o amorfa (menos ordenada). Las regiones amorfas pueden absorber agua más fácilmente y son más susceptibles a la acción enzimática (Machado Pasin y col., 2020).

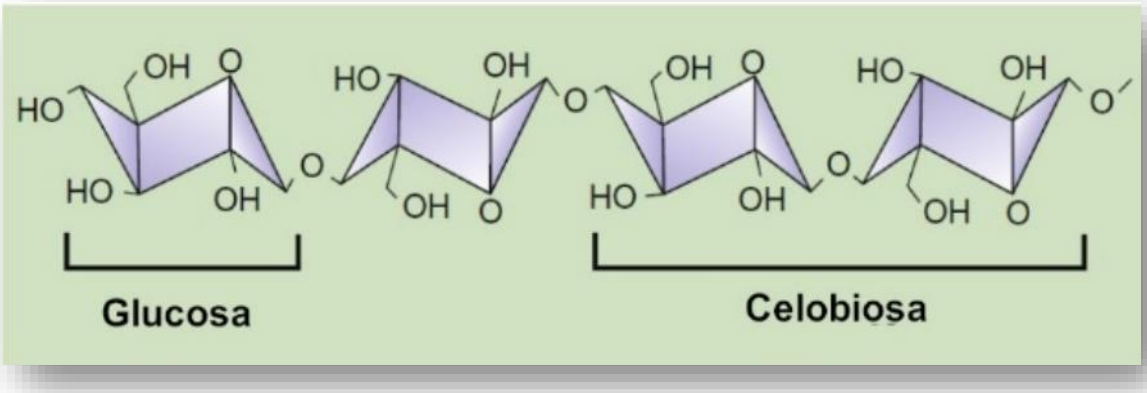


Figura 6. Estructura de la celulosa (Modificado de Chen (2014)).

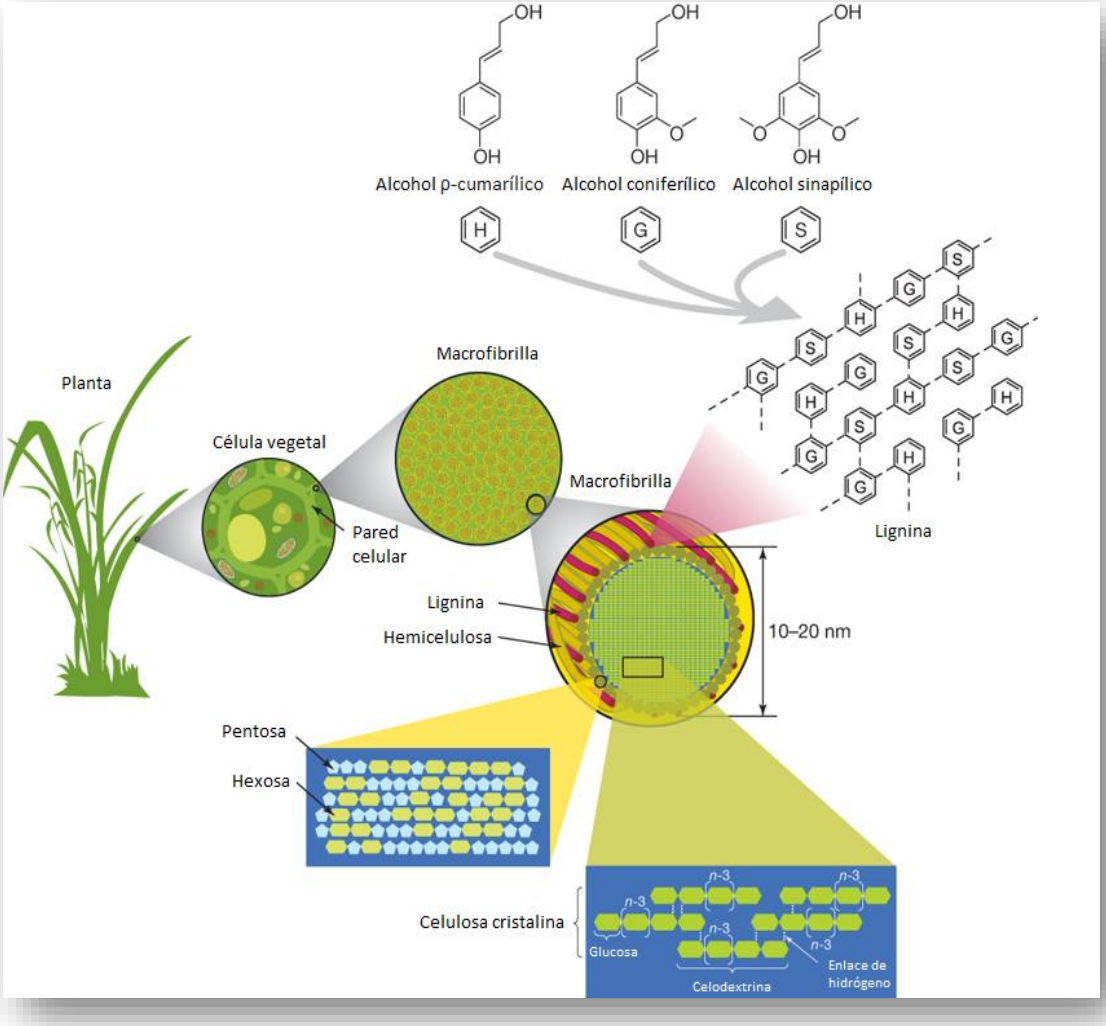


Figura 7. Estructuras de la celulosa, hemicelulosa y lignina (adaptado de Rubin (2008)).

b Hemicelulosa

La hemicelulosa (15 a 45% en peso de material lignocelulósico seco) es un glucano heterogéneo con una cadena lateral corta compuesta por dos o más monosacáridos, que incluyen principalmente aldopentosas (xilosa y arabinosa) y aldohexosas (glucosa, manosa y galactosa). Esta macromolécula también contiene desoxihexosas y ácidos, como ácido β-d-galacturónico, ácido d-4-O-metilglucurónico y ácido β-d-glucurónico. A diferencia de la celulosa, la hemicelulosa tiene una masa molecular baja (100 a 200 unidades glicosídicas) y no contiene regiones cristalinas, lo que facilita su hidrólisis en condiciones no drásticas (Polizeli y col., 2005). En general, la hemicelulosa es el más complejo de los componentes lignocelulósicos de la pared celular ya que forma enlaces covalentes (principalmente enlaces α-bencil-éter) con lignina y un enlace éster con unidades de acetilo y ácidos hidroxicinámicos. La hemicelulosa está presente en la pared celular de las plantas y en ella forma un gel acuoso en el cual están embebidas las microfibrillas de celulosa. Las cadenas de polisacáridos de la hemicelulosa cumplen el papel de suministrar la unión entre la celulosa y la lignina. La hemicelulosa puede ser divida en dos grupos: celulosanos y poliurónidos. Los celulosanos están formados por azúcares simples formando cadenas centrales de pentosas (xilosa y arabinosa) o de hexosas con ramificaciones cortas (manosa, galactosa y glucosa). Las cadenas de hemicelulosa no son lineales, tienen ramificaciones laterales y no tienen una estructura regular; este polímero no es cristalino y por ello es fácilmente hidrolizado. Mientras que la celulosa mantiene siempre una misma estructura y composición, la hemicelulosa cambia mucho entre las especies de plantas. Ésta posee propiedades adhesivas y se hincha en presencia de agua. La hemicelulosa se clasifica según su composición de cadenas de azúcar. Así, el término hemicelulosa no denota un compuesto químico definido, más bien, un conjunto de componentes poliméricos presentes en plantas fibrosas donde cada componente tiene propiedades diferentes. El principal componente de la hemicelulosa es el xilano, que es un polímero β-1,4 de xilosa con varios residuos ramificados (Polizeli y col., 2005; Machado Pasin y col., 2020).

La hemicelulosa es un heteropolisacárido (15 a 45% en peso de material lignocelulósico seco) con cadenas ramificadas de monosacáridos, que incluyen principalmente aldopentosas (xilosa y arabinosa) y aldohexosas (glucosa, manosa y galactosa). Esta macromolécula también contiene desoxihexosas y ácidos, como ácido β-d-galacturónico, ácido d-4-O-metilglucurónico y ácido β-d-glucurónico (Polizeli y col., 2005). La variedad de enlaces y ramificaciones, así como la presencia de diferentes unidades monoméricas, contribuye a la complejidad de la estructura hemicelulósica y sus diferentes conformaciones. A diferencia de la celulosa, la hemicelulosa tiene una masa molecular baja (100 a 200 unidades glicosídicas) y no contiene regiones cristalinas, lo que facilita su hidrolización en condiciones no drásticas (Polizeli y col., 2005). Existen diferentes tipos de hemicelulosa, como xilano, arabinano, arabinoxilano, acetilglucuronoxilano, galactoglucomanano, glucomanano, arabinogalactano, galactomanano y xiloglucano. La hemicelulosa se clasifica según su composición de cadenas de azúcar. Así, el término hemicelulosa no denota un compuesto químico definido, más bien, un conjunto de componentes poliméricos presentes en plantas fibrosas donde cada componente tiene propiedades diferentes. El principal componente de la hemicelulosa es el xilano, que es un polímero β-1,4 de xilosa con varios residuos ramificados. La celulosa y la hemicelulosa están vinculados principalmente a través de enlaces de hidrógeno. Además de la fuerte estructura interna de la lignina debido a los puentes de hidrógeno, existe un complejo lignina-carbohidratos estable (Polizeli y col., 2005).

c Lignina

La lignina no puede ser considerada un azúcar y no es propicia para la bioconversión en las rutas metabólicas de los azúcares. Sin embargo, juega un papel importante en el éxito o fracaso de las tecnologías de hidrólisis de la lignocelulosa, ya que impide el acceso a la celulosa (Machado Pasin y col., 2020). Es un polímero fenólico con una estructura tridimensional formada principalmente de tres alcoholes hidroxicinamílicos o monolignoles (ρ-hidroxifenil propano o alcohol p-cumarílico; guaiacil propano o alcohol coniferílico; siringil propano o alcohol sinapílico), por la generación de radicales

libres, seguido por procesos químicos de acoplamiento (Sun y Cheng, 2002). La lignina es la principal responsable de la rigidez en las paredes de las células vegetales y se acumula en la lámina media de esta donde su concentración puede llegar a ser del 75%; también puede llegar a ser una protección frente al ataque de gérmenes patógenos y agresiones mecánicas (Chen, 2014).

d Otros componentes

Estos incluyen los materiales no mencionados en los apartados anteriores. Estos componentes suelen clasificarse en extraíbles y no extraíbles, según su solubilidad en agua o solventes orgánicos. Entre los extraíbles están los terpenos que son polímeros de isopreno y su importancia radica en que son fuente de terpenina, utilizadas en la industria; las resinas, donde se consideran una gran variedad de compuestos no volátiles tales como ácidos grasos, grasas, alcoholes, resinas ácidas, fitosterol, y otros; y los fenoles, donde se encuentran los taninos. Dentro de la fracción extraíble en agua se encuentran carbohidratos de bajo peso molecular, alcaloides y lignina soluble. Entre los no extraíbles, se encuentran las sustancias minerales o cenizas. Son principalmente carbonatos alcalinos, alcalinotérreos, y oxalatos. Otros materiales como la sílice que se deposita en forma de cristal, almidón, pectina y proteínas se encuentran dentro de esta clasificación (Sluiter y col., 2010; Montaño-Morales, 2014; Ayeni y col., 2015).

6 Componentes de la lignocelulosa en plantas y residuos

En el Cuadro 4 se muestran la composición de la lignocelulosa de diversos residuos agrícolas, forestales e industriales. En la naturaleza hay una gran variabilidad en la composición de la lignocelulosa y su estructura. Los pastos tienden a presentar un contenido similar de celulosa y hemicelulosa, con una proporción menor de lignina, mientras que en las maderas predominan la celulosa, el contenido de hemicelulosa disminuye, aumentando a la vez el de lignina (Saini y col., 2015).

Cuadro 4. Composición de la lignocelulosa de diversos orígenes

Especies	Celulosa	Hemicelulosa	Lignina	Cenizas	Extraíbles
Paja de arroz	28–36	23–28	12–14	14–20	6.1
Paja de cebada	31–45	27–38	14–19	2–7	–
Paja de avena	38.5	31.7	16.8	6.1	4.6
Mazorca de maíz	43.2	31.8	14.6	2.2	4.2
Rastrojo de maíz	38–40	28	7–21	3.6–7.0	–
Tallos de maíz	39–47	26–31	3–5	12–16	–
Paja de sorgo	27	25	11	–	–
Bagazo de sorgo dulce	34–45	18–28	14–22	–	–
Fibra de coco	36–43	0.15–0.25	41–45	2.7–10.2	–
Bagazo de caña	32–48	19–24	23–32	1.5–5	–
Pastos	25–40	25–50	10–30	–	–
Pasto español	35.8	28.7	17.8	6.5	6.1
Pulpa de betabel	18.4	14.8	5.9	3.7	5.9
Fibra de coque	60.4	20.8	12.4	2.5	3.7
Algas	20–40	20–50	–	–	–
Algodón	80–95	5–20	–	–	–
Maderas duras	45	30	20	0.6	5
Corteza de maderas duras	22–40	20–38	30–55	0.8	6
Maderas blandas	42	27	28	0.5	3
Corteza de maderas blandas	18–38	15–33	30–60	0.8	–
Papel periódico	40–55	25–40	18–30	–	–
Pulpa cruda de papel	60–80	20–30	2–10	–	–

Fuentes: Chen (2014) y Saini y col. (2015).

7 Enzimas lignocelulolíticas

En la naturaleza la degradación de la biomasa lignocelulósica es lograda por una mezcla de enzimas hidrolíticas producidas por microorganismos, tales como bacterias y hongos aerobios, anaerobios, mesofílicos y termofílicos, que cuentan con la capacidad enzimática necesaria para dicho propósito (Bilal y col., 2018).

En la actualidad existe un gran interés a nivel mundial en la búsqueda de microorganismos que degraden la biomasa lignocelulósica y en el estudio de los mecanismos enzimáticos, ya que tienen el potencial de convertir la biomasa vegetal, como los residuos agrícolas y agroindustriales, en azúcares fermentables, que pueden ser aprovechados para la producción de biocombustibles y otros bioproductos de gran interés (O'Hara, 2016)La lignocelulosa se compone principalmente de celulosa, hemicelulosas y lignina. Los organismos degradadores de celulosa son capaces de utilizar la lignocelulosa como materia prima para el crecimiento, la reproducción y la bioconversión. Tanto microorganismos (bacterias, hongos y actinomicetos) como animales pueden ser usados como organismos degradadores de lignocelulosa (Busic y col., 2018). Las bacterias producen bajos niveles de celulasas, la mayoría de ellas son endoglucanasas que no son activas en la celulosa cristalina. Los hongos están bien caracterizados como los principales grupos de microorganismos degradadores de celulosa. Las lignocelulasas producidas a partir de hongos son principalmente enzimas hidrolíticas extracelulares entre las que se incluyen celulasas, hemicelulasas, pectinasas, amilasas y ligninasas (Chen, 2014).

8 Mecanismos de degradación enzimática de la lignocelulosa

El mecanismo de la degradación de la lignocelulosa por hongos se puede dividir en dos categorías principales: oxidativa e hidrolítica. En el mecanismo oxidativo, la lignina se degrada por los hongos a través de la producción de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO o ROS), principalmente radicales hidroxilo. Muchos hongos son conocidos por producir peróxido de hidrógeno por la acción de enzimas tales como glioxal oxidasa, piranosa oxidasa-2, y aril-alcohol oxidasa, respectivamente (Martínez y col., 2009). El peróxido de

hidrógeno reacciona entonces con el hierro a través de la reacción de Fenton para producir radicales hidroxilo. Estos radicales degradan la lignina y producen productos de bajo peso molecular (Saini y col., 2015; Kumar y Chandra, 2020). Otro grupo de enzimas que degradan la lignina son las lacasas y las manganeso peroxidasas (MnP). La lacasa es una oxidasa multicobre que puede catalizar la formación de radicales libres que degradan la lignina. Así mismo, la manganeso peroxidasa oxida Mn^{+2}en Mn^{+3} por hidrólisis de peróxido de hidrógeno (Nüske y col., 2002). El Mn^{+3} es un potente oxidante que degrada la lignina. Durante los mecanismos hidrolíticos, los hongos producen enzimas que degradan enlaces glucosídicos en celulosa y hemicelulosa liberando azúcares monoméricos. La degradación de la celulosa se logra mediante la acción sinérgica de tres clases de enzimas hidrolíticas: endo-(1,4)–β glucanasa (endocelulasa), celobiohidrolasa (exocelulasa), y β-glucosidasa (Baldrian y Valášková, 2008). La degradación de la hemicelulosa se consigue por la acción de enzimas hidrolíticas tales como endo-xilanasas, endo-α-L-arabinasa, endo-mananasa, β-galactosidasa y β-glucosidasas. La lignocelulosa es degradada por acción sinérgica de estas dos vías (Machado Pasin y col., 2020).

a Celulasas

El término de celulasa normalmente se refiere a un conjunto de enzimas involucradas en la hidrólisis completa de la celulosa. Las celulasas conducen a la despolimerización de la celulosa en glucosa. Ya que la celulosa es el polímero más abundante de la biomasa lignocelulósica, las celulasas son las principales enzimas implicadas en su degradación. La hidrólisis de la celulosa insoluble requiere de la acción sinérgica de tres tipos de enzimas: la endoglucanasa (1,4-β-D-glucan-4-glucanohydrolasa; EC 3.2.1.4), la exoglucanasa (1,4-β-D-glucano celobiohidrolasa; celobiohidrolasa; EC 3.2.1.91) y la β-glucosidasa (β-glucósido glucohidrolasa; celobiasa; EC 3.2.1.21)., las cuales se agrupan en la clase EC 3.2.1.X. (Kumar y col., 2014; Saini y col., 2015).

Los microorganismos degradadores de celulosa incluyen hongos, actinomicetos, bacterias, protozoos y otros. La habilidad de los hongos para la

descomposición es especialmente fuerte; entre éstos se destacan algunos ascomicetos, adelomicetos y basidiomicetos. Dentro de los más utilizados industrialmente destacan, entre las bacterias, *Streptomyces*, *Ruminococcus*, *Clostridium* (López-Contreras y col., 2004), *Pseudomonas fluorescens* (Sethi y col., 2013), *Rhodothermus marinus*, *Acidothermus* sp., *Bacillus subtilis* CEL PTK1 (Bai y col., 2012), *Bacillus subtilis* AS3 (Deka y col., 2011). Las actinomicetos más utilizados se incluyen entre otros *Cellulomonas fimi*, *C. bioazotea*, *Streptomyces* sp. (Imran y col., 2016), y, entre los hongos, sobresalen *Trichoderma reesei*, *T. longibrachiatum*, *T. harzianum*, *Aspergillus niger*, *A. nidulans*, *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, etc.(Sukumaran y col., 2005; Imran y col., 2016).

1) Endoglucanasas

Las endo-β-(1,4)-glucanasas comúnmente denominadas endoglucanasas, se caracterizan por realizar hidrólisis aleatoria de los enlaces β-(1,4)-glucosídicos, actuando sobre derivados solubles de celulosa. Esta división aleatoria provoca una rápida disminución de la longitud de cadena y, por lo tanto, cambios en la viscosidad en relación con la liberación de los grupos finales reductores. Al actuar sobre celodextrinas, la tasa de hidrólisis aumenta con el grado de polimerización dentro de los límites de solubilidad del sustrato, siendo la celobiosa y la celotriosa los principales productos finales. Dentro de las CBH se pueden mencionar las CBH I, las cuales inciden sobre el extremo reductor de la celulosa y las CBH II, que liberan celobiosa desde el otro extremo. Las glucohidrolasas, un tipo menos común de CBH, liberan glucosa desde los extremos de la cadena. La β-glucosidasa, que en realidad no es una celulasa, es muy importante, ya que interviene en la hidrólisis de celobiosa para producir dos moléculas de glucosa (Saini y col., 2015).

En el Cuadro 5 se presentan los hongos, bacterias y actinomicetos más comúnmente utilizados para la producción de celulasas, en especial endoglucanasas. Algunos ejemplos destacados son *Fusarium* spp., *Penicillum* spp., *Trichoderma* spp., *Streptomyces.*

Cuadro 5. Microorganismos utilizados industrialmente para la producción de endoglucanasas

Grupo	Microorganismo
Hongos	*Agaricus bisporus, Aspergillus niger, A. fumigatus, A. oryzae, A. terreus, A. wentii, A.aculeatus, A. awamori, Chaetomium cellulyticum; C. thermophilum, Daldinia eschscholzii, Fomitopsis sp., Fusarium solani, F. oxysporum, Ganoderma* spp.*, Humicola insolens, H. grisea, Lentinus* spp.*, Macrophomina phaseolina, Melanocarpus albomyces, Mucor circinelloides, Paecilomyces inflatus, Penicillium pinophilum, P. chrysogenum, P. occitanis, P. purpurogenum, Phanerochaete chrysosporium, Phlebia gigantean, Pleurotus ostreatus, Polyporus* spp.*, Pycnoporus* spp.*, Trametes, Pyrenochaeta lycopersci, Rhizopus stolonifer, R. oryzae, Schizophyllum commune, Trametes versicolor, Trichoderma reesei, T. atroviride, T. viridae, T. harzianum, Thermoascus aurantiacus*
Bacterias	*Acetivibrio cellulolyticus, Acinetobacter junii, A. amitratus, Anoxybacillus sp., Bacillus subtilis, B. pumilus, B. amyloliquefaciens, B. licheniformis, B. circulan, B. flexus, B. agaradhaerens, Bacteriodes cellulosolvens, Butyrivibrio fibrisolvens, Cellvibrio gilvus, Clostridium thermocellum; C. cellulolyticum; C. acetobutylium; C. cellulofermentans, C. cellulovorans, Eubacterium cellulolyticum, Geobacillus sp., Fibrobacter succinogenes, Microbispora bispora, Paenibacillus campinasensis, P. polymyxa, Pectobacterium chrysanthemi, Pseudomonas fluorescens, Rhodothermus marinus, Ruminococcus albus, R. succinogenes, Thermotoga maritime*
Actinomicetes	*Cellulomonas fimi, C. flavigena, C. cellulans, C. uda, Streptomyces cellulyticus, S. aureofaciens, Thermomonospora fusca, T. curvata, Thermobifida fusca, T. Cellulolytica*

Entre los basidiomicetes se pueden mencionar especies de los géneros *Ganoderma, Lentinus, Phanerochaete, Pleurotus, Polyporus, Pycnoporus, Schizophyllum y Trametes* (Kuhad y col., 2011; Kumar y col., 2014).

2) Exoglucanasas

Se conocen dos tipos de exoglucanasas. La más común, la exo-β-(1-4)-glucanasa o 1,4-β-D-glucano celobiohidrolasa (EC 3.2.1.91), escinde las unidades de celobiosa de los extremos no reductores de las moléculas de celulosa. La segunda, la exo-β-(1,4)-glucosidasa, o 1,4-β-D-glucano glucohidrolasa (EC 3.2.1.74) separa sucesivamente unidades de glucosa del extremo no reductor del glucano. Se distinguen de la β-glucosidasa por su preferencia por sustratos de mayor longitud de la cadena y por la inversión de sus productos (Chen, 2014; Saini y col., 2015).

3) β-glucosidasas

Las β-glucosidasas (BG) o β-D-glucósido glucohidrolasas, (EC 3.2.1.21) hidrolizan la celobiosa y otras cadenas muy cortas de β -1,4-oligoglucósidos para formar glucosa. La mayoría de la β-glucosidasas son activas para los dímeros β de glucosa. A diferencia de las exoglucosidasas, la tasa de hidrólisis de la celobiosa disminuye notablemente a medida que el grado de polimerización del sustrato aumenta (Saini y col., 2015). La tasa de hidrólisis de las BG aumenta a medida que el tamaño del sustrato disminuye. En la preparación enzimática, el contenido de proteína enzimática de BG es el menor en comparación con las otras celulasas (alrededor del 1%). Con el desarrollo de las técnicas de ingeniería genética, se ha observado que las BG también tienen un papel de transglicosilación, de modo que durante el proceso de hidrólisis, la glucosa mantiene una conformación β. La β-glucosidasa no es estrictamente como una celulasa, pero puede reducir la inhibición por retroalimentación de la celulasa causada por la celobiosa (Chen, 2014).

b Hemicelulasas

En el grupo de las hemicelulasas se incluyen enzimas glicosil hidrolasas, que catalizan los enlaces glicosídicos de los polisacáridos que componen la hemicelulosa y también enzimas esterasas, que catalizan enlaces éster que forman los sustituyentes de la hemicelulosa. Debido a la variabilidad de los

sustratos que hidrolizan, las hemicelulasas son frecuentemente clasificadas según el tipo de hemicelulosa o de enlace que catalizan. Así pues, se distinguen xilanasas, mananasas, xilosidasas, arabinasas, galactosidasas, etc., (Sukumaran, 2009; Robl y col., 2013). Los azúcares predominantes que se encuentran comúnmente en la hemicelulosa incluyen D-xilosa, L-arabinosa, D-manosa y D-galactosa. La xilosa es el componente principal de la hemicelulosa en la biomasa herbácea y de madera dura, mientras que la manosa es el componente principal de la hemicelulosa en madera blanda o de coníferas. La despolimerización enzimática de la hemicelulosa es comercialmente atractiva debido a sus condiciones suaves y la ausencia de formación de productos de degradación tóxicos (Saini y col., 2015).

La despolimerización completa de la hemicelulosa requiere la acción sinérgica de un conjunto de hemicelulasas, incluidas la endo-xilanasa (endo-1,4-β-xilanasa, EC 3.2.1.8), β-xilosidasa (xilano-1,4-β-xilosidasa, EC 3.2.1.37), α-glucuronidasa (α-glucosiduronasa, EC 3.2.1.139), α-arabinofuranosidasa (α-L-arabinofuranosidasa, EC 3.2.1.55), arabinasa (endo α-L-arabinasa, EC 3.2.1.99), acetil xilano esterasa (EC 3.1.1.72) y feruloil xilano esterasa (EC 3.1.1.73). De todos ellas, las más estudiadas son las dos primeras, ya que degradan el xilano, que es el mayor componente de la hemicelulosa de las maderas duras y plantas herbáceas (Juturu y Wu, 2013). El xilano consiste de una columna vertebral de D-xilosa unida por enlaces glucosídicos β-1,4 y trazas de L-arabinosa en una estructura heteropolimérica compleja (Ravindran, 2018; Bhardwaj y col., 2019). En la Figura 8 se muestra una estructura de xilano y los sitios de acción de las principales enzimas xilanolíticas.

Entre los microorganismos más estudiados por su capacidad de producir hemicelulasas, en particular xilanasas, destacan especies de ascomicetes de los géneros *Aspergillus, Talaromyces, Thermomyces, Thermoascus, Melanocarpus, Fusarium, Chaetomium, Humicola. Paecylomyces, Scytalidium, Corynascus, Thielavia, Myceliophthora. Sporotrichum, Rhizomucor y Trichoderma*.

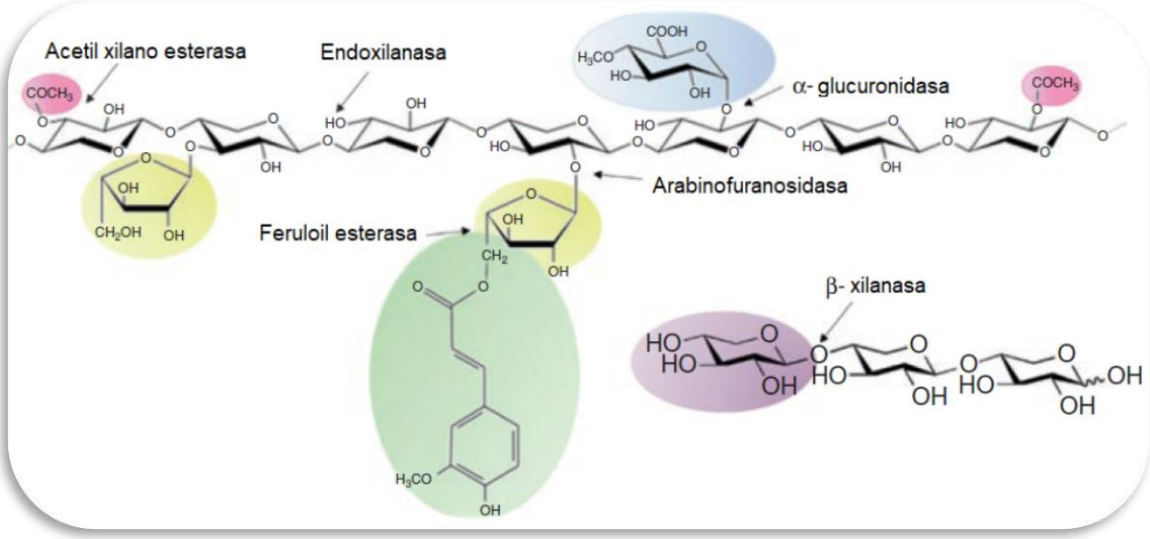


Figura 8. Estructura de xilano mostrando los sitios que son atacados por las enzimas xilanolíticas específicas para lograr la hidrólisis completa de sus constituyentes (Adaptada de Machado Pasin y col. (2020)).

De los hongos mencionados anteriormente, los más ampliamente utilizados son los de los géneros *Trichoderma*, en especial *T. harzianum , T. reesei. T. inhamatum, T. piluliferum, T. viride, T. longibrachiatum, T. asperellum* y *T. stromaticu,* y del género *Aspergillus*, en particular, *A. niger, A. flavus, A. niveus, A. ochraceus, A. foetidus, A. fumigates, A. terreus,* y *A. tamari.* En la primera etapa de la degradación de la hemicelulosa, predominan los hongos, pero los actinomicetos se destacan en la etapa posterior. Muchos grupos de hongos pueden descomponer la hemicelulosa; su número supera a los que degradan la celulosa (Bhardwaj y col., 2019). Los hongos superiores que degradan la hemicelulosa se dividen en tres categorías: hongos de pudrición parda, podredumbre blanca y podredumbre blanda. Los hongos de la pudrición parda descomponen la hemicelulosa presente en la madera, entre ellos se pueden mencionar a *Gloeophyllum trabeum*, *Fomitopsis lilacino-gilva*, *Laetiporus portenosus*, *Postia placenta* y *Serpula lacrymans*. Ejemplos de hongos de pudrición blanca que degradan la hemicelulosa están *Ceriporiopsis subvermispora*, *Phlebia radiata*, *Rigidoporous lignosus*, *Dichornitus sqiualenis*, *Phellinuis pini* e *Inonotits diyophillis* (Gunjal y col., 2020).

También se pueden mencionar a *Phanerochaete chrysosporium*, *Agaricus arvensis*, *Irpex lacteus*, *Schizophyllum commune* (Metreveli y col., 2017).

c Ligninasas

La lignina es el polímero aromático más abundante que existe en la naturaleza y forma parte integral de las paredes secundarias de las plantas y juega un papel importante en la conducción del agua en las plantas vasculares. La misma consta de estructuras fenólicas y no fenólicas {Kumar, 2020 #891(Kumar y Chandra, 2020). Algunos hongos, bacterias e insectos son capaces de producir enzimas que la digieren, las cuales pueden ser básicamente de dos tipos, las peroxidasas y las lacasas. Las enzimas peroxidasas incluyen a la lignino peroxidasa o ligninasa (EC 1.11.1.14) y la manganeso peroxidasa (EC 1.11.1.13). Éstas son glicoproteínas que contienen un grupo hemo el cual requiere peróxido de hidrógeno como oxidante. La lignina peroxidasa degrada las unidades de lignina no fenólica.

La manganeso peroxidasa actúa sobre las unidades de lignina fenólicas y no fenólicas a través de reacciones de peroxidación lipídica, oxidando Mn^{+2} a Mn^{+3}, lo que convierte los anillos de fenol a radicales fenoxi que conducen a la descomposición de los otros compuestos (Sindhu y col., 2016). También se conoce otra peroxidasa, aunque de menor relevancia, la cual interviene en los procesos de degradación de la lignina, la peroxidasa versátil (EC 1.11.1.16) (Patel y col., 2020).

Las lacasas (EC 1.10.3.2), por su parte, son enzimas que contienen cobre, las cuales actúan junto con la lignina y la manganeso peroxidasas para lograr la completa degradación de la lignina. Ellas catalizan la oxidación de las unidades de lignina y compuestos fenólicos, aminas aromáticas a radicales libres. El potencial de la lacasa de degradar la lignina se ve incrementado por la presencia de compuestos fenólicos tales como el ácido 2,2 P-azino-bis-hidroxiantranílico y el 3-etiltiazolin-6-sulfonato, los cuales actúan como mediadores redox, sin los cuales su efecto es limitado (Saloheimo y col., 2002; Sindhu y col., 2016). Recientemente, las investigaciones han revelado el papel indirecto de varias otras enzimas que facilitan el proceso de degradación de las enzimas ligninolíticas, como la feruloil esterasa (EC 3.1.1.73), la aril alcohol oxidasa (EC 1.1.3.7), quinona reductasas (EC 1.6.5.5), lipasas (EC 3.1.1.3), xilanasa (EC 3.2.1.8) y catecol 2,3-dioxigenasa (EC 1.13.11.2) (Kumar y Chandra, 2020). El paso clave en la degradación de la lignina por parte de las enzimas ligninolíticas implica la formación de radicales libres intermediarios altamente reactivos, que se forman cuando un electrón se elimina o se agrega al estado fundamental de una sustancia química, provocando así la oxidación o reducción de compuestos "vecinos". Una gran cantidad de reacciones son llevadas a cabo por estos radicales, tales como la oxidación de alcohol bencílico, escisión de enlaces carbono-carbono, hidroxilación, dimerización/polimerización de fenol y desmetilación (Patel y col., 2020).

De todas las enzimas degradadoras de lignina, recientemente ha cobrado un gran interés la lacasa, debido a las múltiples aplicaciones que se le han encontrado, en especial en la biorremediación de aguas y efluentes industriales (Chandra y Chowdhary, 2015; Gunjal y col., 2020; Kumar y

Chandra, 2020; Kumar y col., 2020; Machado Pasin y col., 2020; Niyonzima y col., 2020; Patel y col., 2020).

1) Lignino peroxidasas (LiP)

La lignino peroxidasa, LiP (EC 1.11.1.14), es una glicoproteína de 40 a 68 kDa (y pI de 3.2 a 4.0) que contiene 1 mol de protoporfirina de hierro IX por 1 mol de proteína, cataliza la despolimerización oxidativa de la lignina dependiente de H_2O_2. Estructura química de las LiPs es de enzimas monoméricas glicosiladas que contienen cuatro carbohidratos, 370 moléculas de agua, 343 residuos de aminoácidos, dos iones de calcio y un grupo hemo. Por otro lado, LiP es de naturaleza helicoidal y contiene ocho hélices mayores y menores, dos hojas beta antiparalelas y dos dominios a ambos lados del grupo hemo. Éste incluye 40 residuos, que se conectan a la proteína por puentes de hidrógeno. Este grupo complementa a la proteína, pero tiene dos pequeños canales para el acceso a los disolventes (Kumar y Chandra, 2020). Además, el hierro hemo está asociado al aminoácido histidina y es responsable del alto potencial redox de la enzima. La distancia entre cada grupo hemo y su aminoácido aumenta el potencial redox enzimático y crea una deficiencia electrónica en el anillo de porfirina del hierro (Kumar y Chandra, 2020). La LiP muestra un potencial redox muy alto ($E_0' \approx 1.2$ V a pH 3.0) en comparación con las lacasas (0.8 V a pH 5.5), peroxidasas de rábano picante (0.95 V a pH 6.3) y MnP (0.8 V a pH 4.5). Esta propiedad permite que la LiP catalice la oxidación de compuestos aromáticos no fenólicos, incluso en ausencia de un mediador (Pollegioni y col., 2015). En la Figura 9 se muestra la estructura terciaria de la LiP de *Phanerochaete. Chrysosporium*, su estructura terciaria, el dominio C-terminal, el dominio N-terminal y el grupo hemo.

Entre los hongos más comúnmente mencionados como productores de lignino peroxidasa se pueden mencionar a *Phanerochaete chrysosporium, Coprinus cinereus* (Niyonzima y col., 2020), *Pleurotus ostreatus*, *Polyporus* sp. y *Trametes* sp. (Singh y col., 2020).

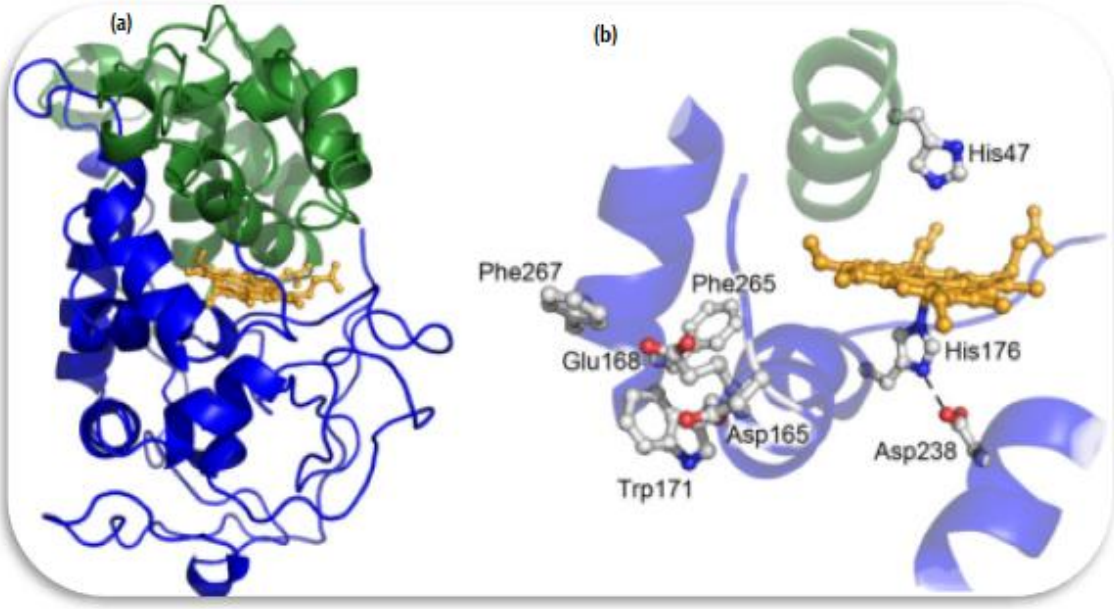


Figura 9. LiP de *Phanerochaete. chrysosporium*. (a) Estructura terciaria de LiP: azul, proximal, dominio C-terminal; verde, distal, dominio N-terminal; grupo hemo es indicado como barras con esferas amarillas. (b) Detalles del entorno hemo (Adaptada de Pollegioni y col. (2015)).

2) Manganeso peroxidasas

La manganeso peroxidasa (MnP, EC 1.11.1.13) es una enzima perteneciente a la familia de las oxidorreductasas que contiene un grupo hemo. Los microorganismos ligninolíticos secretan la enzima MnP en sus microambientes en estado sólido y líquido. Las isoenzimas MnP producidas tanto por bacterias, hongos basidiomicetosos y algas promedian la masa molecular de 40 a 50 kDa (Kumar y Chandra, 2020). Las MnP son enzimas cruciales para la degradación de la lignina. En su estructura molecular están presentes dos iones Ca^{+2} y cinco elementos puente de disulfuro, que son responsables de mantener la estructura del sitio activo de la enzima (Carmona-Ribeiro y col., 2015). El sitio activo de la enzima MnP (Figura 10) comprende varios aminoácidos como ligando tales como histidina proximal (His), unido en H a un residuo de ácido aspártico (Asp) y un “bolsillo” de unión a peroxidasa del lado distal que contiene residuos catalíticos de His y arginina (Arg) (Kumar y Chandra, 2020). En la Figura 11 se muestra el ciclo catalítico de la MnP. Los microorganismos ligninolíticos como los basidiomicetos de pudrición blanca y las bacterias oxidan el Mn^{+2} a Mn^{+3} en un proceso de varios pasos. El Mn^{+2} acelera y desencadena las funciones y la producción del sustrato por las enzimas MnP. Posteriormente, el Mn^{+3} generado a través de la enzima MnP, actúa como mediador en el proceso de oxidación de varios compuestos fenólicos y no fenólicos.

El oxalato de quelatos de Mn^{+3} es de tamaño muy pequeño para difundirse en el sitio activo de la enzima. Además, el MnP no solo cataliza la lignina y sus compuestos derivados, sino que también cataliza los diversos compuestos no fenólicos como los hidrocarburos aromáticos policíclicos a través de la oxidación en presencia de H_2O_2 como oxidante en el Mn^{+2} a Mn^{+3} (Singh y col., 2011).

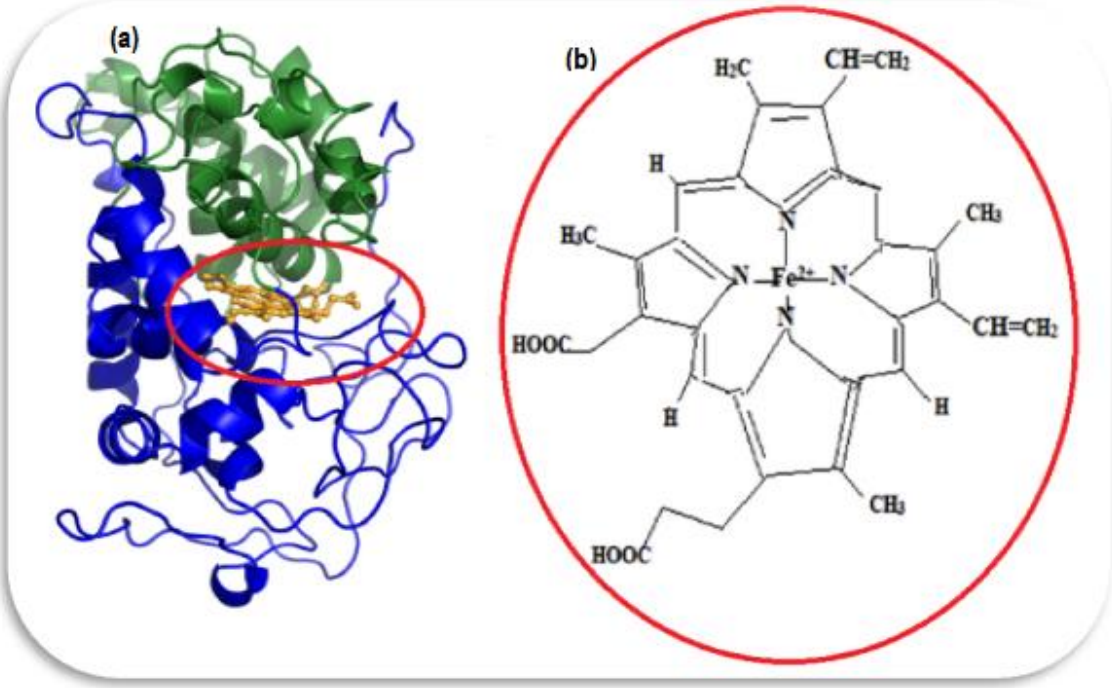


Figura 10. MnP de *Phanerochaete chrysosporium*. (a) Estructura terciaria, azul, proximal, dominio C-terminal; verde, distal, dominio N-terminal; grupo hemo es indicado como barras con esferas amarillas (Pollegioni y col., 2015); (b) sitio activo de MnP (Carmona-Ribeiro y col., 2015).

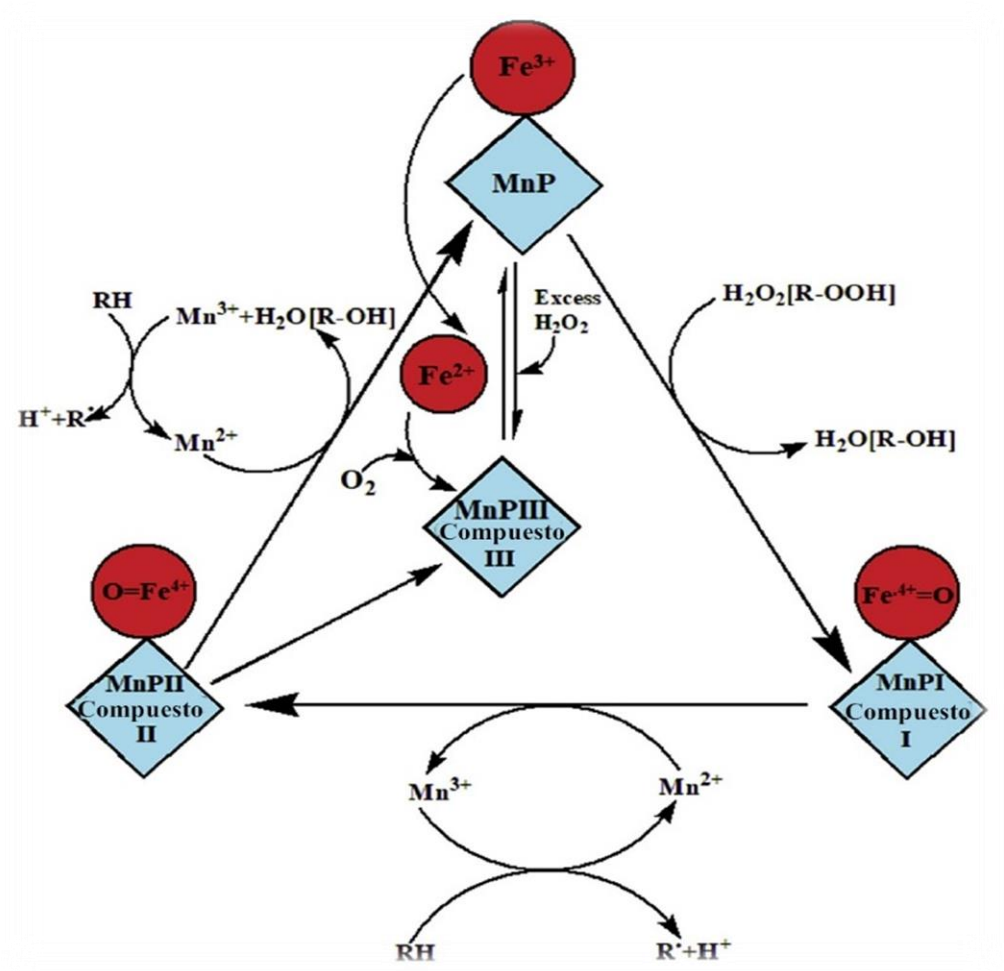


Figura 11. Ciclo catalítico de la MnP. (Adaptado de Kumar y Chandra (2020).

3) Peroxidasa versátil

La peroxidasa versátil (PV, EC 1.11.1.16) también se conoce como peroxidasa híbrida o lignina manganeso peroxidasa, ya que combina propiedades catalíticas de la LiP y la MnP. La peroxidasa versátil exhibe una capacidad oxidativa dual para oxidar Mn (II) y también compuestos aromáticos fenólicos y no fenólicos. Esta enzima actúa sobre sustratos que típicamente actúa la LiP, por ejemplo, alcohol veratrílico, metoxibencenos, compuestos de lignina no fenólicos y Mn^{+2}. La especificidad de la PV sobre el sustrato es similar a la de la LiP, incluida la oxidación compuestos de alto y medio potencial redox. La PV también oxida colorantes azoicos y otras sustancias no fenólicas con alto potencial redox en ausencia de mediadores. Debido a su versatilidad catalítica, que incluye la degradación de compuestos que otras peroxidasas no pueden oxidar directamente (Chaudhary y Verma, 2020).

Cuadro 6. Hongos de pudrición blanca (PB) y descomponedores de la basura del suelo (SL) productores de manganeso peroxidasa (MnP) en estado líquido (L) y sólido (S)

Hongo	Grupo eco-fisiológico	Familia	Masa molecular (kda)	Forma de cultivo
Abortiporus biennis	PB	Coriolaceae	38–45	L
Agaricus bisporus	SL	Agaricaceae	40	S
Agrocybe dura	SL	Bolbitiaceae	ND	L,S
Agrocybe praecox	SL	Bolbitiaceae	41–42	L
Armillaria mella	PB	Tricholomataceae	ND	L
Armillaria ostoyae	PB	Tricholomataceae	ND	L
Auricularia sp.	PB	Auriculariaceae	ND	L
Bjerkandera adusta	PB	Coriolaceae	44	L
Bjerkandera sp.	PB	Coriolaceae	44–45	L
Ceriporiopsis subvermispora	PB	Coriolaceae	52.5–62.5	L,S
Clitocybula dusenii	PB	Tricholomataceae	42–43	L
Coriolus pruinosum	PB	Coriolaceae	ND	L
Coriolopsis (*Trametes*) *polyzona*	PB	Coriolaceae	ND	L,S
Collybia dryophila	SL	Tricholomataceae	43	L,S
Cyathus stercoreus	PB	Nidulariaceae	ND	L
Flavodon (Irpex) flavus	Marino	Steccherinaceae	43–99	
Dichomitus squalens	PB	Polyporaceae	48–49	L
Ganoderma lucidum	PB	Ganodermataceae	ND	L
Irpex lacteus	PB	Steccherinaceae	ND	L,S?
Heterobasidion annosum	PB	Coriolaceae	ND	L
Hypholoma fasciculare	PB	Strophariaceae	ND	L,S
Kuehneromyces mutabilis	PB	Strophariaceae	ND	L
Lentinus edodes	PB	Tricholomataceae	49	L,S
Marasmius quercophilus	SL	Tricholomataceae	ND	L?
Nematoloma frowardii	PB	Strophariaceae	42–50	L,S
Panaeolus sphinctrinus	SL	Strophariaceae	42	L
Panus tigrinus	PB	Lentinaceae	43	L?
Perenniporia tephropora	PB	Coriolaceae	ND	L
Phaeolus schweinitzii	PB	Coriolaceae	ND	L
Phallus impudicus	SL	Phlallaceae	ND	L
Phanerochaete chrysosporium	PB	Meruliaceae	46	L,S
Phanerochaete laevis	PB	Meruliaceae	ND	L
Phanerochaete flavido-alba	PB	Meruliaceae	45	L
Phanerochaete sordida	PB	Meruliaceae	45	L
Phellinus triviallis	PB	Hymenochaetaceae	ND	L
Phlebia brevispora	PB	Meruliaceae	ND	L
Phlebiaradiata	PB	Meruliaceae	44–50	L,S
Phlebia tremellosa	PB	Meruliaceae	ND	L
Physisporinus vitreus	PB	Coriolaceae	ND	S
Pleurotus eryngii	PB	Lentinaceae	43	L,S
Pleurotus pulmonarius	PB	Lentinaceae	ND	L
Pleurotus ostreatus	PB	Lentinaceae	42–45	L,S
Pleurotus sajor-caju	PB	Lentinaceae	ND	L,S
Rigidoporus lignosus	PB	Coriolaceae	42	L
Stropharia aurainosa	SL	Strophariaceae	ND	L
Stropharia coronilla	SL	Strophariaceae	40–43	L
Stropharia cubensis	SL	Strophariaceae	ND	L
Stropharia rugosoannulata	SL	Strophariaceae	41–43	L,S
Trametes gibosa	PB	Polyporaceae	40–43	L
Trametes hirsuta	PB	Polyporaceae	40–45	L
Trametes trogii	PB	Polyporaceae	38–45	L
Trametes versicolor	PB	Polyporaceae	49	L,S

4) Lacasas

La lacasa (EC 1.10.3.2) es una enzima extracelular que contiene cobre y que consta de glicoproteínas monoméricas, diméricas y tetraméricas. La producen predominantemente bacterias, hongos y actinomicetos El peso molecular medio va de 50 a 300 kD (Chandra y Chowdhary, 2015). La lacasa (bencenodiol: oxidorreductasa de oxígeno) es una polifenol oxidasa que cataliza la reacción:

4 bencenediol + O_2 $\rightleftharpoons$ 4 benzosemiquinona + 2 H_2 (Pollegioni y col., 2015).

Molecularmente la lacasa contiene unos 500 residuos de aminoácidos con tres dominios. El primero contiene 150 aminoácidos iniciales, el segundo entre 150 y 300 y el tercero de 300 a 500 aminoácidos. La estructura se estabiliza generalmente en dos puentes disulfuro localizados entre los dominios 1 a 2 y que también están presentes en los dominios 1 a 3 (Matera y col., 2008; Chandra y Chowdhary, 2015). Las lacasas fúngicas se producen como isoenzimas intracelulares y extracelulares que difieren en el estado oligomérico y el nivel de glicosilación (10-45%). La lacasa contiene cuatro iones de cobre de tres tipos diferentes: el cobre tipo 1 en el sitio T1 muestra una fuerte banda de absorción alrededor de los 600 nm, lo que le da a la lacasa su característico color azul; un iones de cobre de tipo 2 y dos de tipo 3 forman un grupo trinuclear (en los sitios T2 y T3) coordinado por un patrón altamente conservado de cuatro residuos de histidina (Figura 12). En la forma de enzima en reposo, los cuatro iones de cobre se encuentran en el estado de oxidación +2 (Pollegioni y col., 2015; Kumar y Chandra, 2020).

La lacasa cataliza una reacción de oxidación del sustrato de cuatro electrones y la enzima es completamente reducida por O_2 a través de dos pasos consecutivos de dos electrones (Giardina y col., 2009). Algo importante a considerar sobre la actividad de las lacasas es su dependencia del pH. Para los sustratos fenólicos, la dependencia del pH tiene forma de campana: el aumento de la actividad con el pH se atribuye a la disminución de la dependencia del pH en los potenciales redox de los grupos fenólicos, mientras que la disminución de la actividad con el pH se ha atribuido a la inhibición del hidróxido del grupo trinuclear.

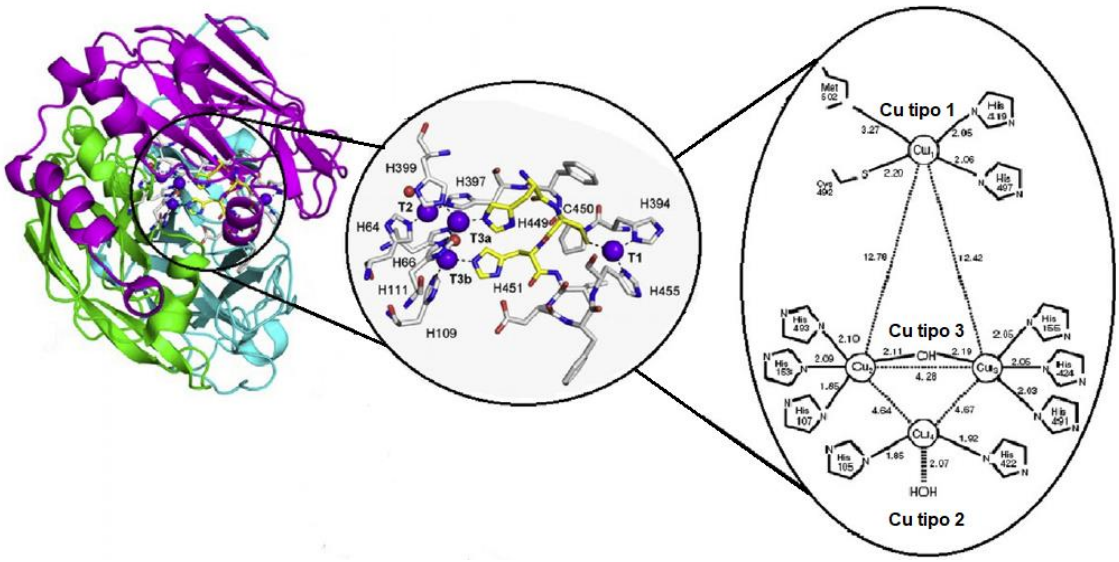


Figura 12. Estructura molecular y sitio activo de lacasa (modificado de Kumar y Chandra (2020).

El pico máximo de esta curva en forma de campana se presenta a valores de pH ácidos. Sin embargo, para aplicaciones industriales es deseable una alta actividad a pH alcalino (Pollegioni y col., 2015).

Entre los hongos productores de lacasa más comúnmente reportados se encuentran *Trichoderma harzianum*, *T. atroviride*, *T. longibrachiatum*, *Trametes versicolor*, *T. pubescens, T. polyzona, Lentinus edodes*, *L. tigrinus*, *Paecilomyces chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, *P. sajor-caju*, *P. eryngii, Ganoderma lucidum*, *Alternaria tenuissima*, *Schizophyllum commune, Coprinus comatus, Pycnoporus cinnabarinus, P. sanguineus, Polyporus grammocephalus, Fomes lignosus* (Chen, 2014; Gunjal y col., 2020; Preethi y col., 2020).

B PRODUCCIÓN DE LACASA DE *T. polyzona* EN *M. oleifera*

1 Producción de enzimas a escala industrial

La mayoría de las enzimas industriales son de naturaleza hidrolítica (hidrolasas), que catalizan la descomposición de sustratos poliméricos naturales como proteínas, almidones, lípidos, fibras y paredes celulares complejas, en moléculas más simples. La mayoría de estos procesos se han desarrollado para trabajar en condiciones suaves y seguras Las enzimas utilizadas con más frecuencia se incluyen en las amplias categorías de proteasas, amilasas y celulasas, pero además se producen pectinasas, xilanasas, fitasas, lipasas, lactasas, invertasas, isomerasas, oxidasas y catalasas. En muchas aplicaciones, las enzimas se utilizan como coadyuvantes de procesamiento para alterar las propiedades funcionales y nutricionales de sus sustratos. Los mercados objetivo incluyen, por ejemplo, las industrias de alimentos y bebidas (panadería, elaboración de cerveza, productos lácteos y procesamiento de proteínas), alimentos para animales, procesamiento de textiles, procesamiento de almidón para edulcorantes, etanol y detergentes (Arbige y col., 2019).

La producción de enzimas es una industria en sí misma, la cual ha tenido un desarrollo enorme en los últimos 50-60 años, gracias a los adelantos que ha habido en el campo de la biotecnología, en especial a la bioingeniería de los microorganismos y a los avances en los procesos de producción o fermentación (Kirk y col., 2002; Treichel, 2020; Villena y col., 2020).

Por la producción de enzimas a partir de microorganismos es necesario realizar varios pasos, entre ellos el aislamiento, selección e identificación de los microorganismos productores de enzimas; la optimización de los parámetros del proceso y fermentación para la producción de enzimas industriales; la purificación y caracterización de las enzimas purificadas y la formulación de enzimas industriales para la venta, enlace con el cliente y trabajo con los organismos reguladores Adicionalmente, la mayoría de las bacterias y hongos que se utilizan para producir enzimas industriales se modifican genéticamente para sobreexpresar su producción (Niyonzima y col., 2020; Villena y col., 2020).

2 Tipos de fermentación

Para la producción de enzimas a partir de microorganismos se utilizan dos tipos generales de procesos, la fermentación en medio sumergido (SMF) y la fermentación en estado sólido (SSF).

a Fermentación en medio sumergido

La fermentación sumergida o fermentación en medio sumergido se define como un proceso biológico de producción de biomoléculas en el que microorganismos y enzimas junto con otros componentes reactivos se sumergen en una solución. La solución líquida puede estar en forma alcohólica, de aceite o un caldo nutritivo. También se utilizan otros sustratos líquidos como melazas y caldos. En la SMF los microorganismos tales como hongos y bacterias se colocan en recipientes cerrados que contengan estos medios ricos en nutrientes (Osorio-González y col., 2020). El proceso de fermentación sumergida puede ser de dos tipos: (a) fermentación aeróbica y (b) fermentación anaeróbica con dos métodos de operación (a) fermentación discontinua y (b) fermentación continua. El primer paso crítico en esta fermentación sumergida es obtener una cantidad adecuada de microorganismos para ser utilizados como inóculo para el proceso posterior (Zhang y col., 2019).

b Fermentación en estado sólido

La fermentación en estado sólido es un proceso biológico que involucra el crecimiento de microorganismos en un medio seco (ausencia de agua) de sustrato no soluble o biomasa sólida (Sadh y col., 2018). La FES ya ha sido utilizado para el procesamiento de alimentos fermentados y actualmente está recuperando más atención debido a las nuevas y numerosas aplicaciones en el aprovechamiento de desechos agrícolas. Estos desechos, al contener compuestos nutritivos de valor son una opción adecuada para el desarrollo de productos biotecnológicos.

El desarrollo de una FES depende de muchos factores, como son: los microorganismos utilizados, la biomasa, la aireación y la actividad del agua. Diferentes biomasas pueden tener mejores características para ser utilizadas como portador de inmovilización en la FES debido a la alta capacidad de

absorción de agua en comparación con otras biomasas. El microorganismo utilizado puede consistir en un solo cultivo, cultivo mixto o consorcio de microorganismos nativos mixtos. En el proceso de FES se suelen utilizar hongos, bacterias y levaduras en ese orden de rendimiento (Osorio-González y col., 2020).

3 Selección del tipo de fermentación

La selección de los métodos de fermentación a utilizarse para la obtención de enzimas depende del tipo de enzima deseado y de los recursos que se dispongan para realizar dichos procesos. Cada uno tiene sus ventajas y desventajas. De los dos métodos, se ha probado repetidamente que la SMF es el mejor para la secreción de enzimas industriales, debido a la naturaleza extracelular de las enzimas que se liberan en el medio de producción, ya que se facilita su recuperación, sin embargo, la principal desventaja de la fermentación la SMF es que frecuentemente utiliza medios sintéticos que resultan muy costosos (Lailaja y Muthusamy, 2013). Por otro lado, cada día hay más adelantos en el uso de la FES (Sarrouh y col., 2012; Sandhya y col., 2015; Londoño-Hernández y col., 2020).

Algunos de los criterios utilizados para la selección de las enzimas microbianas a producirse, están la estabilidad al pH y la temperatura, la especificidad, la influencia de los activadores e inhibidores y la velocidad de reacción (Sarrouh y col., 2012; Sridevi y col., 2015). Las enzimas industriales se producen generalmente por fermentación bajo condiciones cuidadosamente controladas, utilizando microorganismos, especialmente bacterias u hongos. En la práctica, la gran mayoría de las enzimas provienen de un número limitado de géneros, entre los cuales están principalmente *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Bacillus* y *Kluyveromyces*. La mayor parte de las cepas utilizadas han sido empleadas por muchos años en la industria alimentaria o se han modificado a partir de ellas (Sarrouh y col., 2012). De hecho, la mayoría de las especies de estos géneros son seguras y no producen ninguna toxina, crecen en sustratos económicos y secretan una cantidad extracelularmente adecuada de enzimas en un período de tiempo razonable También se utilizan con menor frecuencia microorganismos

pertenecientes a los géneros *Acinetobacter*, *Pseudomonas, Staphylococcus, Streptomyces, Fusarium, Mucor, Penicillium* (Niyonzima y col., 2020).

4 Sustratos agroindustriales

Para abaratar costos en la producción industrial de enzimas, se utilizan sustratos o medios de cultivo compuestos por residuos agroindustriales ya que son una fuente importante de nutrientes necesarios para el crecimiento microbiano (Taddia y col., 2018). Además, se usan otros productos suplementarios que ayudan a mejorar el balance de los nutrientes en los medios de cultivo. En el Cuadro 7 se proporciona un resumen con algunos casos de sustratos utilizados, las enzimas producidas y los microorganismos que las producen. Se constata que principalmente se utilizan residuos de la industria alimentaria de cereales y leguminosas como trigo, arroz, maíz, soya, frutas como naranja y uva, y bagazo o melaza de la caña de azúcar. El tipo de enzimas más comúnmente obtenida es celulasa, pero también xilanasas y lacasas (Niyonzima y col., 2020; Treichel y col., 2020). El uso de subproductos económicos o residuos agrícolas no solo hace que la fermentación y la producción sean rentables, sino que también reduce la contaminación ambiental que pueden causar los subproductos o la eliminación de residuos agrícolas. De hecho, si se elige cuidadosamente un sustrato para hacer crecer el microorganismo, se puede reducir un tercio del costo del proceso. Por ejemplo, la queratinasa se produce en cantidades significativas utilizando *Bacillus megaterium* en un medio conteniendo plumas de pollo como fuentes de carbono y nitrógeno (Saibabu y col., 2013). De manera similar, Lincoln y More (2018) produjeron invertasa de *A. sojae* JU12 utilizando cáscara de naranja humedecida con melaza como sustrato. Asimismo, el salvado de trigo, un sustrato agrícola barato, fue utilizado por diferentes especies de *Aspergillus* para producir fitasa (Sandhya y col., 2015), queratinasa (Mini y col., 2012) y lacasa (Usha y col., 2014). También se ha reportado que la torta de coco es un excelente sustrato para la secreción de celulasa por *Pseudomonas fluorescens* (Sethi y col., 2013). El Cuadro 7 muestra algunos subproductos o residuos agrícolas que se han probado como sustratos para la producción de enzimas por microorganismos.

Cuadro 7. Sustratos de bajo costo utilizados para la producción de enzimas por varios hongos y bacterias

Sustrato	Enzima	Microorganismo	Referencia
Plumas de ave	Queratinasa	*Bacillus megaterium*	1
Hojas de árbol	Tanasa	*Aspergillus* sp. GM4	2
Melaza	Invertasa neutra	*Aspergillus* sp.	3
Cáscaras de naranja con melazas	Invertasa	*Aspergillus sojae* JU12	4
Desechos orgánicos de cocina	Invertasa	*Chryseobacterium* sp. *Bacillus* sp.	5
Salvado de arroz	Amilasa	*Bacillus lehensis*	6
Salvado de arroz y de trigo	Fitasa	*Stereum ostrea*	7
Aserrín	Lacasa	*Penicillium* sp.	8
Bagazo de caña	Celulasa	*Aspergillus awamori*	9
Pasta de coco	Celulasa	*Pseudomonas fluorescens*	10
Tallos de te	Tanasa	*Aspergillus tubingensis*	11
Salvado de trigo	Queratinasa	*Aspergillus niger/flavus*	12
Salvado de trigo	Fitasa	*Aspergillus niger*	13
Salvado de trigo	Xilanasa	*Sphingobacterium* sp.	14
Cáscara de soya y papel	Celulasa	*Aspergillus niger*	15
Residuos de cocina y agrícolas	Celulasa	*Aspergillus niger* NS2	16
Residuos de arroz y girasol	Lacasa	*Ganoderma lucidum*	17
Residuos de tabaco	Celulasa	*Sinorhizobium meliloti* 224	18
Residuos de jugo de fruta	Lacasa	*Bacillus sp.* MSK-01	19
Cáscara de café, vaina soya, aserrín	Lacasa	*Trametes pubescens* CBS 696.94	20
Cáscara de uva	Xilanasa	*Aspergillus awamori*	21

1 (Saibabu y col., 2013); 2 (Souza y col., 2015); 3 (Lincoln y More, 2017); 4 (Lincoln y More, 2018); 5 (Hasan y col., 2017); 6 (More y col., 2015); 7 (Usha y col., 2014); 8 (Prasanna y col., 2016); 9 (Pachauri y col., 2018); 10 (Sethi y col., 2013); 11 (Xiao y col., 2015); 12 (Mini y col., 2012); 13 (Sandhya y col., 2015); (Ghasemi y col., 2014); 15 (Boggione y col., 2016); 16 (Bansal y col., 2012); 17 (Postemsky y col., 2017); 18 (Buntić y col., 2019); 19 (Sondhi y Saini, 2019); 20 (Gonzalez y col., 2013); 21 (Botella y col., 2007)

5 Optimización de las condiciones de cultivo

Las condiciones de cultivo utilizadas en el bioproceso de producción de enzimas afectan de manera determinante los rendimientos obtenidos. El papel de la optimización de la composición del medio de cultivo es mantener un equilibrio entre los diferentes ingredientes, evitando así la cantidad de componentes no utilizados al final del proceso de fermentación. No existe un medio de crecimiento único o específico para la producción óptima de enzimas industriales producidas por bacterias u hongos ya que cada especie tiene sus propias condiciones de crecimiento óptimas para producir la máxima cantidad de enzimas (Kumar y Takagi, 1999).

Las industrias están en una búsqueda continua de nuevas cepas microbianas con las características deseables para producir las enzimas industriales buscadas. Por tanto, la selección adecuada de diferentes microorganismos industriales y la optimización de las condiciones de fermentación son necesarias para producir enzimas industriales de bajo costo (Niyonzima y col., 2020) . La producción de enzimas industriales en un único medio de producción económico a partir de microorganismos también es un gran desafío. Si bien se han realizado algunos estudios importantes para la producción y optimización de enzimas a partir de microorganismos, no existe un solo reporte sobre la producción industrial y optimización de condiciones de cultivo para máxima producción que sea común para todos los microorganismos. (Roy y Mukherjee, 2013). Esto es debido a que es una combinación de varios factores que incluyen entre otros, una cepa de alta productividad, un eficiente sistema de producción, medios de cultivo apropiados y parámetros de cultivo cuidadosamente seleccionados (Lueangjaroenkit y col., 2018).

En la fermentación en medio sumergido, los principales factores que afectan son, el tiempo de incubación, la agitación, el pH inicial, la concentración de inóculo, la fuente de carbono, la concentración de iones metálicos y la fuente y concentración de nitrógeno (Pathak y Deshmukh, 2012; Niyonzima y More, 2013).

Cuadro 8. Condiciones óptimas de cultivo para especies de bacterias para la producción de enzimas

Bacteria	Enzima	pH	T (°C)	Agitación	Inóculo (%)	Incub. (h)	Fuente de C	Fuente de N	Ref.
Acinetobacter calcoaceticus	Lipasa	9	37	180	0.6	48	Almidón, aceite oliva	Harina maíz, frijol	1
Bacillus cereus	Proteasa	10	37	ND	2	48	Glucosa, leche desgrasada.	Peptona, Extracto de levadura	2
Bacillus cereus	Pululanasa	6	50	200	ND	48	Pululano soluble	Triptona	3
Bacillus cereus GA6	Amilasa	10	20	120	1	96	Glicerol	Acetato amonio	4
Bacillus cereus FT9	L-glutaminasa	7	37	150	ND	24	Extr. de malta	Peptona	5
Bacillus cereus LC13	L-glutaminasa	7	37	100	ND	24	Maltosa	L-glutamina	6
Bacillus flexus MSBC 2	CGTasa	10	37	ND	ND	120	Almidón de maíz	Peptona, Extracto de levadura	7
Bacillus flexus XJU-1	Lipasa	11	37	100	2	36	Aceite algodón	Extracto de levadura	8
Bacillus halodurans	CGTasa	10.5	37	ND	ND	48	Almidón soluble	Peptona, ext. Lev.	9
Bacillus halodurans	Pululanasa	10	37	ND	ND	72	Pululano	Peptona	10
Bacillus lehensis MLB2	Fitasa	5.5	30	100	2	24	Salvado de arroz	Potasio	11
Bacillus licheniformis AS08E	Amilasa	ND	45	200	ND	60	ND	ND	12
Bacillus licheniformis KBDL4	Proteasa	10	37	200	3	48	Caseína	Extracto de levadura	13
Bacillus megaterium	Queratinasa	10	37	ND	ND	72	Harina de plumas	Extracto de levadura	14
Bacillus megaterium BMS4	Celulasa	7	37	120	ND	24	Sacarosa	Medio LB y BHM	15
Bacillus smithii BTMS 11	Lipasa	8	28	170	3	24	Glucosa, aceite ajonjolí	Harina de soya	16
Bacillus sonorensis	Lipasa	ND	40	150	1	48	Aceite de oliva	Peptona, ext. Lev.	17
Bacillus sp.	Amilasa	7	50	120	2	48	Almidón soluble	Peptona	18
Bacillus sp. SMIA-2	Proteasa	8.5	50	150	ND	36	Almidón	Suero y maíz fermentado	19
Bacillus sp. MSL2	Celulasa	6	50	200	ND	48	CMC	Extracto de levadura	20
Bacillus subtilis	Pectinasa	8.5	37	ND	ND	24	Glucosa	Extracto de levadura	21
Bacillus subtilis AS-SO1a	Amilasa	6	35	150	ND	60	Almidón	Extracto de res	22
Chryseobacterium sp.	Amilasa	5	50	120	2	60	Glucosa	Peptona	18
Pseudomonas fluorescens	Celulasa	10	40	ND	ND	24	Glucosa	Sulfato de amonio	23
Pseudomonas stutzeri AS22	Amilasa	8	30	200	ND	24	Almidón de papa	Extracto de levadura	24
Sphringobacterium sp. SaH-05	Xilanasa	8	37	150	ND	24	Salvado de trigo	Sulfato de amonio	25
Staphylococcus arlettae JPBW-1	Lipasa	8	35	100	10	48	Aceite de soya	ND	26
Atreptomyces sp. A3	Amilasa	9	45	200	2	168	Maltosa	Peptona	27
Virgibacillus sp. EMB13	Proteasa	8	30	150	4	24	Manitol	Peptona, extracto de levadura	28

CGTasa = Ciclodextrina glucosiltransferasa. ND=No determinado/reportado. 1 (Wang y col., 2012); 2 (Beena y col., 2012); 3 (Waleed y col., 2015); 4 (Roohi y col., 2013); 5 (Sinha y Nigam, 2016); 6 (More y col., 2016); 7 (Shwetha y col., 2017); 8 (Niyonzima y More, 2014); 9 (More y col., 2012); 10 (Asha y col., 2013); 11 (More y col., 2015); 12 (Roy y Mukherjee, 2013); 13 (Pathak y Deshmukh, 2012); 14 (Saibabu y col., 2013); 15 (Hussain y col., 2017); 16 (Lailaja y Muthusamy, 2013); 17 (Nerurkar y col., 2013); 18 (Hasan y col., 2017); 19 (Rodrigues y col., 2013); 20 (Sriariyanun y col., 2016); 21 (Mathur, 2014); 22 (Roy y col., 2012); 23 (Sethi y col., 2013); 24 (Maalej y col., 2013); 25 (Ghasemi y col., 2014); 26 (Chauhan y Garlapati, 2013); 27 (Chakraborty y col., 2012); 28 (Sinha y Khare, 2012);

Cuadro 9. Condiciones óptimas de cultivo para especies de hongos en la producción de enzimas

Hongo	Enzima	pH	T °C	Agitación	Inóculo (%)	Incub. (h)	Fuente de C	Fuente de N	Ref.
Aspergillus niger	Pectinasa	4.5	30	150	ND	168	Pectina	Peptona	29
Aspergillus niger	Fitasa	5.0	30	200	ND	96	Glucosa	Nitrato de amonio	30
Aspergillus niger	Tanasa	4.0	37	120	ND	96	Tanato	Extracto de levadura	31
Aspergillus awamori	Celulasa	6.0	25	ND	ND	168	CMC	Peptona	32
Aspergillus nigeriflavus	Queratinasa	8.5	37	120	ND	96	Queratina	Peptona	33
Aspergillus sojae JU12	Invertasa	8.0	37	ND	9	120	Cáscaras de naranja y melaza	Invertasa	34
Aspergillus sp.	Tanasa	4.0	30	ND	ND	96	Hojas de jambul/tanato	Nitrato de potasio	35
Aspergillus terreus	Proteasa	10.0	37	ND	2	120	Caseína	Harina de soya	36
Aspergillus versicolor PF/F/107	Proteasa	9.0	35	150	ND	96	Salvado de trigo	Nitrato de sodio	37
Fusarium sp. XPF-5	Xilanasa	8.0	47	160	ND	96	xilano	ND	38
Mucor circinelloides F6-3-12	Tanasa	5.5	30	200	2	168	Te verde en polvo	Nitrato de sodio	39
Mucor hiemalis	L-Asparaginasa	7.0	30	ND	ND	96	Glucosa	L-asparagina	40
Penicillum nigricans	β-Amilasa	5.0	60	ND	ND	ND	Almidón	Nitrato de sodio	41
Penicillum sp.	Celulasa	5.0	30	ND	ND	168	Lactosa	Extracto de levadura	42
Saccharomyces cerevisiae	Invertasa	7.0	30	ND	ND	48	Almidón	Urea	43
Aspergillus niger	Proteasa	7.0	35	ND	ND		Glucosa	Extracto de levadura	44
Scytalidium lignicola	Lacasa	6.0	30	ND	ND	168	Sacarosa	Nitrato de sodio	45
Stereum ostrea	Lacasa	5.5	30	180	ND	288	Glucosa	Peptona	46
Trichoderma viride	L-Asparaginasa	6.5	37	ND	ND	72	Maltosa	L-asparagina	47
Trichoderma asperellum	Lacasa	4.5	37	ND	5	120	Glucosa, salvado trigo	Tartr. amonio, extracto de levadura	48
Pleurotus ostreatus ARC280	Lacasa	5.0	28	150	5	624	Almidón	$(NH_4)_2SO_4$	49
Marasmiellus palmivorus LA1	Lacasa	5.0	28	ND	6	120	Galactosa	$NH_4H_2PO_4$	50
Trametes versicolor MZKI G-99	Lacasa	6.1	27	140	3	192	Papel	Peptona, extracto de levadura	51

ND=No determinado/reportado. 29 (Dhital y col., 2014); 30 (Sandhya y col., 2015); 31 (Cavalcanti y col., 2017); 32 (Pachauri y col., 2018); 33 (Mini y col., 2012); 34 (Lincoln y More, 2018); 35 (Souza y col., 2015); 36 (Niyonzima y More, 2013); 37 (Choudhary, 2012); 38 (Sharma y col., 2016); 39 (El-Refai y col., 2017); 40 (Thakur y col., 2014); 41 (Muddapur y col., 2013); 42 (Prasanna y col., 2016); 43 (Sivakumar y col., 2013); 44 (Lashari y col., 2011); 45 (Sidhu y col., 2017); 46 (Usha y col., 2014); 47 (Lincoln y col., 2015); 48 (Sabarathinam y col., 2014); 49 (Elsayed y col., 2012); 50 (Chenthamarakshan y col., 2017); 51 (Tisma y col., 2012)

Es por ello, que es gran relevancia en la eficacia de los procesos de obtención de enzimas, la optimización de dichos parámetros (Roy y Mukherjee, 2013; Niyonzima y col., 2020).

En el caso de la fermentación en estado sólido, algunos de los factores más relevantes son, el tipo y fórmula del sustrato, el pretratamiento utilizado, el tamaño de partícula del sustrato, la actividad de agua, la productividad del proceso, la humedad relativa, la temperatura del proceso, el pH del sustrato, el tiempo de fermentación, el tamaño del inóculo y el oxígeno disponible (Londoño-Hernández y col., 2020). El estudio de todos estos factores es crucial para la mejora de los rendimientos obtenidos de las enzimas en cuestión. Por lo tanto, un control adecuado de estos parámetros es muy importante para un proceso de fermentación eficiente, y estos deben optimizarse para cada biorreactor y proceso (Poletto y col., 2017).

En el caso de la FES, uno de los parámetros importantes es la actividad de agua (a_w), que debe ajustarse en función de los requisitos físicos de los microorganismos. Generalmente, las bacterias necesitan una a_w entre 0.9 y 0.99, la levadura una a_w entre 0.8 y 0.9 y los hongos filamentosos una a_w entre 0.6 y 0.7. El aumento del contenido de agua puede impedir el crecimiento debido a la disminución de oxígeno en los poros del sustrato (Chen, 2013). En general, para la FES se utilizan microorganismos aeróbicos. Por tanto, el contenido de oxígeno es un factor fundamental en su desarrollo. Por esta razón, debe haber aireación para aportar el oxígeno necesario y eliminar tanto el dióxido de carbono como el calor metabólico generado. De esta forma, se debe tener en cuenta el flujo óptimo de aire con respecto a la naturaleza del microorganismo, la velocidad de generación de calor metabólico, la concentración de dióxido de carbono y otros metabolitos, y el espesor del sustrato, entre otros. Una variable relacionada con la disponibilidad de oxígeno es el tamaño de partícula. El tamaño de las partículas determina el grado de porosidad; un valor óptimo de esto varía dependiendo del sustrato, el microorganismo que se utilizará y la cantidad de oxígeno presente en el medio. Las partículas pequeñas tienen la ventaja de tener una mayor relación

superficie-volumen, lo que tiene una gran influencia en la transferencia de masa (de Castro y col., 2016; Londoño-Hernández y col., 2020).

La optimización de los parámetros estadísticos es de gran utilidad en el incremento de rendimientos de producción de enzimas en corto tiempo. Por ejemplo, El-Refai y col. (2017) aplicaron un diseño de Plackett-Burman y Box-Behnken para incrementar la producción de tanasa por *Mucor circinelloides*, optimizando los factores nutricionales (fuentes de C, N y P) y parámetros fisicoquímicos (edad del inóculo, tiempo y temperatura de incubación). Por esta misma metodología, Roy y Mukherjee (2013) optimizaron la producción de maltasa de la cepa AS08E del hongo *Bacillus licheniformis*. También, Chauhan y Garlapati (2013), empleando una cepa de *Staphiloccus arlettae*, optimizaron las condiciones de cultivo por la metodología de superficie de respuesta para una máxima producción de lipasa. Por su parte, Sabarathinam y col. (2014), así como Chenthamarakshan y col. (2017) incrementaron la producción de lacasa utilizando diseños ortogonales de Taguchi, empleando respectivamente los hongos *Marasmiellus palmivorum* y *Trichoderma asperellum.* En los Cuadros 8 y 9 se muestran algunos ejemplos de las condiciones óptimas encontradas mediante métodos estadísticos para la producción de diversas enzimas de bacterias y hongos.

a Tiempo de incubación

El tiempo de incubación es de gran importancia para la producción de enzimas de bacterias y hongos. En el caso de las primeras, el tiempo óptimo es de 24 a 48 horas para la mayoría de las especies y enzimas, lo cual influye para que los costos de dichos procesos sean menores que aquellos de los procesos largos. Ejemplos de ellos se presentan en el Cuadro 8, donde se puede observar que las enzimas son lipasas, proteasas, celulasas y amilasas, principalmente, y que muchas de ellas son producidas por bacterias del género *Bacillus* (Beena y col., 2012; Lailaja y Muthusamy, 2013; Nerurkar y col., 2013; Rodrigues y col., 2013; Niyonzima y More, 2014; More y col., 2015; Waleed y col., 2015; More y col., 2016; Sinha y Nigam, 2016; Sriariyanun y col., 2016; Hasan y col., 2017;

Hussain y col., 2017). Períodos más largos de incubación han sido observados en el caso de algunas enzimas como la CGTasa *por B. flexus* MSBC 2 (Shwetha y col., 2017) y amilasas producida por *Streptomyces* sp. cepa A3 (Chakraborty y col., 2012).

En el caso de la mayoría de las enzimas producidas por hongos, los tiempos de incubación son mayores que los requeridos por las bacterias. En el Cuadro 9 se puede apreciar que en la industria, óptimamente se busca que las enzimas de hongos alcancen su máximo de producción entre las 120 y 168 horas (Choudhary, 2012; Mini y col., 2012; Niyonzima y More, 2013; Thakur y col., 2014; Sandhya y col., 2015; Souza y col., 2015; Sharma y col., 2016; Cavalcanti y col., 2017; Lincoln y More, 2018). Tiempos más largos se han reportado para la producción de pectinasas por *Aspergillus niger* (Dhital y col., 2014), celulasas de *Penicillum* sp. (Prasanna y col., 2016) y *Aspergillus awamori* (Pachauri y col., 2018); tanasa de *Mucor circinelloides* (El-Refai y col., 2017) y lacasas de *Scytalidium lignicola* (Sidhu y col., 2017), *Stereum ostrea* (Usha y col., 2014), *Pleurotus ostreatus* ARC280 (Elsayed y col., 2012) y *Trametes versicolor* (Tisma y col., 2012). En general, a medida que transcurre el tiempo se incrementa la secreción de enzima por parte del microorganismo, pero a partir de un determinado momento, los niveles de la enzima empiezan a descender, principalmente debido a varios factores, entre ellos la disponibilidad de nutrientes, la secreción de metabolitos tóxicos y la descomposición de la enzima por proteasas (Anandan y col., 2007; Niyonzima y col., 2020).

b pH inicial

El pH inicial del medio de cultivo es el principal factor que regula la secreción de enzimas microbianas, ya que puede influir en la disponibilidad de sustratos nutritivos o en el transporte de los componentes nutritivos a través de las membranas de las bacterias y hongos, que a su vez estimulan el crecimiento microbiano y con ello la producción de enzimas (Bhavani y col., 2012). El rango de pH óptimo para la producción de la mayoría de las enzimas industriales de bacterias fluctúa entre 6 y 10, en cambio, para los hongos el pH óptimo suele

ubicarse entre 5 y 9 (Choudhary, 2012; Mini y col., 2012; Niyonzima y More, 2013; Sivakumar y col., 2013) (Cuadros 8 y 9). Las variaciones en los rendimientos de enzimas a diferentes pH pueden deberse a la especificidad de cada especie de hongo o bacteria, lo cual esta relacionado a la ruptura de los mecanismos de transporte en la membrana que impide la liberación de la enzima (Padhiar y col., 2011). En el caso especial de la enzima ligninolítica lacasa, se puede apreciar que el rango de pH inicial óptimo es más reducido, variando entre 4.5 y 6.1 en la mayoría de los casos (Lashari y col., 2011; Elsayed y col., 2012; Tisma y col., 2012; Sabarathinam y col., 2014; Lincoln y col., 2015; Chenthamarakshan y col., 2017; Sidhu y col., 2017).

c Temperatura

La temperatura de incubación es un parámetro de vital importancia en el proceso de producción de enzimas industriales, ya que influye enormemente en el crecimiento de bacterias y hongos. En el caso de las bacterias utilizadas en la producción industrial de enzimas, el rango varía entre 30 y 50 °C, siendo 37 °C el óptimo en la mayoría de los casos, como se observa en Cuadro 8, a excepción de la amilasa (Lailaja y Muthusamy, 2013) donde la temperatura óptima fue de 20 °C y de la lipasa (Roohi y col., 2013) donde se encontró la más alta productividad a 28 °C, en ambos casos para cepas de *Bacillus*.

En el caso de los hongos, las temperaturas óptimas oscilan entre 25 y 47 °C (Cuadro 9), aunque se han reportado casos como el de la β-amilasa producida por *Penicillium nigricans* donde se observó una temperatura óptima de 60 °C (Muddapur y col., 2013). Por su parte, Panosyan (2019) encontró que ciertas cepas de actinomicetes de aguas termales podían producir enzimas hidrolíticas estables (amilasas, lipasas y proteasas) a temperaturas de hasta 60 °C.

d Concentración de inóculo

La concentración de inóculo es un parámetro clave para la producción industrial de enzimas microbianas. En el caso de bacterias el rango puede ser amplio, normalmente entre 0.6 y 5% (Cuadro 8). Sin embargo, en algunos casos las concentraciones de inóculos pueden ser mayores. Así, Chauhan y Garlapati

(2013) utilizaron concentraciones de inóculo de 10% en la producción de lipasa usada en detergentes, secretada por *S. arlettae* JPBW-1. Por lo tanto, hay un óptimo que es necesario establecer mediante experimentación.

En el caso de los hongos, las concentraciones más bajas de inóculo son ligeramente mayores que para las bacterias. Por ejemplo, (El-Refai y col., 2017) encontraron un óptimo de inóculo de 2% en la producción de tanasa por parte de *M. circinelloides*, mientras Tisma y col. (2012) encontraron un 3% en la optimización de lacasa de *Trametes versicolor*. En cambio, las concentraciones más altas de inóculo son similares a las de bacterias. Así, Lincoln y More (2018) encontraron que un 9% fue la concentración óptima de inóculo para la producción de invertasa por *Aspergillus sojae* JU12. De esta manera, la concentración de inóculo utilizada para la producción de enzimas depende del tamaño y tipo de microorganismo. Al igual que con otros factores, existe un nivel máximo óptimo, después del cual los niveles de producción de enzimas decrecen. Esto es debido probablemente al rápido crecimiento del microorganismo que provoca el consumo rápido de nutrientes, no permitiendo la producción de la enzima necesaria y posiblemente también a la disminución del oxígeno disponible en el medio de cultivo (Hasan y col., 2017; Niyonzima y col., 2020).

e Fuente y concentración de carbono

Los nutrientes que contienen carbono son la fuente primaria de energía para los microorganismos en los procesos de producción de enzimas industriales. Estas fuentes pueden ser de muchos tipos, desde azúcares simples como glucosa (Sethi y col., 2013; Mathur, 2014; Hasan y col., 2017), disacáridos como sacarosa (Hussain y col., 2017; Sidhu y col., 2017), maltosa (Chakraborty y col., 2012; More y col., 2016) y lactosa (Prasanna y col., 2016), hasta polisacáridos como almidón (Roy y col., 2012; Rodrigues y col., 2013; Hasan y col., 2017; Shwetha y col., 2017), celulosa (Tisma y col., 2012), carboximetilcelulosa (Sriariyanun y col., 2016; Pachauri y col., 2018), pululano (Asha y col., 2013; Waleed y col., 2015) y xilano (Sharma y col., 2016). También pueden ser aceites vegetales (Chauhan y Garlapati, 2013; Lailaja y Muthusamy, 2013; Nerurkar y col., 2013; Niyonzima y

More, 2013) y residuos agroindustriales de todo tipo, como cáscaras de naranja (Lincoln y More, 2018), salvado de trigo (Choudhary, 2012), hojas de plantas (Souza y col., 2015; El-Refai y col., 2017) y melazas (Lincoln y More, 2018). Industrialmente, las enzimas se producen con una concentración baja de la fuente de carbono, lo que hace el proceso redituable en costo. También se ha observado que, al aumentar significativamente las concentraciones de estos ingredientes en la fórmula, los niveles producidos de la enzima tienden a decrecer, debido posiblemente a una limitación del oxígeno disponible, necesario para la síntesis de la enzima (Niyonzima y More, 2013).

f Fuente y concentración de nitrógeno

La fuente de nitrógeno en el medio de cultivo juega un papel muy importante, no solamente como fuente de energía secundaria para los microorganismos, sino porque interviene en la formación de las estructuras como la pared celular, y siendo parte de los aminoácidos, péptidos, proteínas, nucleótidos y ácidos nucleicos. Para la producción de enzimas de bacterias se utilizan tanto fuentes orgánicas (peptona, triptona, extracto de levadura, extracto de carne, harinas de frijol y maíz) como inorgánicas (acetato de amonio, nitrato de potasio, sulfato de amonio. De manera similar, en el c aso de hongos se emplean fuentes orgánicas de nitrógeno como las anteriormente mencionadas, e inorgánicas (nitrato de amonio, nitrato de potasio, nitrato de sodio y nitrito de sodio). En los Cuadros 8 y 9 se muestran algunos ejemplos de reportes con el uso de estas fuentes de nitrógeno. En algunos casos, se consiguen producciones óptimas de enzima con combinaciones de fuentes orgánicas e inorgánicas de nitrógeno. Algunas veces se utilizan fuentes más económicas de nitrógeno como las harinas de maíz, frijol o soya en la producción industrial de enzimas (Wang y col., 2012; Lailaja y Muthusamy, 2013). Para la producción de enzimas de hongos, se usan en general las mismas fuentes orgánicas e inorgánicas de nitrógeno, siendo preferidas las de origen orgánico, ya que alcanzan en general mayores niveles de producción de enzima. Esta preferencia pudiera deberse a la presencia en dichos sustratos de otras sustancias que lo acompañan y que enriquecen el medio, como

vitaminas, aminoácidos y factores de crecimiento (Pathak y Deshmukh, 2012; Sinha y Khare, 2012). Las fuentes de nitrógeno estimulan la producción de enzimas industriales hasta cierto nivel, más allá del cual se observa una inhibición. De hecho, las fuentes complejas de nitrógeno orgánico pueden mostrar inhibición enzimática cuando se emplean en grandes cantidades porque son ricas en aminoácidos (como glicina) y péptidos cortos. Por lo tanto, una mayor concentración de fuente de nitrógeno inhibe la secreción de enzimas por bacterias u hongos (Niyonzima y col., 2020).

La concentración de nitrógeno en el medio de cultivo juega un papel importante en la producción y actividad de enzimas ligninolíticas. Sin embargo, los efectos producidos por la inclusión de nitrógeno varían entre las especies y cepas de hongos (Isroi y col., 2011). Un estudio pionero sobre el efecto de la composición del medio en la degradación de la lignina utilizando el hongo de podredumbre blanca *Phanerochaeta chrysosporium* reveló que la concentración de nitrógeno, independientemente de su tipo y fuente, es crítica para la degradación de la lignina, en algunos casos acelerando la degradación y en otros retardándola (Kirk y col., 1978). Se ha encontrado, por ejemplo, que al digerir con una proteasa el nitrógeno del tallo de cáñamo, la cepa BOS55 de *Bjerkandera* sp. aumentó la degradación de la lignina (Dorado y col., 2001). Por el contrario, en otro trabajo Mikiashvili y col. (2006) encontraron que la actividades enzimáticas de Lac, MnP y peroxidasas de *Pleurotus ostreatus* disminuyeron cuando el medio se suplementó con una fuente de nitrógeno inorgánico. Por otro lado, la suplementación de peptona y caseína a bajas concentraciones mostró efectos positivos sobre las actividades de Lac, MnP y LiP. Por su parte, Stajić y col. (2006) reportaron diferentes respuestas de *Pleurotus sp*. según la fuente de nitrógeno utilizada. Dichos autores encontraron también que *P. eryngii y P. ostreatus* produjeron lacasas con la mayor actividad cuando se usa $(NH4)_2SO_4$ como fuente de nitrógeno y que la producción de peroxidasas por *P. ostreatus* era mayor cuando se usó peptona.

g Agitación

Usualmente, para la producción industrial de enzimas se recurre a la agitación, la cual cumple con dos funciones principales. La primera, la de hacer asequible a los microorganismos los nutrientes del medio. La segunda es de permitir la aireación. Para bacterias y hongos, el rango de agitación más utilizado y el cual se obtienen los rendimientos de enzima más altos oscila entre las 100 y 200 rpm, como se puede constatar en los Cuadros 8 y 9. En el caso particular de las enzimas lacasas, la agitación es muy importante, ya que las enzimas lacasas requieren de mucho oxígeno para su formación y acción (Lallawmsanga y col., 2019).

D USO DE RESIDUOS DE *M. oleifera* EN LA ALIMENTACIÓN ANIMAL

1 Antecedentes

La demanda mundial de productos cárnicos se ha incrementado rápidamente en los últimos años, alcanzando los 338.8 millones de toneladas en 2019. La producción mundial de animales de granja consume más del 30% de la producción mundial de granos (Su y Chen, 2020). De la carne producida, 39.4% corresponde a la carne de aves (FAO, 2020). Este crecimiento en la producción avícola tiene un gran efecto en la demanda de piensos y materias primas, además de que estos alimentos representan el costo más alto de la producción en aves de corral. La soya es el alimento más utilizado en las dietas alimenticias de los animales de granja, debido a su alto contenido de proteínas. La disponibilidad de alimentos de bajo precio y alta calidad es fundamental para que la producción avícola pueda seguir siendo competitiva y aumentar para lograr satisfacer la demanda de proteína animal (Ravindran, 2013). Por otra parte, debido al cambio climático se estima que de no implementarse medidas adecuadas, la producción de alimentos se verá seriamente comprometida en el futuro, por una escasez y aumento de precios de las materias primas tradicionales usadas en la alimentación animal, en especial las ricas en proteína (Bailey, 2011). Por lo anterior, es de importancia estratégica la búsqueda de fuentes alternativas de proteína. En este sentido, se sugiere el uso de algunas plantas de hoja con alto contenido proteico como *Moringa oleifera* y *Leucaena* sp., ya que éstas además de proporcionar los elementos requeridos para suplir los requerimientos nutrimentales de los animales en mayor proporción que los pastos (Abou-Elezz y col., 2012; Bryant y col., 2014), también pueden ser explotados en zonas no destinadas a la agricultura intensiva. El contenido proteico de la hoja es superior incluso que el de la alfalfa y *Morus alba*. En el Cuadro 10 se muestra un comparativo de *M. oleifera* con otras fuentes forrajeras tradicionales y alternativas. Como se puede constatar, moringa destaca por su alto contenido de proteínas, lípidos y bajo proporción de fibra (Su y Chen, 2020)..

Cuadro 10. Comparación nutrimental de *M. oleifera* con otras fuentes alternativas de forraje

Alimento	Proteínas	Lípidos	Fibra	Cenizas
Forrajes de hoja de árbol				
Moringa oleifera	23.0–30.3	7.1	5.9	7.6–12.0
Morus alba	21.2–29.8	5.5	6.9	11.6
Broussonetia papyrifera	21.0	3.2	9.1	12.1
Caragana korshinskii	9.9	3.2	34.4	6.7
Leucaena leucocephala[1]	22.7	1.6	16.8	11.2
Forrajes tradicionales				
Alfalfa	19.1	2.3	22.7	7.6
Soya	25.5	17.3	4.3	4.2
Maíz	9.4	3.1	1.2	1.2

1 (Kaswarjono y col., 2019)

Otras plantas con un alto contenido proteico, como *Leucaena leucocephala*, presentan el inconveniente de su toxicidad atribuible al aminoácido mimosina, el cual es necesario inactivar adecuadamente para no presentar problemas en el crecimiento de los animales (Kaswarjono y col., 2019)

2 Contenido nutrimental de *M. oleifera*

M. oleifera es muy atractiva para la nutrición animal, debido a su contenido nutrimental. Como ya se vio anteriormente, la planta de *Moringa oleifera* es muy completa nutricionalmente. Sus hojas secas contienen aproximadamente 27 a 30% de proteínas con un balance adecuado de aminoácidos esenciales, a diferencia de los granos de los cereales que son deficientes en lisina y triptófano (Cuadro 11).

Destacan por su importancia los altos contenidos de minerales indispensables en la dieta animal como calcio, fósforo, potasio y hierro, pudiéndose considerar una buena fuente de ellos (Olagbemide y col., 2014; Barakat y Ghazal, 2016). También, las hojas de moringa son una buena fuente de vitaminas A, B1, B2, B3, C y E (Olagbemide y col., 2014; Gandji y col., 2018). Es igualmente de gran relevancia el buen balance de aminoácidos esenciales mostrado tanto en las proteínas de la hoja como de la semilla, siendo mejor en este aspecto que fuentes tradicionales de forraje como el maíz, el cual es deficiente en lisina y triptófano (Al-Juhaimi y col., 2017).

Es destacable en *M. oleifera* el bajo contenido de factores antinutricionales (Cuadro 12). Makkar y Becker (1997) mencionan que las concentraciones de factores antinutricionales (taninos, inhibidores de la tripsina y la amilasa, lectinas y glucósidos cianogénicos, glucosinolatos y saponinas) son insignificantes en las hojas, peciolos y tallos de *M. oleifera*. Las semillas, semilla desgrasada y semilla extraída en agua presentaron bajos niveles de saponinas, mientras que inhibidores de la tripsina y de amilasa estaban ausentes. Sin embargo, observaron actividad hemolítica en semillas descascarilladas y desgrasadas, lo cual también fue reportado por Oliveira y col. (1999), pero no en aquellas extraídas con agua.

Cuadro 11. Composición nutricional de hojas secas y semilla de *M. oleifera* (100 g)

Componente	Hojas	Semillas
	Castillo y col. (2018)	**Leone y col. (2016)**
Humedad (%)	6.27	7.0
Calorías (Kcal)	348.52	747.70[1]
Proteínas (g)	28.90	31.40
Lípidos (g)	12.63	36.7
Carbohidratos (g)	21.00	18.4
Fibra cruda (g)	8.49	7.3
Minerales traza (mg)	**Barakat y Ghazal (2016)**	**Olagbemide y col. (2014)**
Calcio	254.19	751.67
Magnesio	64.40	45.00
Fósforo	738.15	635.00
Potasio	1278.65	75.00
Hierro	185.28	5.20
Sodio	1475.31	ND
Vitaminas (mg)	**Gandji y col. (2018)**	**Olagbemide y col. (2014)**
Vitamina A-βcaroteno	16.3	ND
Vitamina B1	2.64	0.05
Vitamina B2	20.5	0.06
Vitamina B3	8.2	0.02
Vitamina C	17.3	4.5
Vitamina E	113	ND
Aminoácidos (g)	**Al-Juhaimi y col. (2017)**	**Al-Juhaimi y col. (2017)**
Alanina	1.61	2.25
Arginina	1.82	2.55
Aspartano	2.19	3.06
Cisteína	0.28	0.39
Fenilalanina	1.60	2.23
Glicina	1.45	2.03
Glutamato	2.66	3.72
Hidroxilisina	0.69	0.97
Hidroxiprolina	0.10	0.14
Histidina	0.73	1.02
Isoleucina	1.16	1.62
Leucina	2.07	2.90
Lisina	1.54	2.16
Metionina	0.56	0.78
Ornitina	0.06	0.08
Prolina	1.28	1.79
Serina	1.06	1.48
Taurina	0.11	0.15
Tirosina	0.92	1.28
Treonina	1.27	1.77
Triptófano	0.51	0.71
Valina	1.35	1.88

ND=valor no reportado o declarado. 1 (Ogunsina y col., 2010);

Cuadro 12. Contenido de factores antinutricionales de moringa

Sustancia antinutricionales	Hoja	Semilla
Taninos totales	20.6[1] mg g^{-1}	1.89[5]
Inhibidores de tripsina	1.45[1] UIT g^{-1}	ND
Nitratos	17[1] mg g^{-1}	ND
Ácido oxálico	10.5[1] mg g^{-1}	1.55[6]
Fitatos	21.0[2] mg g^{-1}	26.0[2] mg g^{-1}
Saponinas	16.1[3] mg g^{-1}	3.89[6] mg g^{-1}
Lectinas	ND	2.05[4] UH kg^{-1}
Compuestos cianogénicos	Ausentes	6.2[2] mg g^{-1}

1 (Teixeira y col., 2014); 2 (Makkar y Becker, 1997); 3 (Devisetti y col., 2016); 4 (Oliveira y col., 1999); 5 (Ijarotimi y col., 2013); 6 (Stevens y col., 2016). ND= No determinado. UH=Unidades de hemoglutinina.

En general, los niveles de factores antinutricionales encontrados en moringa son muy bajos y no representan una limitante para su uso en la mayoría de las posibles aplicaciones en la alimentación animal (Cuadro 12). De los valores mostrados en dicho cuadro, destacan en hoja, el contenido de ácido oxálico, taninos, fitatos y saponinas, mientras que, en semilla, fueron los altos contenidos de fitatos, lectinas y compuestos cianogénicos. Sin embargo, estos valores son inferiores a los reportados para otras plantas consideradas altas en esos antinutrientes, como la espinaca, la soya y la malanga (Oliveira y col., 1999; Teixeira y col., 2014).

3 *M. oleifera* en la alimentación animal

Se han realizado muchos estudios sobre el uso de moringa en la alimentación animal desde hace varias décadas, siendo reportado por primera vez desde 1962. Se usan principalmente las hojas, frutos y residuos de la extracción del aceite de la semilla (Ramachandran y col., 1980; Su y Chen, 2020). Muchas de las propiedades químicas de estos componentes de la planta fueron detalladamente descritos por Ramachandran y col. (1980), en especial el perfil de aminoácidos.

a Rumiantes

Comparados con los monogástricos, los rumiantes son capaces de digerir celulosa, lignina y otros metabolitos secundarios debido a sus estructuras ruminales y a los microorganismos que crecen en ellas, donde las enzimas digestivas descomponen las sustancias macromoleculares. Dado este sistema digestivo único, los rumiantes pueden degradar forrajes de árboles, como *M. oleifera*, rápidamente. En un estudio realizado por Fadiyimu y col. (2017) con carneros, suplementaron con diferentes niveles de harina de hojas de *M. oleifera* en las dietas diarias como sustitutos de las harinas de semillas de algodón, no afectando el aumento de peso corporal en relación al grupo de control. De manera similar, en un ensayo de alimentación de cabras con hojas de *M. oleifera*, Manh y col. (2005) no encontraron diferencias en el consumo de alimento, la tasa de rumia y la digestibilidad en comparación con las obtenidas

con un control con *Leucaena leucocephala*, planta utilizada en la producción de alimentos para ganado durante mucho tiempo. Igualmente, Pérez-Ángel (2011) encontró que ovinos alimentados con dietas conteniendo 20 a 60% de hoja de *M oleifera* en sustitución de alfalfa en la dieta tuvieron un desarrollo similar al de aquellos alimentados con una dieta con solo alfalfa. En ese estudio, se observó que la digestibilidad aparente del heno de moringa fue de 62%, contra 68% de la alfalfa, mientras que la digestibilidad aparente de proteína fue de 75%, contra 72.3% de la alfalfa, lo que confirma la buena digestibilidad de la proteína de moringa en ovinos. Aregheore (2002) encontró resultados similares con cabras alimentadas con hojas frescas de *M. oleifera* al 20 y 50% como reemplazo del pasto batiki. Fadiyimu y col. (2017) reportaron buena ingesta y digestibilidad de proteína cruda, materia seca y de nutrientes, retención de nitrógeno y aumento del perfil hematológico en ovejas enanas de África occidental alimentadas con harina de *Panicum maximum* con suplementos de hojas de *M. oleifera* al 25%.

Por otro lado, de acuerdo con Kholif y col. (2018), la suplementación con hojas de *M. oleifera* para reemplazar el 75% de la materia seca del trébol berseem puede mejorar la ingesta de alimento en cabras nubias, observándose aumento de los niveles de proteína total, albúmina y glucosa en suero, y disminución de los niveles de colesterol y triglicéridos en sangre. Este estudio mostró que la suplementación en la dieta con hojas de moringa puede mejorar la calidad de la carne. Así mismo, diversos trabajos concluyen también que la suplementación con hoja o extractos de hoja de *M. oleifera* aumentan la producción y calidad de leche en diversos rumiantes (Sánchez y col., 2006; Kholif y col., 2019).

b Monogástricos

La harina de hojas de *M. oleifera* ha mostrado buenos resultados en la mejora de la calidad y rendimientos de carne de cerdo. Según Mukumbo y col. (2014), los cerdos de engorde alimentados con hasta 5% de hojas de *M. oleifera* no mostraron efectos negativos en la tasa de conversión alimenticia y las

características de la canal e incluso mejoraron las cualidades sensoriales de la carne en almacenamiento refrigerado prolongado. Sin embargo, con un 7.5% de harina de hojas de *M. oleifera* aumento el alimento consumido, pero disminuyó la conversión alimenticia. Resultados similares fueron reportados por Zhang y col. (2019), quienes mejoraron el crecimiento de cerdos en dietas con 6% de hoja de moringa, quienes señalan además que el consumo de hoja de moringa modificó positivamente el perfil de ácidos grasos de la carne, aumentando los monoinsaturados y disminuyendo los saturados.

c Peces

Se ha reportado el uso de la hoja de *M. oleifera* en acuacultura. Entre otros, Adeshina y col. (2018) utilizaron la hoja en la suplementación de *Cyprinus carpio* encontrando que la sustitución de hasta 30% de la harina de soya con hoja de moringa mejora el rendimiento y la respuesta inmune en el periodo juvenil de la carpa. Por su parte, Pérez-Viveros y col. (2019) obtuvieron buenos resultados con el uso de 11.5 % de hoja de *M. oleifera* en la dieta de *Oreochromis niloticus* adulta. Resultados similares fueron obtenidos por Abd El-Gawad y col. (2019), quienes encontraron además un incremento en el conteo de glóbulos blancos y ausencia de cambios en el contenido de glóbulos rojos y hemoglobina de tilapia del Nilo alimentada con 5% de harina hoja de *M. oleifera* en la dieta.

d Aves

Se han realizado diversos ensayos con aves para determinar el efecto de hoja (HHMO) y semilla de moringa (HSMO) en la dieta sobre parámetros de crecimiento. Se han encontrado resultados en algunos casos contradictorios entre los diversos autores.

1) Gallinas ponedoras

Kakengi y col. (2007) señalan la adición de 10% y 20% de harina de hoja de *Moringa oleifera* a la dieta de gallinas ponedoras, como sustituto de la semilla de girasol. Los resultados sugieren que la HHMO puede reemplazar la harina de semilla de girasol hasta un 20% sin efectos negativos en las gallinas ponedoras. Sin embargo, recomiendan un 10% para óptimos resultados. Así

mismo, la adición de 5% de HHMO aumentó significativamente el peso del huevo. Por su parte, Olugbemi y col. (2010) observaron que la suplementación de HHMO a niveles de hasta el 10% en una dieta a base de yuca en gallinas ponedoras no tenía efecto significativo negativo en el consumo de alimento, la conversión alimenticia y el porcentaje de postura. El peso del huevo aumentó significativamente como resultado de la administración de suplementos de HHMO a trozos de yuca, en comparación con una dieta control (libre de HHMO harina y trozos de yuca). Abou-Elezz y col. (2012), mencionan que la inclusión de diferentes niveles de HHMO (0%, 5%, 10% y 15%) en las dietas de gallinas ponedoras redujeron linealmente el porcentaje de puesta de huevos y su masa, mientras que el peso del huevo y el consumo de alimento mostraron una tendencia cuadrática con el aumento de los niveles de HHMO sin afectar significativamente el índice de conversión. En general, los autores anteriores coinciden en que la inclusión de hasta un 10% de HHMO no produjo efectos adversos en los parámetros de productividad de gallinas ponedoras, pero era probable que los niveles superiores de 20% redujeran la productividad.

2) Aves de engorda

Juniar y col. (2008) señalan que la inclusión de hasta un 10% de HHMO no produjo efectos significativos negativos sobre la alimentación, el consumo, el peso corporal, el índice de conversión, peso de la carcasa, factor de eficiencia de la producción e ingresos respecto al de los piensos comerciales en pollos de engorda. Resultados similares fueron obtenidos por Gadzirayi y Mupangwa (2013) con pollos indígenas en África y por {Gakuya, 2014 #413@@author-year} quienes analizaron el efecto sobre el huevo de gallinas ponedoras alimentadas con diferentes dosis de HHMO. Oghenebrorhie y Oghenesuvwe (2016) encontraron que la inclusión de hasta un 10% de HHMO en la dieta de pollos de engorde no tuvo efecto negativo sobre la ganancia de peso, conversión alimenticia (CA) y el peso vivo final. Castillo y col. (2018) observaron que la inclusión de la hoja de *M. oleifera* en la etapa inicial en codornices

japonesas inhibió la ganancia de peso (GP) y aumentó la CA; sin embargo, en el período de engorde no se vieron afectados estos parámetros.

Por su parte, Abbas y Ahmed (2012) llevaron a cabo un experimento para estudiar el efecto de la harina de semilla descascarillada de *M. oleifera* (HSMO) en diferentes de porcentajes de inclusión en la dieta de los pollos de engorde (0%, 0.37%, 0.75% y el 1.5%). En particular sobre el rendimiento y características de la canal. Los autores observaron que durante el período de inicio (8-21 días), el uso de 1.5% HSMO redujo significativamente ($P<0.05$) el aumento de peso, el peso corporal y la eficiencia alimenticia. Durante la etapa de finalización (22-35 días), en cambio, y en el global (8-35 días), los niveles de suplementación de 0.37%, 0.75% y 1.5% de HSMO no produjeron ningún efecto sobre la ganancia de peso, el cuerpo vivo final, la eficiencia alimenticia, rendimiento de la canal y los pesos del hígado y corazón del animal. Por lo tanto, el uso de HSMO en una proporción de hasta 1% durante el período de finalización supera el efecto negativo del período de inicio. Por lo tanto, es mejor utilizar este nivel durante sólo el período de finalización.

IV OBJETIVOS

A OBJETIVO GENERAL

Determinar las características químicas y de productividad agronómica de ecotipos de *Moringa oleifera* presentes en el estado de Sinaloa y desarrollar a partir de hojas, tallos y semillas, productos y bioprocesos de biorrefinería de interés en las industrias de bioenergéticos, producción de enzimas y de la alimentación animal.

1 Objetivo específico A

Determinar las características de productividad de biomasa y aceite, las características proximales de hoja, tallo y semilla, así como las características de la lignocelulosa de seis ecotipos de *Moringa oleifera* introducidos en el estado de Sinaloa.

Objetivos subespecíficos

1) Cuantificar el crecimiento y la productividad de biomasa de las diferentes partes aéreas de árboles de seis ecotipos regionales de *M. oleifera* al momento de la cosecha.

2) Determinar proximalmente las cualidades de la biomasa lignocelulósica y semillas de seis ecotipos regionales de *M. oleifera*.

3) Determinar el perfil de celulosa, hemicelulosa y lignina del tallo de seis ecotipos regionales de *M. oleifera*.

4) Seleccionar dentro de los ecotipos estudiados, uno por su alta capacidad de producción de biomasa lignocelulósica y otro por su productividad de aceite.

2 Objetivo específico B

Seleccionar y caracterizar la capacidad de producción de enzimas lignocelulolíticas y etanol de hongos autóctonos degradadores de madera, para su uso en las etapas de pretratamiento biológico, hidrólisis y fermentación de lignocelulosa de *Moringa.*

Objetivos subespecíficos

1) Recolectar e identificar morfológicamente cepas de hongos ascomicetos y basidiomicetos, presentes en el Estado de Sinaloa, con potencial para la producción de etanol y enzimas lignocelulolíticas.

2) Determinar cuantitativamente la capacidad de producción de etanol y de celulasa, xilanasa, manganeso peroxidasa y lacasa de hongos nativos del estado de Sinaloa, mediante fermentación en medio sumergido en *M. oleifera*. Seleccionar al menos una especie con capacidades sobresalientes fermentativa, hidrolítica y lignolítica.

3) Identificar molecularmente los hongos sobresalientes por su capacidad lignolítica, hidrolítica y fermentativa.

3 Objetivo específico C

Optimizar la producción de enzima lacasa del hongo *Trametes polyzona* en medio sumergido conteniendo madera de *Moringa oleifera* y determinar su capacidad ligninolítica.

Objetivos subespecíficos

1) Optimizar por la metodología de superficie de respuesta y de diseño ortogonal de Taguchi las condiciones de cultivo físicas, químicas y nutricionales para la producción de lacasas de un hongo seleccionado en medio sumergido con sustrato a base de madera de *M. oleifera*.

2) Probar la actividad lignolítica de los extractos enzimáticos del hongo basidiomiceto seleccionado en madera de *M. oleifera*.

4 Objetivo específico D

Probar el efecto de la inclusión en la dieta sobre el crecimiento de codornices japonesas (*Coturnix japonica japonica*) de las harinas de semilla desgrasada y de un residuo fermentado de *Moringa oleifera*.

Objetivos subespecíficos

1) Producir y caracterizar proximalmente torta de prensado de semillas de *M. oleifera* y un fermentado alcohólico del consorcio *Mucor circinelloides-Saccharomyces cerevisiae* en medio sumergido utilizando hoja de *M. oleifera* como sustrato.

2) Formular dietas de iniciación y de finalización isocalóricas e isoproteicas del residuo fermentado de biomasa y de la torta de prensado de semillas de *M. oleifera*.

3) Probar el efecto de la inclusión en la dieta de las formulaciones de los residuos de *M. oleifera* sobre los siguientes parámetros de crecimiento en codornices japonesas: a) peso vivo, b) ganancia de peso, c) tasa de conversión alimenticia y d) mortalidad.

4) Determinar los siguientes parámetros de rendimiento de la carne de codornices alimentadas con los residuos de fermentados y de semilla de *M. oleifera*: a) peso de canal caliente, b) peso de canal fría, c) rendimiento de canal caliente, d) rendimiento de canal fría.

V MATERIALES Y MÉTODOS

A Crecimiento, rendimientos y análisis químico de *M. oleifera*

1 Ubicación del área experimental

Este experimento se realizó entre el 8 de marzo de 2015 y el 30 de junio de 2016. Se localizó en el Valle de Culiacán, en las coordenadas 24° 59' 06" y 107° 22' 44" y entre 95-99 m sobre el nivel del mar, a 2 km de la comunidad de Tecolotes, en el interior de un huerto de naranja conocido como Los Azahares. La precipitación para el periodo fue de 408 mm, concentrada en los meses de julio a septiembre, con un promedio de 56 días lluviosos. La temperatura máxima anual en el año fue 41 °C en julio y el mínimo 7 °C en enero. La precipitación promedio para el año fue de 407.67 mm. La estación seca es entre noviembre y mayo y la estación lluviosa de junio a octubre.

2 Material biológico

Se utilizaron semillas de 6 lugares de origen, de los estados de Sinaloa, Sonora y Guerrero y fueron nombrados de acuerdo con su lugar de origen “Culiacán”, “Elota”, “Guerrero”, “Mojolo”, “Sinaloa” y “Sonora”.

3 Manejo agronómico

Se sembraron 120 semillas de cada ecotipo en bandejas de germinación de poliestireno conteniendo suelo para germinación de una mezcla comercial de turba de musgo, vermiculita, calcita, dolomita, macro y micronutrientes (Sogemix VTM, Canadá). Se aplicó un riego diario y después de 6 semanas las plántulas se plantaron en el campo experimental. Los árboles se dividieron en dos lotes, cada uno compuesto de 6 hileras con 24 plantas, separadas en 4 bloques de 6 plantas cada uno, donde se colocó una planta de cada ecotipo al azar, de tal manera que en cada hilera crecieron 4 plantas de cada ecotipo, como se muestra en la Figura 13. La distancia entre hileras fue de 3 metros y la separación entre plantas de 2 metros. Se aplicó un riego mensual a través de un sistema de riego por goteo.

4 Medición de crecimiento de árboles

Cada 45 días a partir de la fecha de siembra y hasta el día 180, se midieron la altura de cada árbol (m) y el diámetro (cm) del tallo en su base.

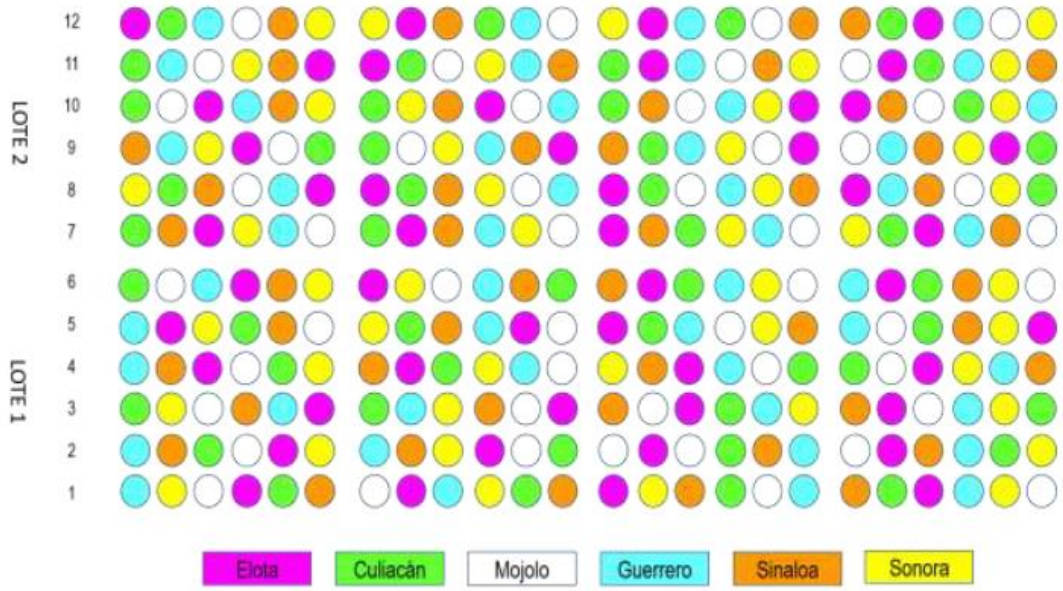


Figura 13. Distribución de los árboles de los seis ecotipos utilizados en el lote experimental.

5 Cuantificación de la biomasa

La cosecha de los frutos secos y del material lignocelulósico se realizó 480 días después de la siembra. Para ello se seleccionaron al azar 12 árboles de cada ecotipo. Los tallos y follaje se recogieron cortando el tronco a 30 cm del suelo. Todos los materiales, excepto frutos, se trituraron mecánicamente y se secaron a 60 °C por 48 h. Se determinó la biomasa fresca y seca obtenida de tallos, hojas, frutos y semillas para cada árbol y se guardaron muestras para los análisis químicos.

6 Análisis proximal de material lignocelulósico

Se realizaron análisis proximales del material colectado mediante la metodología descrita por la AOAC (2005). Las determinaciones consideradas fueron humedad, cenizas totales, proteínas, lípidos, fibra cruda y extracto libre de nitrógeno (carbohidratos).

a Humedad

Se aplicó el método 930.04 de la AOAC (2005). Se colocó una cápsula destapada y la tapa durante al menos 1 hora en la estufa a la temperatura de secado del producto. Se trasladó la cápsula tapada al desecador y se dejó enfriar durante 30 a 45 min. Se pesó la cápsula con tapa con una aproximación de 0.1 mg. Registrar m_1. Se pesaron 5 g de muestra previamente homogeneizada. Registrar m_2. Se colocó la muestra con cápsula destapada y la tapa en la estufa a 105 ºC por 5 h. Se tapó la cápsula con la muestra, se sacó de la estufa, se enfrió en desecador de 30 a 45 min. Se repitió el procedimiento de secado por una hora adicional, hasta que las variaciones entre dos pesadas sucesivas no excedean de 5 mg (m_3). El porcentaje de humedad se calculó con la siguiente fórmula:

$$\%\ humedad = \frac{(m_2 - m_3)}{(m_2 - m_1)} \times 100 \qquad \text{(Ec. 1)}$$

Donde, m_1 masa de la cápsula vacía y de su tapa, en gramos; m_2: masa de la cápsula tapada con la muestra antes del secado, en gramos; m_3: masa de la cápsula con tapa más la muestra desecada, en gramos. Promediar los valores obtenidos y expresar el resultado con dos decimales.

b Cenizas totales

Se siguió el método 930.05 de la AOAC (2005). Para ello, se pesaron en una cápsula previamente calcinada y tarada (m_0) 2 g de muestra homogeneizada (m_1). Se precalcinó la muestra en placa calefactora, evitando que se inflame, luego se colocó en la mufla e incineró 8 h a 550 °C, hasta cenizas blancas o grisáceas. Se preenfrió en la mufla apagada y si no se logran cenizas blancas o grisáceas, se humedecieron con agua destilada, se secaron en baño de agua y se sometieron nuevamente a incineración. Se dejan enfriar en desecador y pesan (m_2). El contenido de cenizas se calcula como sigue:

$$\%\, cenizas = \frac{(m_2 - m_0)}{(m_1 - m_0)} \times 100 \qquad \text{(Ec. 2)}$$

Donde, m_2 = masa en gramos de la cápsula con las cenizas; m_1 = masa en gramos de la cápsula con la muestra; m_0 = masa en gramos de la cápsula vacía.

c Lípidos

Se determinó el contenido de aceite por el método de 920.39 de la AOAC (2005). En muestras previamente secadas a 103 ºC, se pulverizaron en un molino eléctrico (Hoffman Manufacturing, Stein M-2 Sample Mill, USA) por 5 minutos y se pasa por tamiz #40. Se pesaron por duplicado 2 a 5 gramos de muestra preparada en un dedal de extracción o papel filtro previamente pesado y tapado con algodón desgrasado. Se coloca el dedal en un sistema de extracción Soxhlet (Kimax, México) y se adicionan aproximadamente 100 mL de éter de petróleo al matraz. Se colocó el aparato Soxhlet sobre una placa calefactora (Craft modelo ES-600, México), donde se extrajo la muestra por 6 a 8 h a una velocidad de condensación de 3-6 gotas/s. Una vez terminada la extracción se eliminó el solvente por evaporación en baño María bajo campana hasta que no se detecte olor a éter. Se secó el matraz con la grasa en estufa a 103+ 2 °C por 10 min, se enfrió en desecador y se pesó. El porcentaje de lípidos se calcula de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\%\, lípidos = \frac{(m_2 - m_1)}{(m - m_0)} \times 100 \qquad \text{(Ec. 3)}$$

Donde, m_0 = peso del dedal o papel filtro; m = peso del dedal más la muestra; m_2 = peso de matraz más extracto; m_1 = peso de matraz.

d Proteínas

Se utilizó el método 960.52, micro-Kjeldahl, de la AOAC (2005) para la determinación de nitrógeno en un equipo digestor Craft MKG-600 (México). Se digirieron 0.2 g de muestra, con 2 mL de ácido sulfúrico y 0.3 g de catalizador de sulfato de potasio con sulfato de cobre a una temperatura de 200 ºC. Se destiló la muestra previamente diluida con 25 mL de agua en un microdestilador Craft modelo MKD-100, se emplearon disoluciones de NaOH al 40% y ácido bórico al 4% como indicador para recibir el destilado. La titulación se llevó a cabo con una disolución valorada de HCl 0.1 N utilizando un indicador de rojo de metilo. Posteriormente, la proteína cruda se calculó por multiplicación del contenido de nitrógeno total por el factor 6.25.

$$\%\,proteínas = \frac{(Normalidad * mL\ de\ HCl\ gastado * 0.014 * 6.25)}{(Peso\ de\ muestra\ )} x\ 100 \qquad \text{(Ec. 4)}$$

e Fibra cruda

Se utilizó el método 962.09 (AOAC, 2005). Se pesaron alrededor de 2 g de muestra previamente extraída de grasa y se trasfirieron a un vaso de Berzelius de 600 mL. Se agregaron 1.5 a 2.0 g de fibra cerámica preparada y 200 mL de H_2SO_4 0.255 N, hirviente, gotas de antiespumante y perlas de vidrio. Se conectó el aparato de calentamiento marca Craft, modelo FC-600 (México) y se hirvió exactamente durante 30 minutos, rotando el vaso periódicamente. Se desmontó el equipo y se filtró a través de un embudo Büchner. Se lavó con 50 a 75 mL de agua hirviente, repitiendo el lavado con 3 porciones de 50 mL de agua o hasta que cese la reacción ácida. Se retornó el residuo al aparato de calentamiento a reflujo y se hirvió durante 30 minutos, rotando el matraz periódicamente. Se lavó con 25 mL de H_2SO_4 0.255 N hirviente, con 3 porciones de 50 mL de agua hirviente y con 25 mL de etanol al 95%. Se removió el residuo y transfirió al crisol. Se secó en estufa a 130 ± 2 °C por 2 h y se enfrió en desecador y pesó. Se incineró 30 minutos a 600 ± 15 °C, se enfrió en desecador y pesar. Se procesó un blanco en las mismas condiciones que la muestra.

$$\%\,Fibra\ cruda = \frac{(Pérdida\ de\ peso\ en\ inciniración - pérdida\ de\ peso\ de\ blanco)}{(Peso\ de\ muestra\ )} x\ 100 \qquad \text{(Ec. 5)}$$

f Extracto libre de nitrógeno

Se obtiene de restar los valores de ceniza, proteína, lípidos y fibra cruda del 100%:

$$\% \, ELN = 100 - (ceniza + proteína + lípidos + fibra\ cruda) \qquad \text{(Ec. 6)}$$

7 Perfil de ácidos grasos del aceite

a Extracción del aceite

Para la obtención del aceite que fue utilizado en la determinación del perfil lipídico y esteroles se realizó una extracción hexánica asistida por ultrasonido. Ésta consistió en lo siguiente: se mezclaron 30 g de semilla destestada, molida y tamizada (malla 1 mm) y hexano en una relación 1:6. Después se sometió a ultrasonicación en un procesador Hielscher modelo UP200S a una amplitud de 65% por una hora utilizando un vástago de sonicación. Se filtró al vacío en un matraz Kitasato, un embudo de filtración de 9 cm y papel filtro Whatman número 40. Se evaporó el hexano en un rotaevaporador Yamato RE-300 en un baño María a una temperatura de 40 °C y presión de vació a -60 mmHg a una velocidad de rotación de 60 rpm hasta que cese la evaporación de hexano. Posteriormente el hexano residual se eliminó por evaporación en una estufa de secado a 60 °C durante 12 h. Se almacenó el aceite en tubos para centrífuga de 50 mL (Soto-León y col., 2014).

b Cuantificación cromatográfica

Para la caracterización del perfil lipídico, se llevó a cabo una sono-transesterificación del aceite extraído. Para esta reacción se utilizó una relación molar metanol/aceite (60:1) y 0.85% en peso de KOH como catalizador, en un procesador ultrasónico modelo UP200S Hielscher Ultrasonics por un tiempo de 60 segundos. Se separó el glicerol por evaporación rotatoria al vacío y finalmente, la fase oleosa se filtró usando filtros Whatman de 0.22 µm. El análisis cualitativo de la composición de los ácidos grasos en los aceites de moringa se realizó en un equipo de cromatografía de gases Agilent 6890N acoplado a un espectrómetro de masas Agilent 5973, utilizando columna Omega Wax 250, helio como gas acarreador e inyector automático serie 7683. Las condiciones de operación fueron; volumen de inyección, 1 µL; flujo, 1 mL min^{-1}; temperatura de columna, 50

°C a 270 °C (10 min) con rampa de calentamiento de 5 °C min^{-1} (Soto-León y col., 2014).

8 Perfil lignocelulósico de tallos

a Extraíbles

Para cuantificar extraíbles que interfieren en las determinaciones de lignina y celulosa, se siguió la metodología de la norma TAPPI T 204 cm-97 (TAPPI, 1997). A la muestra molida se mezcló con 10 volúmenes de agua destilada a 95 °C con agitación durante 3 h. Se filtró la madera y secó a 105 °C en estufa (Fisher Scientific, 625G, USA). Enseguida se lavó con una mezcla de solventes etanol-benceno (agua) 1:2 v/v por 4 h. Se filtró al vacío y se lavó con etanol absoluto y después se realizaron tres lavados con agua (un lavado cada hora). Se dejó nuevamente en la estufa a 60 °C.

b Holocelulosa

La cuantificación de la holocelulosa se realiza siguiendo el método ASTM D-1104 (ASTM, 2010), el cual consiste en pesar 2 g de muestra libre de extraíbles y colocarlo en un frasco de 250 mL. Se tratan con 150 mL de agua, 0.2 mL de ácido acético y 1 g de clorito sódico en un baño de agua a 70-80 ˚C. Cada hora, y durante 5 h, se añaden 0.22 mL de ácido acético muy frío y 1 g de clorito sódico. Transcurridas las 5 horas, se coloca el frasco en un baño de hielo hasta que la temperatura alcance 10 ˚C. Finalmente se filtra el contenido del frasco, se lava con 500 mL de agua fría y se observa que el residuo, que estaba amarillo, haya virado a color blanco. Se secan los crisoles a 105 ± 3 ˚C hasta peso constante. El procedimiento se realiza por triplicado.

c Celulosa

El contenido de celulosa se determinó mediante el método de Kushner y Höffer, reportado por Crespo y col. (2013). Se tomó 1 g de muestra anhídrida libre de extraíbles y se le agregaron 5 mL de HNO_3 concentrado y 20 mL de etanol absoluto. Se agitó en baño María durante 30 minutos. Se decantó el líquido y se realizó una segunda hidrólisis con la misma proporción de HNO_3:etanol. Después de la segunda digestión se lavó con 100 mL de agua destilada, seguida de otro con 100 mL de solución saturada de acetato de sodio (25g en 100 mL). Se filtró

en embudo Buchner de porosidad fina; al sólido se le agregan 500 mL de agua caliente. El residuo se secó a 105 °C por 24 horas en un crisol previamente secado bajo las mismas condiciones y tarado en balanza digital. El residuo seco se pesa en balanza digital. El porcentaje de celulosa se calculó en base a la siguiente ecuación.

$$\%\,Celulosa = \frac{(Peso\ de\ crisol + celulosa) - (Peso\ de\ crisol)}{Peso\ de\ muestra}\,x\,100 \qquad \text{(Ec. 7)}$$

d Lignina

La cuantificación de la lignina se realizó según el procedimiento NREL/TP-510-42618 (Sluiter y col., 2008). Este procedimiento consiste en una hidrólisis ácida en dos etapas para fraccionar la biomasa en productos más fácilmente cuantificables. La lignina se transforma de esta manera en materia ácida insoluble y soluble. Para la determinación de la lignina se pesan 300.0 ± 10.0 mg de muestra en un tubo con tapón roscado. Cada muestra se analizó por duplicado. Se añaden 3.00 ± 0.01 mL de ácido sulfúrico del 72% a cada tubo de presión. Se dejan los tubos de presión en un baño de agua a 30 ± 3 ˚C e incubó la muestra durante 60 minutos. Una vez completada la hidrólisis, se sacaron los tubos de presión del baño y se diluye el ácido a una concentración del 4% añadiendo 84 mL de agua destilada. Se introducen los tubos de presión en una autoclave, se mantienen durante 1 h a 121 ˚C. Una vez completado el ciclo se dejan enfriar lentamente las muestras hidrolizadas antes de retirar los tapones.

La determinación de la lignina ácida soluble se realiza filtrando a vacío las disoluciones de hidrólisis y se recoge el filtrado, siendo necesarias 6 horas de hidrólisis. Una vez transcurridas las 6 horas de hidrólisis de las alícuotas, se mide la absorbancia de cada una de ellas en el espectrofotómetro UV-VIS (PG Instruments T80 UV/VIS Espectrometer). La lignina ácida insoluble se determina lavando los sólidos con agua destilada, se seca el residuo ácido insoluble a 105 ± 3 ˚C hasta alcanzar peso constante.

Para calcular la lignina ácida soluble se aplica la siguiente ecuación:

$$\%\,Lignina\ Ácida\ Soluble = \frac{(UVabs\ x\ Vfil\ x\ FD)}{(\varepsilon\ x\ W\ x\ L\ )}\,x\,100 \qquad \text{(Ec. 8)}$$

Donde:

UVabs = promedio de absorbancia UV-Vis de la muestra a 240 nm.

Vfil = volumen del licor de filtrado, 26.019 mL,

ε = Absorcividad de la biomasa a la longitud de onda específica, 25,

W = peso de la muestra en miligramos,

L = ancho de la celda UV-Vis en cm,

Y FD, factor de dilución, está dada por la ecuación siguiente:

$$FD = \frac{(Volumen\ de\ muestra + Volumen\ de\ diluyente)}{(Volumen\ de\ muestra)} \qquad \text{(Ec. 9)}$$

9 Diseño y análisis experimental

El diseño experimental consistió en un diseño totalmente al azar con 12 repeticiones por tratamiento (ecotipo) donde las variables de respuesta correspondieron a cada una de las características de crecimiento y producción de biomasa descritas en los incisos anteriores. El análisis experimental se realizó utilizándose el paquete estadístico Minitab 17, aplicándose un análisis de varianza y una comparación de rangos múltiples de Tukey con un intervalo de confianza de 95%. La Figura 14 muestra la estrategia experimental de esta sección.

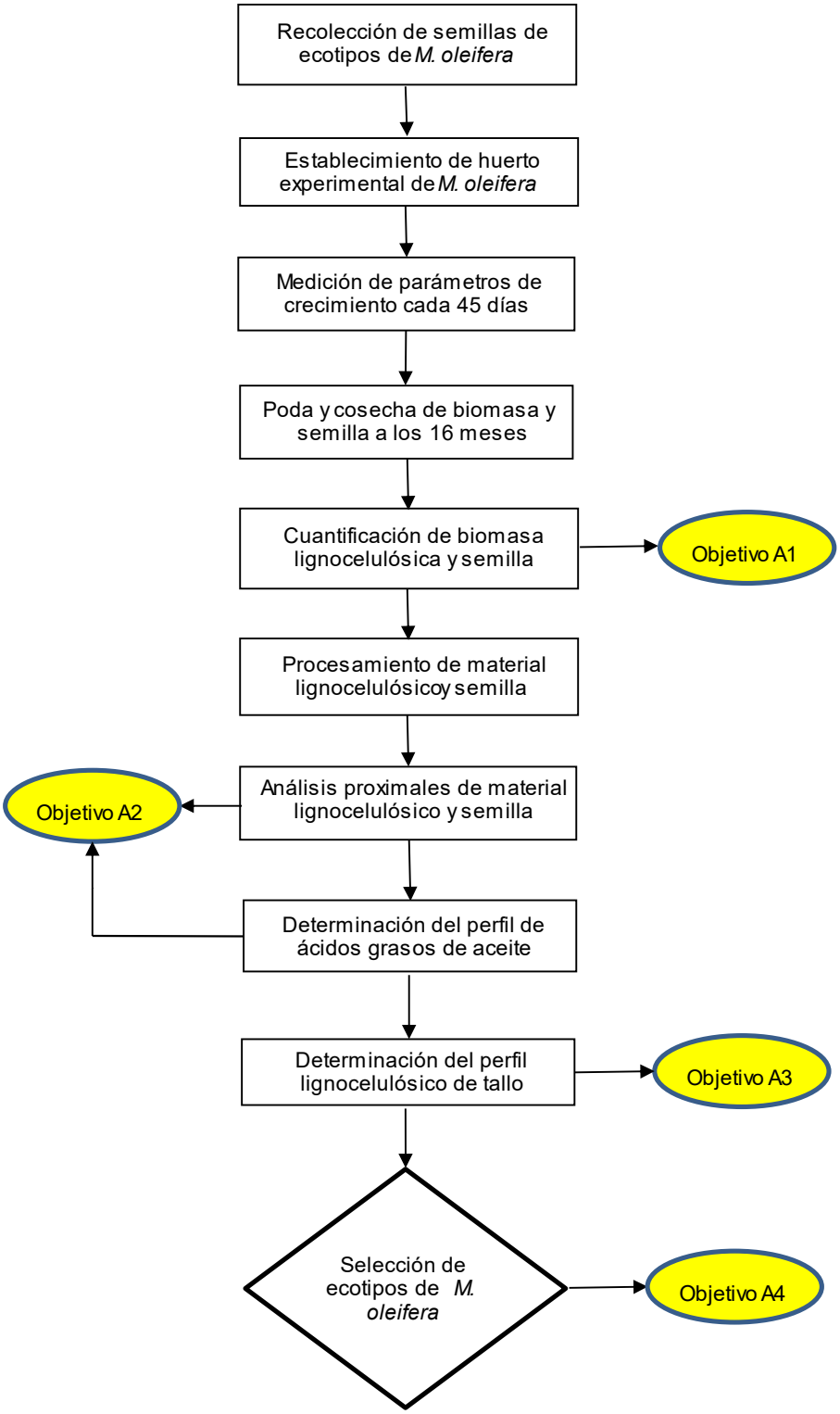


Figura 14. Estrategia experimental para comparación de crecimiento y productividad de ecotipos de *M. oleifera*

B PRODUCCIÓN ENZIMÁTICA Y ETANOL DE HONGOS NATIVOS EN MORINGA

1 Recolección y preparación del material lignocelulósico

Se recolectaron tallos y ramas de más de 3 centímetros de grosor del ecotipo de moringa “Culiacán” del predio de cultivo ubicado en el Rancho Tepuche, Culiacán, Sin., en las coordenadas 24°56'0.78"N y 107°21'42.75"O.

El material fue transportado en cajas de plástico perforadas al laboratorio de Biocombustibles de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa para su inmediato procesamiento.

El material lignocelulósico de moringa fue separado manualmente en hojas y ramas. Los tallos de moringa se trituraron primeramente en una picadora de forraje (Bomeri modelo PD6RMM, México). Posteriormente, hojas y tallos se secaron por separado en gavetas con aire forzado a 60 °C en un horno de gabinete durante 3 días. Una vez secos, se molieron en un molino de laboratorio (Hoffman Manufacturing, Stein M-2 Sample Mill, USA) durante 10 minutos.

2 Recolección de hongos

Se recolectaron muestras de carpóforos de hongos lignolíticos de diferentes árboles en proceso de descomposición. Los muestreos se efectuaron en los sitios mostrados en la Figura 15, pertenecientes a los municipios de Culiacán y Elota. Los hongos se recogieron manualmente junto con el material leñoso al que estaban adheridos y se depositaron en bolsas de papel**,** trasladándose inmediatamente al Laboratorio de Bioenergéticos de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa, en Culiacán, Sinaloa, permaneciendo a temperatura ambiente hasta su procesamiento.

3 Aislamiento y purificación de hongos

Una vez recolectados los hongos y cuando el tamaño del cuerpo fructífero fue mayor de 5 cm, se realizó una desinfección de las muestras sumergiéndose 1 minuto en etanol al 70% seguido de agua estéril e hipoclorito de sodio (NaOCl) al 5% y agua estéril (Chaparro y col., 2009). Cuando el tamaño del hongo fue menor de 5 cm se realizó la toma de muestra directamente del basidiocarpo, haciendo un corte inicial en una región no muy próxima al lugar de donde se extraería la muestra, a fin de evitar la contaminación del interior del hongo y rompiendo con un esfuerzo de las manos para exponer el tejido estéril, de donde, con unas pinzas de disección estériles se extrajo un fragmento de unos 2 a 3 mm y se

colocó en una caja Petri con medio de cultivo de Agar Papa Dextrosa (Robl y col., 2013). Las cajas se incubaron a 28 °C por 5 días y de la parte en crecimiento de micelio se tomó una pequeña fracción con asa de platino y resembró en otra caja Petri. Se incubó de nuevo por 5 a 7 días a 28 °C y se seleccionaron aquellas cajas en donde se observaron condiciones homogéneas del micelio y no presentaron contaminaciones de otros hongos o bacterias. Se conservaron las placas en refrigeración a 4 °C. Se realizaron resiembras periódicas en PDA cada 30 días para mantener activa la cepa.

4 Identificación morfológica de hongos basidiomicetos

La identificación morfológica de los ejemplares basidiomicetos se realizó observando las características de los cuerpos fructíferos de los hongos recolectados y se contrastaron contra las claves dicotómicas de Dai (1999), Gilbertson y Ryvarden (1986), Jülich y Stalpers (1980), Gilbertson y Ryvarden (1987), Larsen y Cobb-Poulle (1990), Parmasto (2001), Ryvarden y Iturriaga (2003). Se consideró el sistema de clasificación de Kirk y col. (2008), excepto en los taxones de la familia Hymenochaetaceae donde se siguió la propuesta de Wagner y Fischer (2002). Los ejemplares se encuentran depositados en la colección del Laboratorio de Biocombustibles de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa.

5 Identificación molecular

a Ascomicetos C6a, C7a y C1502

De los ascomicetos, se identificaron molecularmente las cepas C6a, C7a y C1502. Se extrajo el ADN a partir de micelio cultivado en caldo YPD (extracto de levadura 10 g/L, peptona 20 g/L y glucosa 20g/L) a 28 °C, 150 rpm por 7 días. El micelio se recuperó por centrifugación a 3030 x g por 5 min (centrífuga Eppendorf, 5702 r, US). En tubo Eppendorf de 1.5 mL se añadieron 50 mg de micelio y 500 µL de solución DNAzol ® (Invitrogen, US). Se maceró en mortero y se dejó reposar 10 min. Enseguida, se centrifugó (Spectrafuge 16M, US) 10 min a 11430 x g. A 500 µL del sobrenadante se le agregan 1 mL de etanol absoluto y se reposa por 5 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 13715 x g por 5 min. El sobrenadante obtenido se descartó. Se lavó dos veces la pastilla con 1 mL de etanol al 75%, se dejó reposar 5 min y se centrifugó a 13,715 x g. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar a temperatura ambiente. Se resuspendió con 250 µL de agua ultrapura (mili-Q).

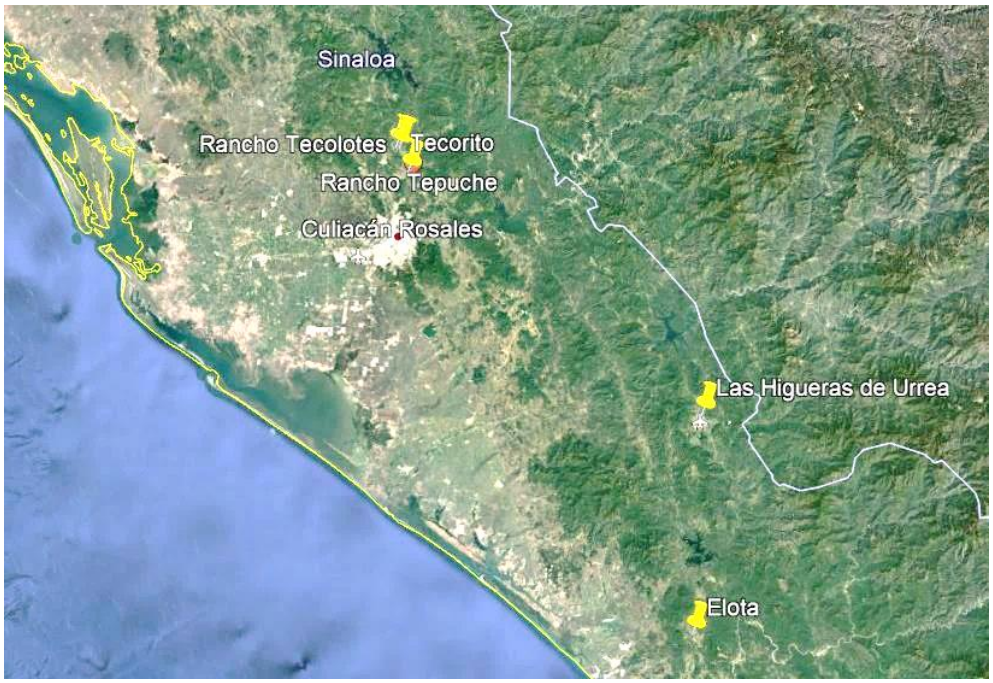


Figura 15. Ubicaciones de los muestreos de hongos y biomasa de moringa

La calidad del ADN se visualizó por electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) con amortiguador TAE 1X (Tris-Acetato 40 mM, pH 8.0, EDTA 1 mM) a 100 V, 400 mA, por 25 min. El gel se tiñó con bromuro de etidio (0.01 µg/mL) y los productos se digitalizaron en con un fotodocumentador Chemidoc® XRS (BIO-RAD, CA, USA). El coctel de reacción consistió en 0.5 µL de polimerasa 5 U/L (GoTaq DNA polimerasa, US), 10 µL de buffer 5X (GoTaq Flexi buffer, US), 2.5 µL de solución de MgSO4 25 mM, 33 µL de agua libre de nucleasas y 1 µL de los oligos ITS1 (5«-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3«) e ITS4 (5«-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3«) reportados por Güzeldağ y Çolak (2007) para amplificar el fragmento que abarca las regiones ITS1, 5.8 S e ITS2 con un termociclador Multigene (LabNet, USA), programado con un período inicial de desnaturalización a 95 °C por 2 min, seguido de 30 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min a 55 °C y 1 min a 72 °C, con un período final de extensión a 72 °C por 5 min. El producto amplificado se separó por electroforesis en gel de agarosa al 1% y bromuro de etidio, a 100 V 400 mA por 25 min. El amplicón se cortó del gel, se purificó utilizando el kit QIAquick (Qiagen, Cat. No. 28106) y se evaluó utilizando Nanodrop 2000. Los productos de PCR fueron secuenciados en ambas direcciones en un secuenciador ABI 3730XL (Applied Biosystems, USA). Las secuencias fueron editadas en un CHrOMAS Pro 1.6 PCR (Technelysium Pty Ltd., Australia) y comparadas con secuencias en el NCBI usando el software BLAST-N y el algoritmo Megablast.

b Basidiomiceto Coc-1

La cepa de basidiomiceto Coc-1 se identificó molecularmente siguiendo la siguiente variación de la metodología explicada en el inciso anterior. Se maceraron con un pistilo 50 a 100 mg de micelio del hongo Coc-1 en 500 µL de DNAzol. Se dejaron reposar 30 min en congelación y se maceró cada 10 minutos. Se centrifugó el homogenizado por 10 min a 10,000 rpm. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y se precipitó con 500 µL de etanol absoluto frío y mezclar por inversión. Se incubó 10 minutos a -20 °C. Se centrifugó 5 minutos a 12,000 rpm y se descartó el sobrenadante. Se lavó la pastilla con 400 µL de etanol al 75% frío y se mezcló por inversión 3 a 4 veces. Se dejó reposar 5 min a temperatura ambiente. Se centrifugó

a 10,000 rpm por 2 min. Se repitió el lavado de la pastilla. El ADN se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 30 mL de agua ultrapura. La región ITS rDNA se amplificó utilizando los cebadores universales ITS1 (5 -TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3) e ITS4 (5 -TCCTCCGCTTATTGATATGC-3) reportados por Cordero-Ramírez y col. (2012) y White y col. (1990). Se prepararon 100 µL de un coctel de reactivos para PCR que contenían 66 µL de agua ultrapura, 20 µL Buffer 5X, 5 µL de $MgCl_2$ 1.5 mM, 2 mM de cada dNTP, 2 M de iniciadores directos e inversos y 1 U de ADN polimerasa Taq (Invitro-gen). El termociclador se programó para la desnaturalización inicial a 95 °C durante 4 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C, alineamiento a 54 °C, extensión a 72 °C, cada uno durante 1 minuto y una extensión final a 72 °C durante 5 minutos. Los productos de PCR de aproximadamente 500 pb de longitud se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa (1% (p/v) en buffer 0.5x de Tris acetato EDTA (Choi y col.), se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio, se purificaron usando el kit de purificación por PCR QIAquick (Qiagen, cat. No. 28106) y se cuantificaron utilizando un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.). Los productos de PCR se mandaron secuenciar al de la forma descrita en el párrafo anterior.

c Análisis de secuencias de ADN

El análisis de las secuencias obtenidas se realizó en el programa informático *Editseq*, para obtener la secuencia consenso a partir de la secuencia directa e inversa. Posteriormente, la secuencia consenso se comparó mediante la herramienta en línea BLAST (Basic Local Aligment Search Tool, https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) para verificar la edición de la secuencia y la identidad del microorganismo. Por último, la secuencias consenso se depositaron en el banco de genes del NCBI mediante la plataforma *bank it*, para obtener los números de acceso.

6 Evaluación cualitativa de producción de enzimas

a Celulasas

Se evaluó cualitativamente la producción de celulasas en cajas de Petri conteniendo medio CBM (Pointing, 1999), 2% de papel filtro pulverizado y 1.5%

de agar bacteriológico. Para ello se inocularon las cepas de hongos aisladas y se incubaron a 28 °C por 7 días, observándose el crecimiento micelial y la formación de un halo de degradación de la celulosa de papel.

b Xilanasas

Se prepararon placas de Petri conteniendo buffer de acetatos 25 mM ajustado a pH 4, con agar microbiológico (15 g L^{-1}), se esterilizó y se dejó enfriar hasta alcanzar los 60 °C, agregándose 0.1% de AZCL-arabinoxilano (Megazyme, 2017). Se agitó y se vertió en placas Petri. Cada placa se inoculó con micelio de cada cepa y se incubó a 28 °C durante 7 días. Al hidrolizarse el sustrato se libera el colorante AZCL que produjo coloración azul que revela la presencia de xilanasas (Phalip y col., 2009).

c Manganeso peroxidasas

Se agregó 0.2% de rojo fenol en medio PDA recién esterilizado a 60 °C, se agitó y se vertió en placas Petri. Se inoculó cada placa con su respectiva cepa y se incubó a 28 °C. La presencia de la enzima se manifestó por un cambio de coloración de amarillo a rojo-naranja.

d Lacasas

Se utilizó medio de cultivo basal con KH_2PO_4 1 g L^{-1}; $(NH_4)_2SO_4$ 0.5 g L^{-1}; $MgSO_4$ g L^{-1}; $CaCl_2{\cdot}2H_2O$ 0.01 g L^{-1}; extracto de levadura 0.01 g L^{-1}; $CuSO_4{\cdot}5H_2O$ 0.001 g L^{-1}; $Fe_2(SO_4)_3$ 0.001 g L^{-1}; $MnSO_4{\cdot}H_2O$ 0.001 g L^{-1}; y se adicionó ABTS al 0.1% p/v y agar microbiológico al 1.5%, se esterilizó a 121 °C y 1.1 kg/cm^2 por 15 minutos, se vertió en placas Petri. Se inoculó cada placa con su respectiva cepa y se incubó a 28 °C. Al oxidarse el sustrato se reveló un color verde azulado que indica la presencia de lacasas (Pointing, 1999).

7 Determinación de producción de etanol

a Sacarosa

Para las 19 cepas aisladas en la primera recolección se realizó por triplicado una fermentación en matraces Erlenmeyer de 250 mL, conteniendo 150 mL del siguiente medio esterilizado (121 °C, 1.1 kg/cm^2, 15 min): sacarosa 30 g L^{-1}; extracto de levadura 10 g L^{-1}; KH_2PO_4 10 g L^{-1}; $(NH_4)_2SO_4$ 2 g L^{-1}; y MgSO4·7H2O 0.5 g L^{-1} se ajustó el pH a 5.0 con H_2SO_4 2N (Okamoto y col., 2014). Se inocularon

asépticamente con 3 cm^2 de micelio de la cepa en cultivo de PDA de 7 días. Se incubaron a 28 °C y sin agitación durante 96 h, extrayendo una alícuota del cultivo de 5 mL cada 12 h (Elisashvili y col., 2008), a la cual se le determinó la concentración de etanol por cromatografía de gases utilizando un cromatógrafo Agilent 6890N acoplado a un detector de masas Agilent 5973 N (Agilent Technologies, USA), con una columna Supelcowax-10 (30m×0.25mm, df=0.5 µm). El gas acarreador fue helio a 10 psi. La muestra proveniente de la fermentación se centrifugó 30 min a 4400 rpm y el sobrenadante se filtró a través de un filtro de membrana de 0.2 µm. Se inyectó directamente al cromatógrafo 1 µl de sobrenadante. La columna inició a 40 °C por 5 minutos, seguida por una rampa de 15 °C / min hasta alcanzar 150 °C. Para la cuantificación se realizaron curvas de calibración preparadas con estándares acuosos de etanol 0.1. 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5 g/L (Anasontzis y col., 2011) empleando un patrón de etanol absoluto (Sigma-Aldrich, USA).

b Glucosa y xilosa

Para las cepas seleccionadas por su mayor capacidad etanologénica en sacarosa, se determinó su capacidad de fermentar glucosa y xilosa en condiciones anaerobias, repitiendo el procedimiento descrito anteriormente, pero sustituyendo la sacarosa con 20 g/L de glucosa o xilosa.

c Producción de etanol en SMF con *M. oleifera*

1) Fermentación sin *S. cerevisiae*

Las 5 cepas seleccionadas se cultivaron por triplicado en matraces de 250 mL con 100 mL del caldo de cultivo descrito antes y sustituyendo la sacarosa por 20 g/L de tallo de *M. oleifera* molida, inoculando con 3 cm^2 de un cultivo de 7 días en PDA del hongo seleccionado. Enseguida se almacenaron todos bajo las mismas condiciones de temperatura 28 °C y sin agitación (Xiao y col., 2004) por 132 h. La toma de muestras se realizó cada 12 horas y se determinó la concentración de etanol por el método descrito antes.

2) Fermentación con *S. cerevisiae*

En este experimento se probó la producción de etanol en cultivo sumergido con *M. oleifera* de las cepas de hongos seleccionadas en consorcio con *S.*

cerevisisae. Se repitió el procedimiento anterior, pero agregando 1 mL de una suspensión 1 x 10^7 de células de *S. cerevisiae* ATCC 200062, previamente cultivadas en medio YPD gelificado. Se incubó a 28 °C por 132 h sin agitación, tomándose alícuotas de 5 mL cada 12 horas, a las cuales se les determinó la concentración de células de *S. cerevisiae,* empleando cámara de Neubauer. La concentración de azúcares reductores por el método DNS, la actividad de endoglucanasas (CMCasa) y la concentración de etanol se midieron utilizando los métodos descritos anteriormente.

3) Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por duplicado con tres réplicas por tratamiento. El diseño experimental fue unifactorial, siendo la cepa de hongo el factor. Los datos se analizaron por medio de una ANDEVA y las medias se analizaron por la prueba de rangos múltiples de Tukey con un intervalo de confianza de 95%, utilizando el software Minitab versión 17 para analizar los datos.

8 Cuantificación de actividad lignocelulolítica de hongos nativos en medio sumergido con madera de *M. oleifera*

a Preparación del inóculo

Para realizar este experimento, se utilizaron 12 cepas de hongos basidiomicetes y dos ascomicetes (Cuadro 13). De ellas, 5 pertenecen a la primera etapa de recolección, 7 a la segunda etapa y dos fueron adquiridos de proveedores externos. Estas últimas fueron la cepa comercial J-5 de *Pleurotus ostreatus* (etiquetada como Pos J-5) obtenida de un productor del Estado de México (Grupo Hongo Zeta Endotzi, S.P.R. de R.L.) y la cepa G-1 de *Ganoderma lucidum* (etiquetada como Glu G-1) proveniente de Sierra de Lobos, Guanajuato y adquirida de la empresa Micelios MX (Guanajuato, México). Ambas especies de hongos son conocidas por su alta capacidad de producción de lacasas. A partir de los cultivos purificados se prepararon inóculos en medio sumergido. Para ello se utilizaron 5 cm^2 de micelio y agar de las placas con cultivo y se colocaron en matraces de 250 conteniendo 100 mL de medio sugerido por Okamoto y col. (2014) con ligeras modificaciones.

Cuadro 13. Especies de hongos utilizadas para la cuantificación de la actividad lignocelulolítica en madera de moringa

Identificador	Género, especie	Recolección, Procedencia
C1503	*Trametes* sp.	1ª recolección, Elota, Sin.
C1505	*Pycnoporus sanguineus*	1ª recolección, Tecolotes, Sin.
C1507	*Trametes* sp.	1ª recolección, Elota, Sin.
Coc-1	*Trametes polyzona*	2ª recolección, Elota, Sin.
C7b	*Curvularia* sp.	1ª recolección, Tecolotes, Culiacán, Sin.
Gap	*Ganoderma oregonense*	2ª recolección, Elota, Sin.
Glu	*Ganoderma lucidum* G-1	Adquirida, Sierra de Lobos, Gto.
Gst	*Lenzites betulina*	2ª recolección, Tecorito, Culiacán, Sin.
Hhy-1	*Hexagonia hydnoides*	2ª recolección, Elota, Sin.
Hhy-2	*Hexagonia hydnoides*	2ª recolección, Tecorito, Culiacán, Sin.
Muc (C1502)	*Mucor circinelloides*	1ª recolección, Elota, Sinaloa
Phe	*Fuscoporia mesophila*	2ª recolección, Tecorito, Culiacán, Sin.
Pos	*Pleurotus ostreatus* J-5	Adquirida, Edo. De México
Ppu	*Pleurotus opuntiae*	2ª recolección, Tepuche, Culiacán, Sin.

El medio consistió en glucosa 20 g L^{-1}, extracto de levadura 10 g L^{-1}, KH_2PO_4 10 g L^{-1}; $(NH_4)_2SO_4$ 5 g L^{-1}; $MgSO_4$ 0.001 g/L CuSO4·5H2O 0.002 g L^{-1} y MnSO4 0.001 g L^{-1}. El medio se ajustó a pH 5.5 con NaOH 5 N previo a la esterilización, la cual se realizó a 121 °C por 15 minutos en autoclave (YAMATO, SK110c JP). Los matraces se colocaron en un agitador rotatorio a 140 rpm a 28 °C durante 7 días.

a Fermentación en medio sumergido

Para cada cepa seleccionada a través del cribado cualitativo se determinó la actividad enzimática de celulasas (CMCasas), xilanasas, manganeso peroxidasa y lacasas, utilizando el medio compuesto del párrafo anterior modificado, donde se sustituyó la glucosa con harina pulverizada de tallos de moringa.

Para ello se emplearon por triplicado frascos de vidrio de 60 mL, conteniendo 20 mL de medio de cultivo compuesto descrito anteriormente y donde se sustituyó la glucosa por 20 g L^{-1} de tallo pulverizado de moringa como fuente de carbono.

Los frascos tapados con un tapón de silicón provisto interiormente de una torunda de algodón (que hace las veces de filtro microbiológico) y un casquete de aluminio se esterilizaron a 121 °C por 15 minutos. Una vez a temperatura ambiente, los frascos se inocularon con 200 µL (1%) del cultivo descrito previamente y se colocaron en incubación a 28 °C con agitación a 140 rpm. Se hicieron muestreos a los 3, 5 y 7 días, extrayendo en condiciones asépticas 1 mL del sobrenadante y colocándolo en un tubo de Eppendorf de 2 mL, conservándose en refrigeración a 4 °C hasta su análisis, el cual se realizó a más tardar en los tres días siguientes. Las alícuotas obtenidas se separaron por centrifugación (4.400 rpm; 15 min, 20 °C) en una centrífuga Eppendorf 5702.

c Medición de la actividad enzimática y azúcares reductores

1) Actividad endo β-1,4 glucanasa (CMCasa)

La actividad endo β-1,4 glucanasa se determinó siguiendo el procedimiento de Stutzenberger (1972) con algunas modificaciones. En un pocillo de microplaca de 96 cavidades se vertieron 35 µL de carboximetilcelulosa al 2% y se agregaron 35 µL de sobrenadante de enzima. Se colocan a calentaron las placas en una incubadora a 50 °C por 120 minutos. Se midió la liberación de azúcares reductores por el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) con algunas modificaciones (Miller, 1959) como se describe en el apartado 3.c.4.

2) Actividad de xilanasa

La actividad xilanasa se determinó colocando en un pocillo 35 µL de xilano de abedul (Sigma) al 2% en tampón citrato 0.05 M, pH 5 (Bailey y col., 1991) y 35 µL de sobrenadante de enzima. Se incubó durante 120 minutos a 50 °C y tras terminar la reacción, la concentración de azúcares reductores se midió por el método DNS.

3) Azúcares reductores

A cada pocillo donde se realizó la reacción se agregaron 70 µL de solución de DNS. Se calentó la microplaca a 100 °C en baño María por 5 minutos. Se enfrió rápidamente en hielo. Se transfieren a otro pocillo de otra microplaca 36 µL del producto de la reacción y se agregaron 160 µL de agua destilada. Se midió la absorbancia a 540 nm en espectrofotómetro de microplacas Thermoscientific Multiskan GO (Miller, 1959).

4) Cálculos de actividades celulasa y xilanasa

Las actividades enzimáticas de endo β-1,4 glucanasa**,** exo β-1,4 glucanasa y xilanasas fueron calculadas de acuerdo con la fórmula siguiente:

$$Actividad\ enzimática = \frac{(Vr\ x\ AR\ x\ FD)}{(t)} \qquad \text{(Ec. 10)}$$

Vr = volumen de reacción, 0.070 mL;

AR = Azúcares reductores, obtenidos de la lectura de absorbancia y convertidos a equivalentes de glucosa o xilosa según el caso;

t = tiempo de reacción, 60 min;

Y FD = factor de dilución de la enzima, obtenido de la Ec. 9.

Las actividades enzimáticas se expresaron en unidades internacionales (UI) mL^{-1}, considerando una unidad como la cantidad de enzima que libera 1 µmol de glucosa por min.

5) Actividad de MnP

La actividad de la manganeso peroxidasa se midió por oxidación de rojo fenol (Glenn y Gold, 1985). La reacción se realiza con 1 mL de mezcla conteniendo 0.89 mL de tampón de lactato-succinato (50 mM, pH 4.5) con sulfato de manganeso (0.1 mM), rojo fenol (0.1 mM), gelatina (0.1%) y 100 µL del sobrenadante. La reacción se inicia con 0.01 mL de H_2O_2 (0.1 mM), las mezclas se incubaron durante 1 a 5 min a 30 ± 1 °C y finalmente se para la reacción con 50 µL de NaOH 4M. La absorbancia se lee a 610 nm en un espectrofotómetro (Thermoscientific Genesys 10S UV VIS). Una unidad de actividad enzimática se expresó como la cantidad de enzima requerida para oxidar 1 µ-mol de rojo fenol en 1 min. Las actividades en la ausencia de H_2O_2 fueron restadas de los valores obtenidos en la presencia de peróxido de hidrógeno para establecer la verdadera actividad de peroxidasa.

6) Actividad de lacasa

La actividad enzimática de lacasas se determinó midiendo por espectrofotometría la oxidación de ABTS (ácido 2,2'–azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico), mediante el incremento de absorbancia a 436 nm (Tinoco y col., 2001). La mezcla de la reacción consiste en 1 mL, compuesta por volúmenes variables (1 a 100 µL) de alícuotas del extracto enzimático mezclados con solución de ABTS 1 mM en amortiguador de acetatos (pH 3.6, 100 mM). La mezcla se coloca inmediatamente en una celda y se mide la cinética de la reacción por 2 minutos a 25 °C en un espectrofotómetro (Thermoscientific Genesys 10S UV VIS).

7) Cálculo de actividad enzimática de MnP y lacasa

Una unidad de actividad enzimática de manganeso peroxidasa o de lacasa se define como la cantidad de enzima que oxida respectivamente 1 µM de rojo

fenol o ABTS por minuto a las condiciones de reacción. A continuación, se muestra la ecuación para determinar la actividad enzimática, en unidades U L^{-1}.

$$AE = \frac{resultado\ \frac{abs}{min}}{\varepsilon_{nm}}\ x\ \frac{1000\ \mu L\ de\ reacción}{\mathrm{V}muestra}\ x\ \frac{1000\ \mathrm{mL}}{1\mathrm{L}}\ x\ FD \qquad \text{(Ec. 11)}$$

Donde:

ε = coeficiente de extinción molar para el rojo fenol (610 nm) es 22,000 mol^{-1} cm^{-1} (Vijaya y Jatin, 2017) y el ABTS (436 nm) es de 29,300 mol^{-1} cm^{-1} (Ben-Younes y col., 2007);

$V_{muestra}$ = volumen de muestra, en µL;

FD = factor de dilución de la muestra, calculado según la Ec. 9.

8) Diseño y análisis experimental

El diseño experimental fue unifactorial (cepa de hongo) con 3 repeticiones por tratamiento. Los datos se analizaron por medio de un ANDEVA y las medias se compararon por la prueba de rangos múltiples de Tukey con un α=0.05, utilizando el software Minitab 17. La estrategia experimental general de los experimentos de esta sección se esquematiza en la Figura 16.

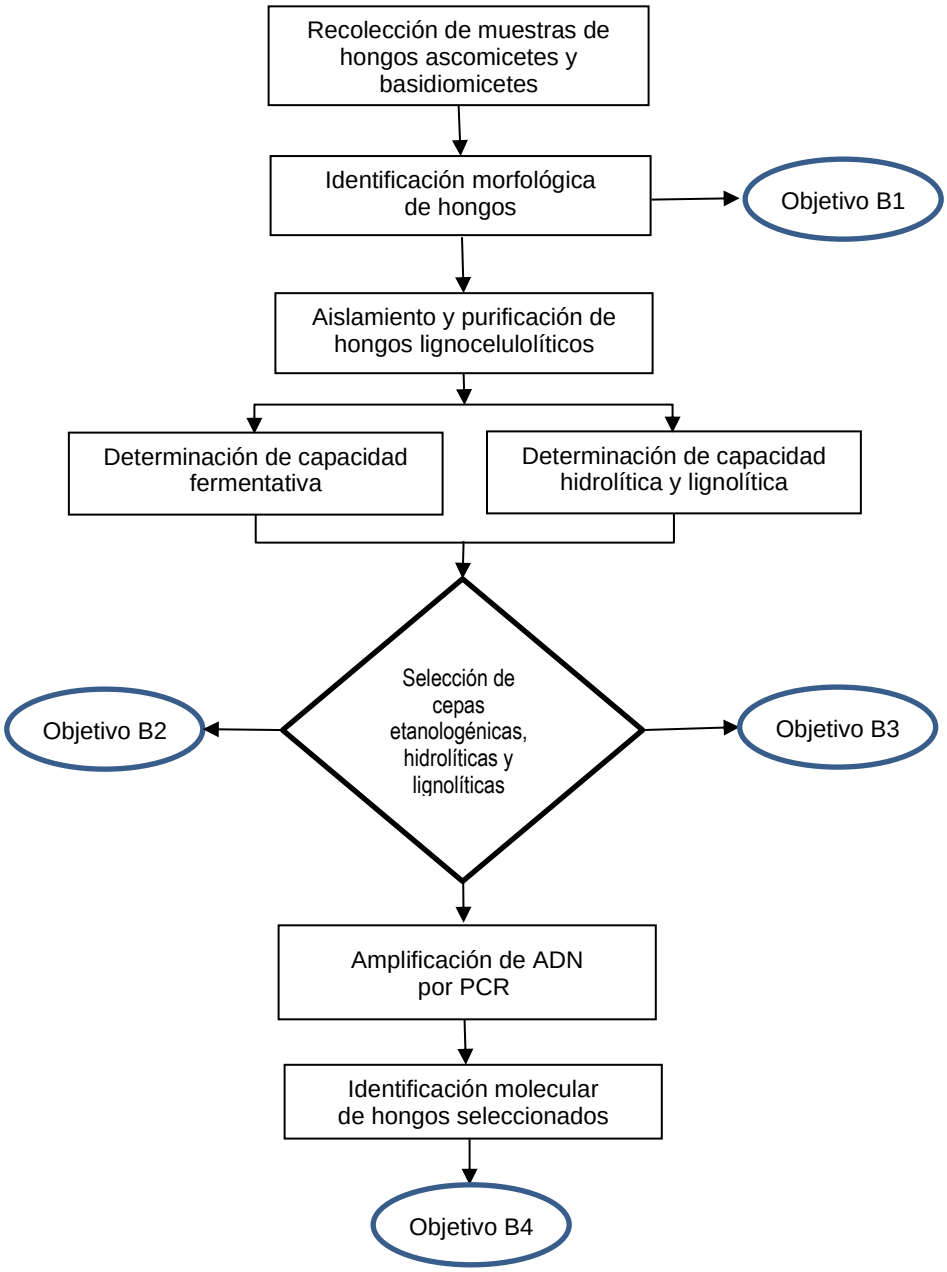


Figura 16. Estrategia experimental para la evaluación de la capacidad lignocelulolítica y etanologénica de cepas de hongos regionales

C OPTIMIZACIÓN DE PRODUCCIÓN DE LACASAS DE *T. polyzona*

1 Optimización mediante el modelo ortogonal de Taguchi

Para una expresión efectiva de lacasa, es esencial optimizar las condiciones fisicoquímicas y nutricionales del medio de cultivo. El enfoque de esta investigación está orientado hacia la optimización de los componentes del medio de cultivo por métodos estadísticos. Los procedimientos de optimización convencionales implican alterar un parámetro a la vez mientras se mantienen constantes todos los demás, lo que permite una evaluación de impacto de esos parámetros particulares en el rendimiento del proceso. Estos procedimientos son lentos y laboriosos, y requieren muchos conjuntos de datos experimentales y no pueden proporcionar información sobre las interacciones mutuas de los parámetros (Hou y col., 2004; Desai y Nityanand, 2011). El presente experimento se dirigió hacia la optimización en medio sumergido de la producción de lacasa utilizando una cepa nativa de *Trametes polyzona* (Coc-1) y sustrato lignocelulósico de *M. oleifera*.

La metodología de optimización adoptada en este estudio fue la de un modelo ortogonal de Taguchi. Esta consiste en cuatro fases a saber: planificación, realización, análisis y validación (Prasad y col., 2005; Belšak-Šel y col., 2015).

a Condiciones generales

Para el hongo seleccionado por su mayor producción de enzimas lignolíticas (Coc-1), se determinaron las condiciones óptimas de pH, temperatura y concentración de cobre, para una producción maximizada de esta enzima, empleando la metodología de superficie de respuesta, utilizando un diseño central compuesto, con tres factores: pH (4.2 a 6.8), temperatura (24 a 34 °C) y concentración de cobre [Cu] (0 a 1 mM), resultando 20 tratamientos, con dos repeticiones. Para ello se utilizaron frascos viales de vidrio de 30 mL conteniendo 20 mL de medio modificado de Okamoto y col. (2014) (párrafo B8a) donde se sustituyó la glucosa con aserrín de tallos de *M. oleifera* y se ajustó el pH al valor correspondiente con NaOH 5N o H_2SO_4 a 5%. Los frascos se taparon con tapones de silicón provistos de una torunda de algodón y un casquete de aluminio, se

esterilizaron a 121 °C durante 15 minutos en autoclave. Una vez enfriados a temperatura ambiente, se inocularon con 200 µL de una suspensión de esporas de 7 días de cultivo de *la cepa* Coc-1, preparada como se describe en el párrafo B8a. El diseño experimental correspondió a un diseño central compuesto que se describe en el Cuadro 14. El experimento se realizó por duplicado y el promedio de los dos valores se introdujo en el software estadístico Design Expert 11 para su análisis e interpretación, utilizándose el método numérico. Una vez realizados los experimentos, se utilizó una ecuación polinómica de segundo orden mostrada a continuación para describir el efecto de las variables en términos de funciones lineales, cuadráticas y de productos cruzados (Saini y col., 2013):

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^{k} b_i Xi + \sum_{i=1}^{k} b_{ij} X_i^2 + \sum_{i_i<j}^{k} \sum_{j}^{k} b_{ij} X_i X_j + e \qquad \text{(Ec. 12)}$$

donde *i* y *j* son coeficientes lineales y cuadráticos, respectivamente, mientras que los símbolos '*b*' representan los coeficientes de regresión, *Y* es el rendimiento de la enzima, *k* el número de factores estudiados y optimizados en el experimento y '*e*' es un error aleatorio. En el desarrollo de la ecuación de regresión, los factores de prueba fueron codificados de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$x_i = \frac{(X_i - X_0)}{\Delta X_i} \qquad i = 1,2,3,\ldots,k \qquad \text{(Ec. 13)}$$

donde x_i es el valor sin dimensiones de una variable independiente, X_i es el valor real de una variable independiente, X_o es el valor real de la variable independiente en el punto central, y ΔXi es el valor de cambio de la etapa (Yasmeen y col., 2013).

b Optimización de nutrientes

Durante esta fase, se analizaron 8 nutrientes que en trabajos previos han mostrado ser de los más importantes para la producción de enzimas lacasas en la familia de basidiomicetos (Prasad y col., 2005; Quaratino y col., 2008; Liu y col., 2009; Belšak-Šel y col., 2015).

Cuadro 14. Diseño central compuesto utilizado para optimizar pH, temperatura y concentración de CuSO4 (mM) en el crecimiento de Coc-1

Orden Estadístico	Orden de Corrida	pH	Temperatura	[Cu]
10	1	5.50	29.0	0.5000
7	2	4.30	32.0	0.7973
2	3	5.20	26.0	0.2027
17	4	4.75	29.0	0.5000
13	5	4.75	29.0	0.0000
12	6	4.75	34.0	0.5000
19	7	4.75	29.0	0.5000
16	8	4.75	29.0	0.5000
6	9	5.20	26.0	0.7973
11	10	4.75	24.0	0.5000
15	11	4.75	29.0	0.5000
18	12	4.75	29.0	0.5000
14	13	4.75	29.0	1.0000
20	14	4.75	29.0	0.5000
8	15	5.20	32.0	0.7973
9	16	4.00	29.0	0.5000
4	17	5.20	32.0	0.2027
3	18	4.30	32.0	0.2027
1	19	4.30	26.0	0.2027
5	20	4.30	26.0	0.7973

Los 8 nutrientes seleccionados son: $MnSO_4$, glucosa, fuente de fibra, $(NH_4)_2SO_4$, extracto de levadura, KH_2PO_4, $CuSO_4$ y $MgSO_4$. Ya que uno de los objetivos de este trabajo es encontrar alternativas enzimáticas para la deslignificación de madera de *Moringa oleifera*, se utilizó ésta en sustitución de fibra de trigo, que la más comúnmente utilizada como fuente de lignina. El modelo de Taguchi seleccionado para la realización de los experimentos un arreglo L18 ($2^1 \times 3^7$) que indica 18 tratamientos experimentales, de los cuales un factor es de 2 niveles y 7 de 3. Este diseño se introdujo al paquete estadístico Minitab versión 17 con los factores y niveles asignados, mostrados en el Cuadro 15. Cada tratamiento se corrió por triplicado en matraces Erlenmeyer de 250 mL, totalizando 54 matraces (Figura 17). Para cada matraz se realizó una mezcla de medio de cultivo con las concentraciones de ingredientes indicadas en el Cuadro 16. Como fuentes de nutrientes se utilizaron: 1) manganeso, $MnSO_4 \cdot H_20$ N° CAS 10034-96-5 (Karal®, México); 2) glucosa, dextrosa, N° CAS 50-99-7 (Sigma-Aldrich®, EEUU); 3) tallo de moringa molido, preparado de la manera descrita en el apartado A1; 4) amonio, $(NH_4)_2SO_4 \cdot H_2O$, N° CAS 7782-20-2 (Fermont®, México); 5) extracto de levadura (MCD Lab®, México); 6) KH_2PO_4, N° CAS 7778-77-0 (PQF®, México); 7) cobre, $CuSO_4 \cdot 5H_20$, N° CAS 7758-99-8 (J.T. Baker®, EEUU); 8) magnesio, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ N° CAS 7487-88-9 (Merck®, EEUU). Todos los medios se ajustaron a pH 5.5. Los matraces se agitaron vigorosamente hasta la completa disolución de los ingredientes, se taparon con torunda de algodón como filtro y se cubrieron con un casquillo de papel de aluminio, esterilizándose en autoclave por 20 minutos a 121 °C. Los matraces se enfriaron y se inocularon con 2 mL de una suspensión del hongo seleccionado (Coc-1) preparada como se describe en el párrafo B8a. Se cultivaron con agitación a 150 rpm dentro de una incubadora (ThermoScientific®, EEUU) a 34.0 °C durante 11 días, tomándose alícuotas de 1 mL los días 5, 7 y 11. Se determinó la actividad de lacasa de la manera descrita en el párrafo B8c6 de esta sección de materiales y métodos.

Figura 17. Incubación de Coc-1 para la optimización de nutrientes

Cuadro 15. Niveles asignados de los factores de cultivo

Factor	Nombre	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3
X_1	$MnSO_4 \cdot H_2O$,%	0.015	0.025	-
X_2	Glucosa,%	1.00	1.50	2.00
X_3	Tallo de moringa,%	2.00	2.50	3.00
X_4	$(NH_4)_2SO_4$,%	0.00	0.50	1.00
X_5	Extracto de levadura,%	0.00	1.00	2.00
X_6	KH_2PO_4,%	1.50	2.00	2.50
X_7	$CuSO_4 \cdot 5H_20$,%	0.01	0.02	0.03
X_8	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$,%	0.05	0.10	0.15

Cuadro 16. Tratamientos del arreglo ortogonal de Taguchi utilizado

Trat	X_1 $MnSO_4$ %	X_2 Glucosa %	X_3 TMO %	X_4 $(NH_4)_2SO_4$ %	X_5 E. Levad. %	X_6 KH_2PO_4 %	X_7 $CuSO_4 \cdot 5H_20$ %	X_8 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ %
1	0.015	1.0	2.0	0.0	0.0	1.5	0.01	0.05
2	0.015	1.0	2.5	0.5	1.0	2.0	0.02	0.10
3	0.015	1.0	3.0	1.0	2.0	2.5	0.03	0.15
4	0.015	1.5	2.0	0.0	1.0	2.0	0.03	0.15
5	0.015	1.5	2.5	0.5	2.0	2.5	0.01	0.05
6	0.015	1.5	3.0	1.0	0.0	1.5	0.02	0.10
7	0.015	2.0	2.0	0..5	0.0	2.5	0.02	0.15
8	0.015	2.0	2.5	1.0	1.0	1.5	0.03	0.05
9	0.015	2.0	3.0	0.0	2.0	2.0	0.01	0.10
10	0.025	1.0	2.0	1.0	2.0	2.0	0.02	0.05
11	0.025	1.0	2.5	0.0	0.0	2.5	0.03	0.10
12	0.025	1.0	3.0	0.5	1.0	1.5	0.01	0.15
13	0.025	1.5	2.0	0.5	2.0	1.5	0.03	0.10
14	0.025	1.5	2.5	1.0	0.0	2.0	0.01	0.15
15	0.025	1.5	3.0	0.0	1.0	2.5	0.02	0.05
16	0.025	2.0	2.0	1.0	1.0	2.5	0.01	0.10
17	0.025	2.0	2.5	0.0	2.0	1.5	0.02	0.15
18	0.025	2.0	3.0	0.5	0.0	2.0	0.03	0.05

c Análisis del modelo y predicción de valores optimizados

El correcto análisis de la contribución de los factores individuales es la clave para el control de la optimización de la producción de lacasa (Belšak-Šel y col., 2015). Para llevarlo a cabo, se realizó un ANDEVA del arreglo ortogonal de Taguchi y se determinó la aportación de cada factor y se obtuvo una ecuación para representar el modelo. Para confirmar la aceptación del modelo, se realizó con el paquete estadístico Minitab® 17 una prueba de precisión adecuada, que midió la relación señal / ruido. Es deseable un valor de precisión adecuado superior a 4. También se analizó mediante este paquete estadístico la contribución de cada factor mediante un análisis de los factores Delta y una predicción de los niveles pronosticados óptimos.

d Validación de condiciones optimizadas

El cuarto y último paso fue validar las condiciones óptimas predichas para la producción de lacasas por el modelo en la etapa de análisis (Paso 3). Para ello se cultivó el hongo seleccionado en las mismas condiciones descritas en el inciso b anterior, pero con las proporciones de ingredientes optimizadas pronosticadas por el paquete estadístico Minitab 17. Se comparó contra un testigo, que fue el tratamiento que obtuvo los mayores rendimientos de la etapa previa. El experimento se realizó en matraces Erlenmeyer de 250 mL, utilizando 100 mL del medio de cultivo optimizado, esterilizado 15 min a 121 °C, inoculados con 3% de cultivo de 7 días. Se incubaron os matraces por 15 días a las condiciones optimizadas de temperatura (34 °C), agitación de 140 rpm. Cada 24 h se tomó una alícuota de 1 mL de cada matraz a la cual se le determinó la actividad de lacasa de la manera descrita anteriormente. Los resultados se analizaron con el paquete estadístico Minitab 17 y se corrió un ANDEVA y comparación de medias por el método de Tukey.

2 Deslignificación de madera de moringa

a Deslignificación con extracto enzimático

Una vez definidas las condiciones óptimas de cultivo que favorecieron la secreción de lacasas, el extracto enzimático crudo se aplicó para la

deslignificación de madera de tallos de *Moringa oleifera*. El buffer de reacción consistió en KH_2PO_4 10 g L^{-1}; $MgSO_4$ 0.5 g L^{-1}, CuSO4·5H2O 0.002 g L^{-1} y MnSO4 0.001 g L^{-1}, ajustado a pH 5.0. En viales de antibiótico tarados de 30 mL se mezclaron 100 ±0.1 mg de harina de tallos de moringa del ecotipo “Culiacán” (previamente secada en horno por 8 h 100 °C) y las cantidades de medio de reacción (buffer) y extracto enzimático crudo que se indican en el Cuadro 17, según el tratamiento correspondiente. La actividad de lacasa medida del extracto enzimático crudo utilizado fue de 4,122 U/L, ajustado a 4,000 U/L con agua destilada estéril. Se corrió un blanco sin presencia de enzima utilizando 2.0 mL de buffer. Se colocaron los viales en una incubadora a 35 °C y 150 rpm. A las 4, 8, 24 y 72 h, se sacaron de la incubadora los frascos correspondientes al tiempo, se les agregaron 10 mL de agua destilada a cada uno y se centrifugaron por 15 minutos a 4,400 rpm en una centrífuga Eppendorf modelo 5702. Se eliminó el sobrenadante, evitando desechar residuos sólidos. Se secaron los frascos a 100 °C por 8 horas y se pesaron. El residuo seco se utilizó para cuantificar el contenido de lignina. Se corrieron tres repeticiones por tratamiento.

Cuadro 17. Composición de enzima y tiempo de incubación de tratamientos de deslignificación de madera de *M. oleifera*

Tratamiento	Tiempo de incubación (h)	Buffer (mL)	Extracto (µL)	Concentración de lacasa (U/L)
1	4	1.950	50	100
2	4	1.900	100	200
3	4	1.800	200	400
4	8	1.950	50	100
5	8	1.900	100	200
6	8	1.800	200	400
7	24	1.950	50	100
8	24	1.900	100	200
9	24	1.800	200	400
10	72	1.950	50	100
11	72	1.900	100	200
12	72	1.800	200	400

b Cuantificación de lignina

La medición cuantitativa de la lignina insoluble se realizó siguiendo el procedimiento NREL/TP-510-42618 (Sluiter y col., 2008) con algunas modificaciones, tendientes a reducir el tamaño de muestra utilizada. Para ello se utilizaron los mismos viales de antibiótico de vidrio (provistos de tapones de hule y precinto) conteniendo el residuo sólido de la hidrólisis del párrafo anterior (aproximadamente 90 mg), a los cuales se les añaden 900 µL de ácido sulfúrico al 72%. Se incuban los frascos en un baño de agua a 30 ˚C durante 60 minutos para realizar la hidrólisis y se tapan con los tapones de hule, cubriendo la parte que se introduce al frasco con cinta de teflón (no se colocan aún los precintos), agitándose periódicamente para asegurar la hidrólisis. Se sacan los viales del baño y se diluye la concentración del ácido a 4% agregando 25.2 mL de agua destilada. Se coloca el precinto y se fija a presión el tapón al vial. Se introducen los viales en autoclave (Yamato SM300, Japón) durante 1 hora a 121 ˚C. Se dejan enfriar lentamente las muestras hidrolizadas antes de retirar los precintos y los tapones.

Los cálculos se hicieron de la manera descrita en el apartado A7d.

El porcentaje de lignina removida se determinó por la ecuación siguiente, reportada por (Cardoso-Silva y col., 2014):

$$\%\,Lignina\ removida = \frac{Peso\ de\ lignina\ inicial - Peso\ de\ lignina\ final}{Peso\ de\ lignina\ inicial} x\ 100 \qquad \text{(Ec. 14)}$$

c Diseño y análisis experimental

El diseño experimental fue completamente al azar con dos factores, tiempo y concentración de lacasa. Al primer factor se le asignaron 4 niveles (4, 8, 24 y 48 h) y al segundo 3 (50, 100 y 200 U/L), resultando 12 tratamientos, cada uno con 3 repeticiones. Los resultados fueron analizados con el paquete estadístico Minitab® 17. Se realizó comparación entre medias por la prueba de rangos múltiples de Tukey ($p<0.05$). La Figura 18 esquematiza la estrategia para esta sección experimental.

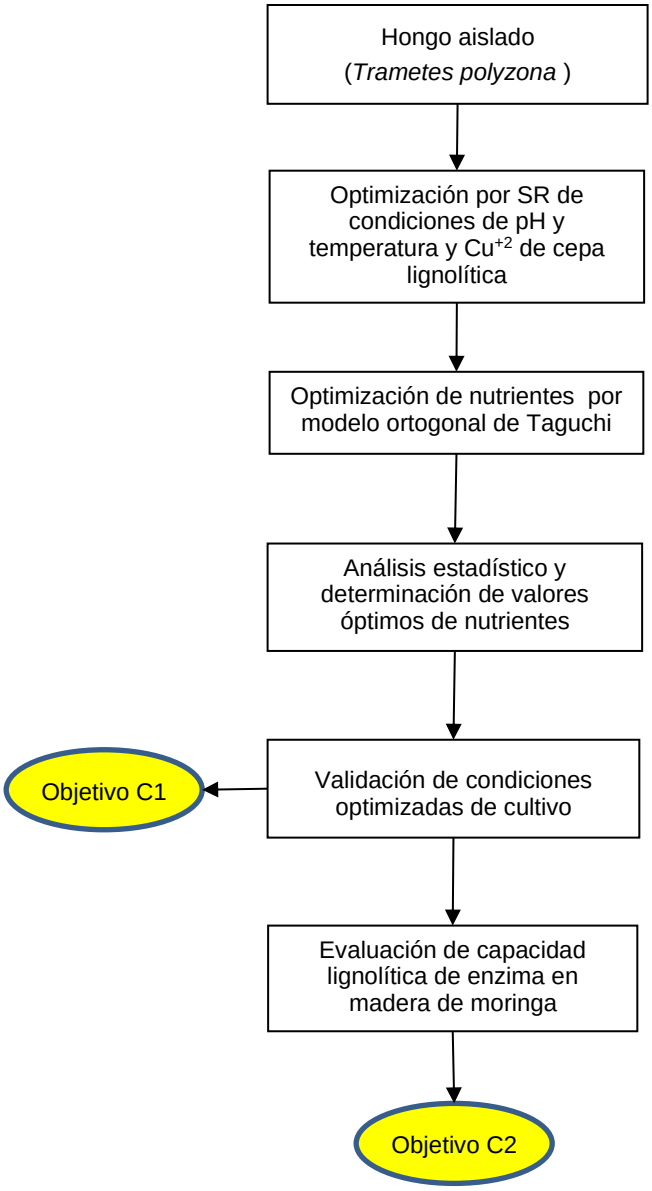


Figura 18. Estrategia experimental para la optimización de la producción de lacasas de *T. polyzona*

D Uso de residuos de biorrefinería de *M. oleifera* en la alimentación de codornices

1 Materias primas

Las materias primas utilizadas para la formulación de las dietas (maíz, soya, sal, caliza, aceite de soya, azúcar, metionina, ortofosfato de sodio y las premezclas de vitaminas y minerales) fueron adquiridas localmente. La hoja y las semillas de moringa se obtuvieron de una plantación ubicada en las coordenadas 24° 59' 06" N y 107° 22' 44" O a 95 m sobre el nivel del mar, en el municipio de Culiacán, Sinaloa. La variedad utilizada fue “Mojolo”. Las hojas se cosecharon incluyendo raquis; las semillas secas se recogieron con su cápsula. Ambos materiales se llevaron al laboratorio donde se secaron en un horno eléctrico con circulación de aire a 60 °C durante 24 h.

Las semillas, del ecotipo “Guerrero”, se extrajeron manualmente de su cápsula, la cascarilla se eliminó mecánicamente en una descascarilladora modelo HD-11 (Reinmac, MX) y se extrajo el aceite en una prensa de extracción de aceite en frío EPS-01 (EPS Group Surat, India), a una temperatura promedio de prensado de 120 °C.

2 Preparación de harina hidrolizada de *M. oleifera*

Se prepararon 2 L de inóculo de cepas seleccionadas de *Mucor circinelloides* (C1502) y *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 200062) haciéndolos crecer respectivamente en caldo YPD (glucosa 20 g/L, peptona 20 g/L y extracto de levadura 10 g/L) a 28 °C, sin agitación durante 7 días (d). Por otro lado, en 5 biorreactores de vidrio de 19 L (diseño propio) se prepararon caldos conteniendo 750 g de harina de MO en 15 L de agua, esterilizando en autoclave la mezcla a 121 °C / 25 min. A cada biorreactor se le agregó 250 mL de cada inóculo y se mantuvo a 28 °C por 48 h con agitación a 200 rpm y condiciones aerobias seguido de 72 h sin agitación en condiciones anaerobias, lo cual se consiguió colocando una esclusa de aire tipo S en la salida del biorreactor. Una vez terminada la fermentación se filtró por completo el contenido de los biorreactores utilizando una manta de polipropileno y el sólido obtenido se inactivó en autoclave (SK110c

(Yamato, JP), a 121 °C / 15 min, seguido de secado en horno a 60 °C durante 12 h. Tanto las hojas secas, el residuo hidrolizado, como la pasta de semilla desgrasada por prensado fueron trituradas por separado en un molino modelo 200 (Pulvex, MX) utilizando cedazo con orificios de 1 mm.

3 Análisis proximales de materias primas y procesadas

Muestras de hojas secas, de residuo fermentado y de torta de semilla desgrasada por prensado, fueron adicionalmente trituradas por separado en un molino Stein M-2 (Hoffman Manufacturing, Sample Mill, USA) durante 3 minutos hasta obtener una harina fina. Se determinaron los parámetros proximales de humedad, proteínas, lípidos, fibra cruda y carbohidratos de la harina de hoja (HMNT), harina de hoja fermentada (HMHF), de semilla sin desgrasar (SMOC) y desgrasada (SMOD) de moringa, empleando la metodología de la AOAC (2005). Para la determinación de humedad se utilizó el método 930.04; para cenizas, 930.05; para lípidos, 920.39; para fibra cruda, 962.09; para proteínas, 960.52, con un factor de conversión de 6.25. Los carbohidratos se calcularon como extracto libre de nitrógeno (ELN) restando de 100%, los valores de cenizas, proteínas, lípidos y fibra cruda. La metodología se describe detalladamente en la sección A7.

4 Formulación de dietas

Considerando la información del análisis proximal practicado a las materias primas provenientes de moringa, se formularon respectivamente las siguientes dietas para iniciación (1 a 14 d) y para finalización (15 a 35 d): harina de hoja de *M. oleifera* no tratada al 10% (HMNT1, HMNT2), harina de hoja de *M. oleifera* hidrolizada y fermentada al 10% (HMHF1, HMHF2), harina de semilla de *M. oleifera* desgrasada al 5% (SMOD1 y SMOD2) y testigos (TEST1 y TEST2). Para las materias primas como maíz y soya, los cálculos nutrimentales se basaron en las tablas de requerimientos nutricionales para aves de la National Research Council (NRC, 1994) mientras que los perfiles de minerales, contenido de ácidos grasos y aminoácidos de la hoja y semilla de moringa se calcularon a partir de los datos publicados por Al-Juhaimi y col. (2015) y Oliveira y col. (1999).

5 Medición de los parámetros de crecimiento

a Manejo de las aves

Se realizó en la Unidad Avícola Experimental de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Sinaloa. Para la determinación del crecimiento de las aves se seleccionaron aleatoriamente 180 codornices japonesas no sexadas de un día de edad, 15 codornices se asignaron al azar a cada jaula metálica marcada con uno de los siguientes tratamientos: HMNT, dieta conteniendo 10% de harina de hoja de *Moringa oleifera* cruda; HMHF, dieta conteniendo 10% de harina de hoja de *M. oleifera* fermentada; SMOD, dieta conteniendo 5% de pasta de semilla de *M. oleifera* desgrasada y TEST, testigo. Las jaulas se colocaron dentro de una caseta avícola tipo convencional (9 x 9 m); el microclima al interior de la caseta fue 25.6 a 32.3 °C y 51 a 77% de HR. Cada jaula metálica de 90 x 90 x 60 cm, colocada sobre piso de cemento con cama de heno de Sudán (*Sorghum vulgare* var. *sudanensi*) se equipó con comederos de charola metálica rectangular (20 x 30 cm) y bebederos de 1 L durante la etapa de iniciación y comederos tipo tolva semiautomático de piso de 25 x 17.5 x 25 cm y un bebedero vitrolero de 3.8 L en la etapa de finalización. Al agua se le agregó 1 g/10L de un complejo de vitaminas (Carosen® concentrado) y 10 g/20L de electrólitos orales (Electrólitos®, Riverfarma) durante la primera semana. Las aves se alimentaron *ad libitum*, pesándose diariamente el alimento servido y semanalmente, el alimento no consumido.

b Medición de parámetros de crecimiento

Se midieron los pesos corporales de todas las codornices al inicio y a los días 7, 14, 21, 28 y 35. Los parámetros medidos son peso vivo, ganancia de peso, consumo de alimento, tasa de conversión alimenticia y porcentaje de mortalidad, determinadas de acuerdo a la metodología utilizada por Ochi y col. (2015), y que consiste en lo siguiente.

1) Alimento consumido

El alimento se pesó todos los días para determinar el consumo promedio de alimento por animal para los diferentes tratamientos. El consumo de alimento se

calculó restando el alimento sobrante al alimento servido y se dividió por el número de aves en cada grupo por día y totalizado para cada semana.

$$Alimento\ consumido = Alimento\ servido - alimento\ sobrante \quad \text{(Ec. 15)}$$

2) Ganancia de peso (g)

Las aves se pesaron todas las semanas para determinar el aumento de peso promedio por pollito para los diferentes tratamientos. El aumento de peso se calculó como la diferencia entre dos pesos corporales semanales sucesivos de la siguiente manera:

$$Ganancia\ de\ peso = Peso\ final - peso\ inicial \quad \text{(Ec. 16)}$$

3) Tasa de conversión alimenticia (TCA)

Las aves y el alimento se pesaron todas las semanas para determinar la TCA promedio por ave para los diferentes tratamientos. La tasa de conversión alimenticia se calculó dividiendo la cantidad de alimento consumido (g) entre la ganancia de peso:

$$Tasa\ de\ conversión\ alimenticia = \frac{Alimento\ consumido}{Ganancia\ de\ peso} \quad \text{(Ec. 17)}$$

4) Mortalidad

Se realizó un control diario de las jaulas para verificar y registrar cualquier caso de muerte en cada tratamiento. El cálculo de la mortalidad se expresa como porcentaje de la siguiente manera:

$$Tasa\ de\ mortalidad = \frac{Número\ de\ muertes}{Número\ total\ de\ aves} x\ 100 \quad \text{(Ec. 18)}$$

5) Diseño experimental

El diseño experimental fue completamente al azar con cuatro tratamientos, cada uno con tres repeticiones (jaulas) por tratamiento. Se consideraron dos medidas repetidas en el tiempo, correspondientes a las etapas de iniciación (0-14 d) y finalización (15-35 d). Los resultados fueron analizados con el paquete estadístico Minitab® 17. Se realizó comparación entre medias por la prueba de Tukey ($p<0.05$).

6 Rendimientos de canal

a Sacrificio de aves

En el día 35 de experimento, se tomaron al azar tres codornices macho de cada jaula, las cuales fueron sometidas a 12 h de ayuno de alimento. El sacrificio que fue realizado por decapitación (SAGARPA, 2014) y se desangraron por 4 minutos. En el proceso de faenado se separó la piel y plumas manualmente, se realizó el corte de las articulaciones radio-carpiana y tibio-tarsiana, extracción de los órganos digestivos y respiratorios, a excepción del corazón y riñones

b Cálculos de rendimientos de canal

Las canales fueron pesadas (peso en canal caliente); enseguida se enfriaron sumergiéndolas por 10 min en agua (aproximadamente 4 °C) con hielo y escurridas para medir el peso de la canal fría (Tserveni-Gousi et al., 1999). Los rendimientos en canal caliente y en canal fría se calculan según la siguiente ecuación (Cori y col., 2009):

$$\text{Rendimiento de canal} = \frac{Peso\ canal}{Peso\ vivo} \times 100 \qquad \text{(Ec. 19)}$$

El porcentaje de absorción de agua de la canal se calcula con la siguiente fórmula:

$$\text{Absorción agua de canal} = \frac{Peso\ canal\ frío - Peso\ canal\ caliente}{Peso\ canal\ caliente} \times 100 \qquad \text{(Ec. 20)}$$

c Diseño experimental

La unidad experimental correspondió al conjunto de tres aves de las quince colocadas en cada jaula, evaluándose las siguientes variables: a) Peso de canal caliente; b) Peso de canal fría; c) Porcentaje de canal caliente; d) Porcentaje de canal fría; e) Porcentaje de absorción de agua de la canal. Los resultados fueron analizados con el paquete estadístico Minitab® 17. Se realizó comparación entre medias por la prueba de Tukey ($p<0.05$). La estrategia general de esta sección experimental se muestra en la Figura 19.

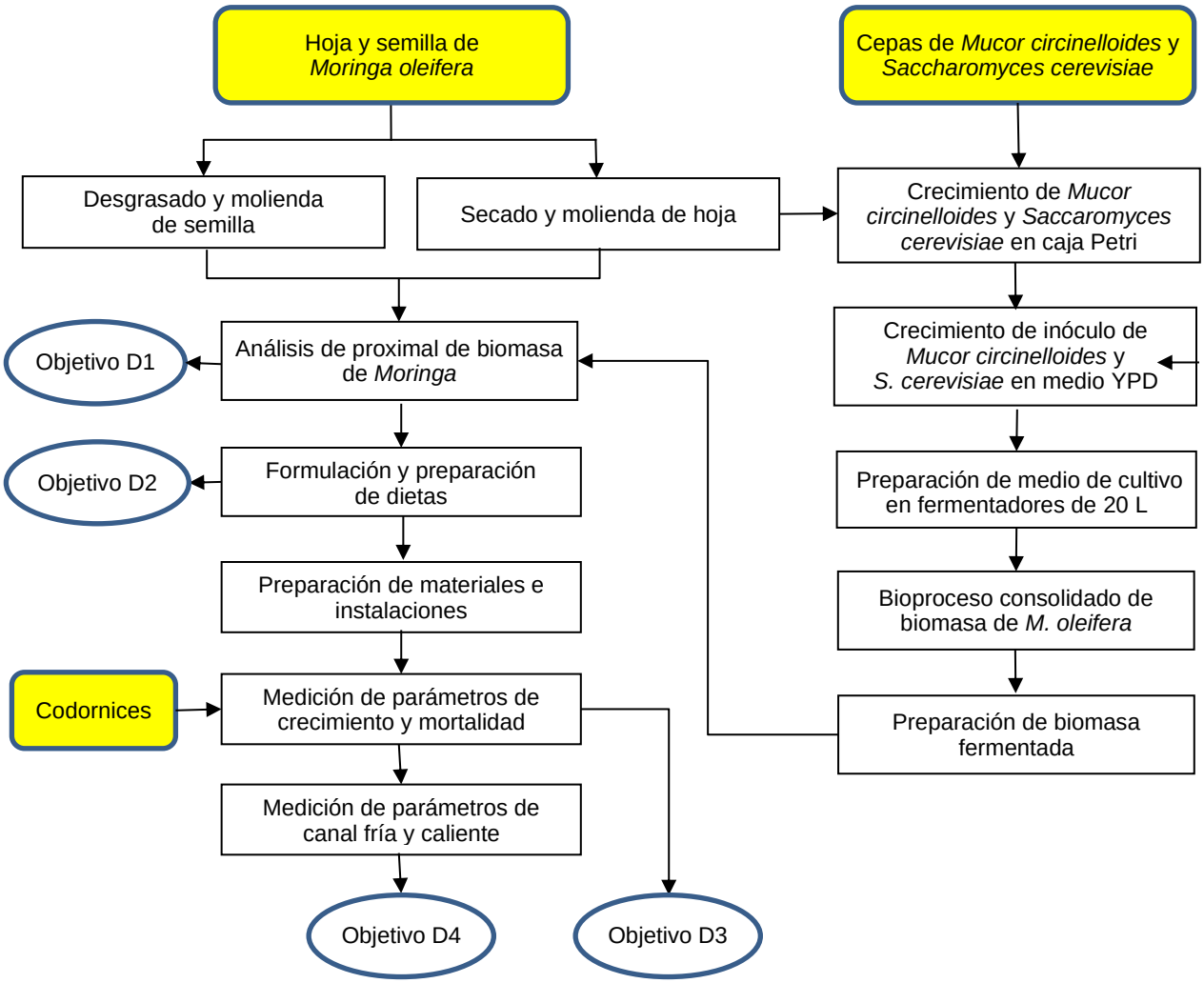


Figura 19. Estrategia experimental para la evaluación de la inclusión de residuos fermentados de biomasa y torta de prensado de semilla de *M. oleifera* en el crecimiento de codornices japonesas

VI RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A RENDIMIENTOS Y ANÁLISIS DE BIOMASA DE *MORINGA*

1 Crecimiento aéreo

En las Figuras 20a y 20b se puede apreciar la evolución en el crecimiento de los 6 ecotipos estudiados medidos a través de la altura de árbol y diámetro de tallo. Si bien los árboles inician teniendo valores similares, las diferencias comienzan a ser notorias a partir del día 90, siendo significativas el día 180 (Cuadro 18 y Figura 21). Se encontraron alturas menores para los ecotipos “Sonora” y “Mojolo”, mientras que, para el diámetro de tallo, los ecotipos “Culiacán” y “Elota” presentaron los valores más altos ($p<0.05$). Cabe señalar que el rápido crecimiento del tallo del ecotipo anual “Elota” contrasta con el lento desarrollo de “Sonora” que es de tipo perenne, lo cual concuerda con lo señalado por Raja y col. (2013), quienes encontraron que las variedades de tasa anual o híbridas por ellos estudiadas crecieron más rápidamente que los tipos perennes. Sin embargo, en nuestro estudio, “Culiacán”, que es de tipo perenne, no se ajustó a este comportamiento. Esto podría deberse a que dicho ecotipo tiene un mayor tiempo de aclimatación a las condiciones locales, ya que proviene de generaciones de árboles encontrados en plazas y lugares públicos de la ciudad de Culiacán, que muy probablemente hayan sido introducidos a la región hace más de 80 años (Martínez, 1959), lo que no sucede con “Sonora”, apenas importados en el año 2013.

2 Componentes de la biomasa aérea a los 16 meses

Los componentes del rendimiento de la biomasa y semilla se dan en el Cuadro 19. “Mojolo” tuvo el mayor rendimiento de tallos por árbol de todos los ecotipos. El peso promedio de hojas frescas y secas para “Mojolo” también fue significativamente mayor que el promedio del resto de los ecotipos, siendo “Sinaloa” y “Sonora” los que presentaron los menores pesos. Respecto al porcentaje promedio de las partes de la biomasa aérea se encontró que los tallos son el componente principal, siendo el ecotipo “Guerrero” el que mayor porcentaje obtuvo y “Sinaloa” el menor Del mismo modo, “Mojolo” tuvo la mayor proporción

de hojas frescas y secas de todos los ecotipos siendo significativamente diferente de “Elota”, “Sinaloa” y “Sonora”.

Cuadro 18. Altura y diámetro de tallos de seis ecotipos de *Moringa oleifera* a los 180 días de crecimiento

Ecotipo	Culiacán	Elota	Guerrero	Mojolo	Sinaloa	Sonora
Altura de árbol	230.4 a	238.7 a	237.7 a	211.2 b	233.3 a	210.6 b
D.E.	45.5	52.0	46.3	47.6	54.1	49.7
Diámetro de tallo	37.0 a	39.5 a	34.1 ab	33.2 ab	35.2 ab	29.1 b
D.E.	11.1	12.0	10.5	12.0	10.5	9.4

D.E. = desviación estándar. Filas que comparten una misma letra son iguales ($p<0.05$).

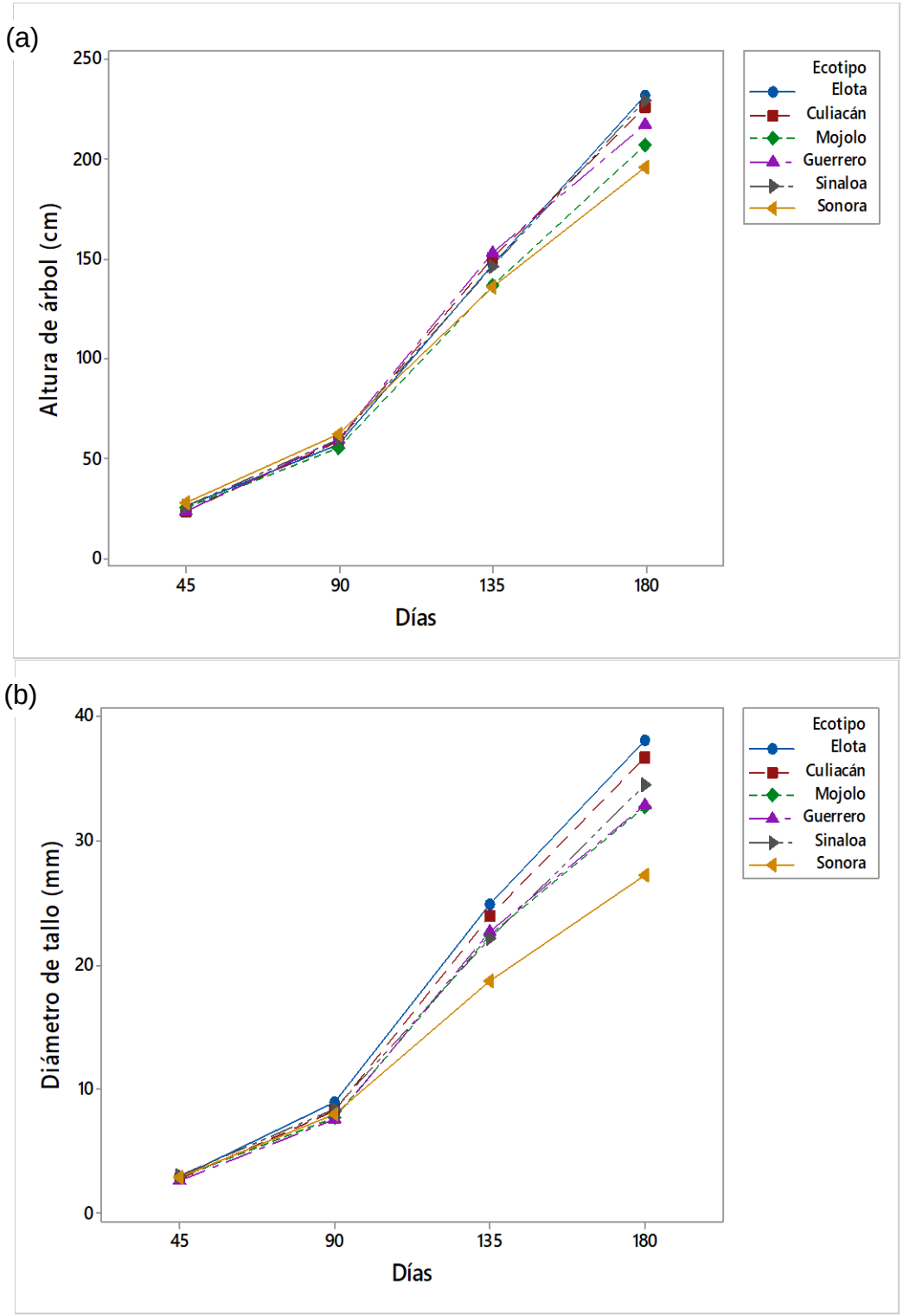


Figura 20. Evolución del crecimiento de seis ecotipos de *M. oleifera* hasta los 180 días, (a) Altura de árbol y (b) diámetro del tallo

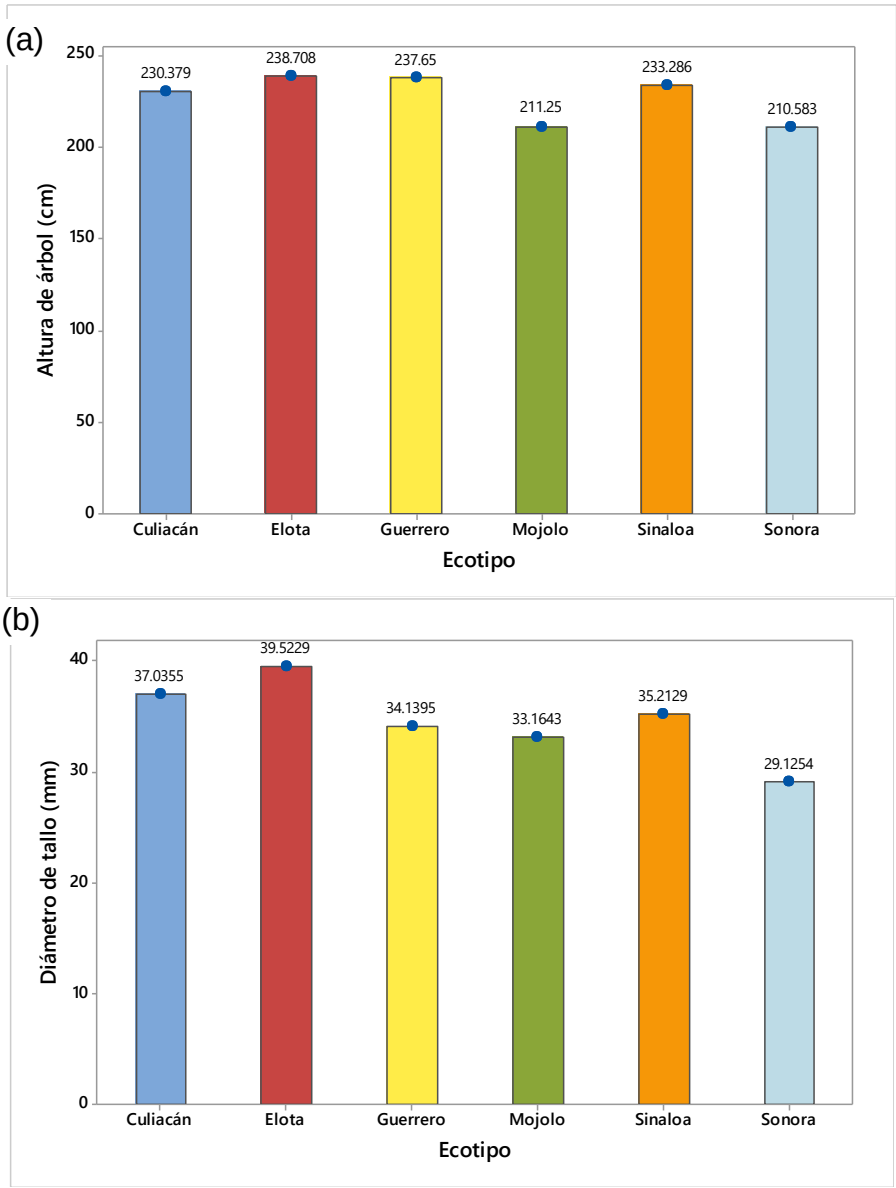


Figura 21. Altura y diámetro de tallo de árboles de seis ecotipos regionales de *M. oleifera* a los 180 días de crecimiento

Cuadro 19. Componentes del rendimiento promedio por árbol de la biomasa para plantas de 16 meses de seis ecotipos de *M. oleifera*

Ecotipo	Culiacán	Elota	Guerrero	Mojolo	Sinaloa	Sonora
Ramas						
Ramas frescas (g)	8493 b	9103 b	8200 b	13857 a	7218 b	8198 b
Ramas secas (g)	2158 ab	1706 b	2110 ab	2571 a	1738 b	1391 b
Ramas secas (%)	66.9 bc	63.3 cd	74.7 a	68.8 b	62.6 d	65.1 cd
Hojas						
Hojas frescas (g)	953 b	918 b	1076 b	1741 a	789 b	629 b
Hojas secas (g)	261 b	248 b	330 b	502 a	209 b	223 b
Hojas secas (%)	9.0 b	9.2 b	11.4 ab	13.4 a	9.0 b	10.9 ab
Frutos secos:						
Frutos secos (g)	831 ab	747 ab	400 b	664 ab	1117 a	501 ab
Frutos secos (%)	24.1 ab	27.5 a	13.9 d	17.8 c	28.4 a	24.0 b
Semillas:						
Semillas (g)	266 ab	244 ab	154 b	262 ab	412 a	164 b
Semillas (%)	8.2 bc	9.0 b	5.4 d	7.9 bc	10.5 a	7.9 bc
Rend. fruto/semilla (%)	32.0	32.7	38.5	39.5	36.9	32.7
Semillas por fruto	17.6 ab	19.0 a	14.3 c	15.9 bc	19.9 a	19.9 a
Peso semillas/fruto (g)	3.3 c	4.8 b	3.6 c	3.7 bc	6.1 a	5. 8 a
Kernel						
Kernel (g)	175 ab	170 ab	96 b	196 ab	305 a	112 b
Kernel (%)	5.7 bc	7.3 a	3.8 d	4.9 c	7.3 a	5.5 bc
Rel. semila/kernel (%)	65.8	69.7	62.3	74.8	74.0	68.3

Filas que comparten una misma letra son iguales ($p<0.05$).

En cuanto al rendimiento de frutos secos, semillas y granos, el ecotipo que presentó el mayor peso fue “Sinaloa”, siendo significativamente diferente de “Guerrero” y “Sonora” que tuvieron los menores pesos. A pesar de que los ecotipos “Elota” y “Culiacán” también tuvieron altos rendimientos porcentuales de frutos secos, los pesos obtenidos de semilla entera y descascarillada fueron los más bajos, debido a la característica de sus frutos de tener cáscara más gruesa (“Culiacán”) o separaciones entre semillas más grandes (“Elota”). Por el contrario, los ecotipos “Sinaloa” y “Elota” produjeron la mayor proporción de frutos, semillas y semillas descascarilladas del total de la biomasa seca.

En lo referente al número de semillas por fruto, se encontró que “Sinaloa”, “Sonora”, y “Elota” (19.9, 19.9, 19.0) mostraron claramente los valores más altos. Estos resultados son superiores a los reportados por Ayerza (2012) en Argentina, para los cuales se promediaron 16.25 semillas por fruto para la variedad PKM-1 y 16.12 para la variedad de origen africano.

En cuanto al peso de semilla por fruto, se encontró que los mayores rendimientos fueron obtenidos con los ecotipos “Sinaloa”, “Sonora” y “Elota” (6,1, 5.8, 4.8 g). En el caso de “Sinaloa”, esto pudiera deberse al mayor tamaño de las semillas. Como en el caso del número de semillas, el peso de las semillas en el ecotipo “Sinaloa” es superior al encontrado por Ayerza (2011), quien señala un promedio de 4.03 g de semilla para la variedad de vaina larga PKM-1 y 3.07 para un ecotipo de Tanzania.

Por su parte, Raja y col. (2013), en un estudio comparativo de 14 ecotipos y variedades de *Moringa oleifera* en India, reportaron los mayores rendimientos en los híbridos de frutos largos PKM-1 y PKM-2, los cuales, al parecer por el tamaño de los frutos y semillas, podrían estar emparentados cercanamente con los ecotipos “Elota” y “Sinaloa”, de los que se desconoce su proveniencia original. Destaca que el ecotipo “Sinaloa”, si bien presentó menor cantidad de biomasa de ramas y hoja, tuvo rendimientos de semilla y semilla descascarillada mayores a los de los otros ecotipos. Esta cualidad lo hace sobresaliente para la producción de semilla y aceite.

3 Análisis proximales

El Cuadro 20 muestra los resultados del análisis químico de tallos, hojas y semillas. Los resultados se expresan en porcentaje de composición (g/100g).

a Tallos

El contenido de cenizas en tallos fue similar en todos los ecotipos, siendo solo diferente ($p<0.05$) para “Culiacán” y “Guerrero” que presentaron los valores más bajos (4.54 y 4.68%). Estos resultados son equiparables a los reportados por Abdulkadir y col. (2016) y más bajos que los obtenidos por Mahmoud (2013) y por Pérez y col. (2010). Estas diferencias podrían ser atribuibles a las variedades y a las condiciones de cultivo las cuales pueden ser de gran influencia (Anwar y col., 2006; Nouman y col., 2012). En contraste, el contenido de lípidos de los ecotipos mencionados fue el más alto, mientras que “Sinaloa” y “Sonora” presentaron los más bajos. Pérez y col. (2010) reportan contenidos de lípidos similares a los del presente trabajo, mientras que Abdulkadir y col. (2016) citan valores mucho mayores (11.80%).

El contenido de proteínas fue significativamente mayor ($p<0.05$) para “Sonora” y “Sinaloa” y bajo para “Guerrero”. Los valores encontrados son muy inferiores a los que reportan otros autores (12.00, 16.14 y 11.22%) (Pérez y col., 2010; Mahmoud, 2013; Abdulkadir y col., 2016). Es probable que esta diferencia se deba a la edad juvenil de las ramas utilizadas por estos autores en la realización de los análisis, mientras que en este trabajo se usaron ramas y troncos maduros. En estudios realizados por Pérez-Ángel y col. (2010) y por Shih y col. (2011) se observa este mismo comportamiento, donde el contenido de proteínas de *M. oleifera* decrece conforme aumenta la edad de las ramas o troncos.

Para el contenido de fibra cruda, la variedad “Sonora” tuvo el mayor porcentaje, mientras que “Mojolo” y “Guerrero” el menor ($p<0.05$). Los promedios de los resultados obtenidos con los ecotipos estudiados son similares a los encontrados por otros autores para variedades de Malasia, Egipto y Cuba (Pérez y col., 2010; Mahmoud, 2013; Abdulkadir y col., 2016).

Cuadro 20. Composición proximal de tallo, hoja y semillas de seis ecotipos de *M. oleifera*

Ecotipo	Culiacán	Elota	Guerrero	Mojolo	Sinaloa	Sonora	Literatura		
Tallos							Pérez y col. (2010)	Abdulkadir y col. (2016)	Mahmoud (2013)
Humedad%	6.13 ± 0.63 ab	6.63 ± 0.67 a	6.00 ± 0.21 bc	5.82 ± 0.21 bc	5.59 ± 0.45 cd	5.16 ± 0.31 d	11.13	5.10	5.77
Cenizas*%	4.54 ± 0.53 b	5.90 ± 0.63 ab	4.68 ± 0.99 b	6.44 ± 3.28 a	5.71 ± 0.54 ab	5.08 ± 0.75 ab	11.38	5.50	9.18
Lípidos*%	3.90 ± 0.28 a	3.49 ± 0.91 b	3.95 ± 0.11 a	2.57 ± 0.17 d	3.06 ± 0.05 c	3.01 ± 0.10 c	2.05	11.80	0.87
Proteínas*%	5.25 ± 1.10 ab	5.46 ± 0.63 ab	4.59 ± 0.51 b	5.65 ± 0.86 ab	5.79 ± 1.10 a	6.13 ± 1.45 a	11.22	12.00	16.14
Fibra cruda*%	35.43 ± 0.08 ab	37.32 ± 1.58 a	33.48 ± 1.84 b	33.34 ± 0.30 b	35.33 ± 1.16 ab	39.20 ± 2.18 a	41.90	34.20	30.53
Extracto no nitrogenado*%	50.89 ± 1.01 ab	47.84 ± 1.37 bc	53.30 ± 2.02 a	52.01 ± 3.42 a	50.11 ± 1.30 ab	46.59 ± 1.22 c	33.45	36.50	43.28
Hojas							Pérez y col. (2010)	Castillo y col. (2018)	Olugbemi y col. (2010)
Humedad%	8.67 ± 0.43 a	6.94 ± 1.08 b	7.41 ± 0.37 ab	8.22 ± 0.98 ab	7.23 ± 0.52 ab	8.14 ± 1.23 ab	10.40	6.27	5.40
Cenizas*%	8.60 ± 0.17 bc	9.08 ± 0.40 ab	9.17 ± 0.70 ab	9.62 ± 0.60 a	8.97 ± 0.68 ab	7.98 ± 0.59 c	10.42	9.54	12.20
Lípidos*%	8.74 ± 0.30 ab	6.09 ± 0.75 d	8.28 ± 0.20 bc	9.17 ± 1.07 a	8.74 ± 1.07 ab	7.62 ± 0.58 c	4.62	12.63	5.90
Proteínas*%	29.24 ± 0.50 a	30.36 ± 0.44 a	28.93 ± 0.78 a	29.54 ± 0.76 a	29.87 ± 0.95 a	24.90 ± 0.91 b	24.99	28.90	28.00
Fibra cruda*%	13.18 ± 0.42 a	12.44 ± 0.58 ab	9.46 ± 0.34 c	12.60 ± 0.71 ab	12.65 ± 0.44 ab	11.52 ± 0.43 b	23.60	8.49	7.10
Extracto no nitrogenado*%	40.24 ± 0.85 ab	42.02 ± 2.27 ab	44.16 ± 0.59 bc	39.07 ± 2.66 c	39.77 ± 1.61 c	47.99 ± 1.25 a	36.37	40.44[2]	46.80
Semillas							Liang y col. (2019)	Anwar y Rashid (2007)	Barakat y Ghazal (2016)
Humedad%	4.51 ± 0.05 a	3.85 ± 0.04 c	3.88 ± 0.09 bc	4.20 ± 0.09 ab	3.99 ± 0.21 bc	6.78	5.70	7.50	7.50
Cenizas*%	3.78 ± 0.11 ab	3.32 ± 0.07 c	3.34 ± 0.08 c	3.94 ± 0.08 a	3.53 ± 0.20 bc	3.50	6.60	4.73	4.73
Lípidos*%	42.63 ± 1.17 c	48.23 ± 0.07 a	40.62 ± 0.52 d	41.73 ± 0.80 cd	45.22 ± 0.31 b	39.12	40.39	29.61	29.61
Proteínas*%	36.95 ± 0.03 a	31.51 ± 0.36 d	32.77 ± 0.08 c	35.18 ± 0.31 b	33.61 ± 0.22 c	40.34	29.36	35.54	35.54
Fibra cruda*%	14.81 ± 0.16 b	13.63 ± 0.11 c	21.93 ± 0.01 a	6.89 ± 0.29 e	12.26 0.22 d	8.10	7.20	10.92	10.92
Extracto no nitrogenado*%	1.83 ± 1.25 c	3.32 ± 0.37 bc	1.35 ± 0.36 c	10.14 ± 0.82 a	5.38 ± 0.20 b	8.94	16.45	20.03	20.03

Filas que comparten una misma letra son iguales ($p<0.05$). * Los resultados se expresan en base seca.

Con respecto al contenido de carbohidratos totales (determinado como extracto libre de nitrógeno), el porcentaje mayor ($p<0.05$) fue encontrado en los ecotipos “Guerrero” (53.30%) y “Mojolo” (52.01%), mientras que el menor porcentaje lo presentó “Sonora” (46.59%). Estos resultados son superiores en aproximadamente 12 puntos porcentuales a los reportados por otros autores (33.45 a 43.28%), lo que también podría deberse a la edad de las partes analizadas de los árboles, al aumentar el contenido de carbohidratos (estructurales) conforme disminuyen el contenido de lípidos y proteínas (Pérez-Ángel y col., 2010; Shih y col., 2011).

b Hojas

Como era de esperarse, el contenido de cenizas, lípidos y proteínas es drásticamente superior en hojas que en tallos. Esto es debido a las funciones diferentes que tienen estas partes del árbol. El Cuadro 20 muestra que, de las variedades estudiadas, “Mojolo” presentó el contenido de cenizas más alto ($p<0.05$), pero, aun siendo las diferencias estadísticamente significativas, son numéricamente menores a 2%. Castillo y col. (2018), quienes trabajaron también con moringa de Sinaloa, reportaron valores similares a los encontrados en este trabajo, mientras que Olugbemi y col. (2010) así como Chatepa y Mbewe (2018), señalan contenidos ligeramente superiores.

Para al contenido de lípidos en hojas, destaca el ecotipo “Mojolo” que promedió 9.17%, seguidos de “Culiacán” y “Sinaloa” (8.74%). Estos valores son superiores a los reportados por Pérez y col. (2010) y por Olugbemi y col. (2010), e inferiores a los encontrados por Castillo y col. (2018) y por Chatepa y Mbewe (2018) como se puede observar en el Cuadro 20. La menor cantidad se encontró en la variedad “Elota”.

Para la proteína en hojas, no se observaron diferencias para los distintos ecotipos, excepto para “Sonora” que presentó un valor significativamente ($p<0.05$) más bajo (24.9%) y similar al reportado por Chatepa y Mbewe (2018). El resto de las variedades presentaron promedios similares a los reportados por Castillo y col. (2018) y Olugbemi y col. (2010), que es de alrededor de 29%. Por los resultados obtenidos en el presente estudio, cualesquiera de los ecotipos estudiados puede ser considerado una buena fuente de proteínas, e

interesantes como uno de los coproductos a explotar desde el punto de vista de una biorrefinería (Foidl y col., 2001; Benítez y col., 2014; Raman y col., 2017; Gandji y col., 2018).

El contenido de fibra cruda en hojas fue drásticamente menor en hojas que en tallos, siendo el ecotipo “Culiacán” el de mayor contenido, pero no significativamente diferente de “Elota”, “Mojolo” y “Sinaloa”. “Sonora” y “Guerrero” alcanzaron los valores más bajos (9.46%). Estos valores están dentro de los rangos reportados por otros autores (Olugbemi y col., 2010; Pérez y col., 2010; Castillo y col., 2018; Chatepa y Mbewe, 2018).

Por otro lado, el ecotipo “Sonora” presentó el más alto tenor de carbohidratos (47.99%), en detrimento del contenido de proteínas en la hoja, como también se puede constatar en el Cuadro 20. Las variedades con menor contenido de glúcidos fueron “Mojolo” (39.07%) y “Sinaloa” (39.77%). Otros autores reportan resultados similares a los encontrados en el presente trabajo (Olugbemi y col., 2010; Pérez y col., 2010; Castillo y col., 2018).

Como lo señala Shih y col. (2011), aparte de la variedad, diversos factores como la temperatura, latitud, altitud, temperatura, época del año y las características del suelo (Anwar y col., 2006; Nouman y col., 2012) pueden influir de manera importante sobre el contenido de los componentes químicos mayores en las hojas y tallos de moringa.

c Semillas

No se encontraron diferencias significativas entre ecotipos para el contenido de cenizas de la semilla descascarillada de moringa. Los resultados fueron similares a los reportados por Nzikou y col. (2009) para *M. oleifera* procedente del Congo (4.2%) y Liang y col. (2019), y ligeramente inferiores a los reportados por Anwar y Rashid (2007) y Barakat y Ghazal (2016).

Dentro de los componentes químicos más importantes de las semillas de *M. oleifera* se encuentran los lípidos. Para los ecotipos estudiados, se observó que “Elota” y “Sinaloa” presentaron los más altos porcentajes de grasa, y los más bajos se encontraron en las variedades “Guerrero” y “Sonora”. Los seis ecotipos de semilla de moringa analizados mostraron mayor contenido de lípidos que lo reportado por otros autores (Anwar y Rashid, 2007; Nzikou y col.,

2009; Liang y col., 2019). Destaca en el presente trabajo el contenido de lípidos del ecotipo “Elota” (48.22%), que sobrepasa lo reportado por otros autores, como Gómez-Mitjans y col. (2016) (45.04%), quien analizó la variedad Nicaragua utilizando hexano como solvente al igual que en este trabajo. Otros investigadores, como Makkar y Becker (1997), Al-Juhaimi y col. (2017) y Ayerza (2012) reportan también contenidos inferiores a los encontrados en el presente estudio (41.7%, 40.98%, 40.68%). Por su alto contenido de lípidos, los ecotipos “Elota” y “Sinaloa” son interesantes para la producción de biodiésel a partir del aceite. Es pertinente aclarar que estos resultados comprenden sólo los análisis realizados a la semilla de la primera cosecha, sin embargo, se observa una clara tendencia de las variedades mencionadas a producir altos contenidos de aceite.

Para el contenido de proteínas, los ecotipos “Culiacán” (36.95%) y “Sonora” (36.91%) se encontraron los porcentajes más altos. Estas proporciones son semejantes a las reportadas por Liang y col. (2019) (40.34%), Abdulkarim y col. (2005) (38.3%) y Nzikou y col. (2009) (37.6%). Se encontraron cantidades no lejanas de proteínas en los ecotipos de “Culiacán”, “Sonora” y “Mojolo” que en alimentos considerados altos en estos nutrientes como la soja (36.49%) (USDA, 2010).

El ecotipo con el más alto porcentaje de fibra cruda fue “Guerrero” con 21.93% ($p<0.05$) y no se encontraron diferencias significativas entre sí para el resto de los otros ecotipos. Entre los seis ecotipos se observó un promedio de 14.65%, lo cual es mayor que lo reportado en la literatura, donde varían de 3.2 a 7.72% (Nzikou y col., 2009). Esta diferencia podría explicarse por el hecho de que en este trabajo se utilizó en método 962.09 de la AOAC (2005), que incluye dos digestiones, una ácida y otra alcalina, mientras que Anwar y col. (2007) utilizaron una sola digestión ácida.

4 Perfil de ácidos grasos de aceite de semilla

En el Cuadro 21 se observan los principales ácidos grasos encontrados en el aceite de semilla de moringa de 4 de los 6 ecotipos estudiados. Los principales ácidos grasos saturados fueron el palmítico, behénico, esteárico, araquídico y el lignocérico. El oleico fue el principal ácido graso insaturado

(media de 74.44% entre los cuatro ecotipos). El oleico fue además, el único ácido graso insaturado que presentó diferencias significativas entre los cuatro ecotipos siendo las semillas de "Elota" y "Culiacán" donde se encontró mayor contenido y la de "Guerrero" la que obtuvo menor porcentaje. Esta diferencia en el contenido de ácido oleico, se pudiera deber a la variabilidad genética presentada entre los ecotipos (Leone y col., 2016).

Los valores anteriores son similares a los reportados en Kenia para la variedad Mbololo por Tsaknis y col. (1998), por Lalas y Tsaknis (2002) para el híbrido PKM-1 y Anwar y Rashid (2007) para una variedad silvestre de Pakistán (71.21%, 73.60%, 73.22%), e inferiores (76.00%) a lo encontrado por Anwar y col. (2005), para un ecotipo de otra región de Pakistán. Sin embargo, el ecotipo "Elota", presentó valores igualmente altos (75.90%) de este ácido graso.

El siguiente ácido graso en importancia fue el ácido saturado behénico, el cual presentó valores ligeramente por encima a los reportados por los autores mencionados anteriormente. Este ácido graso es característico del aceite de semilla de moringa, y no es muy común en otros tipos de aceites o grasas. De hecho, el nombre lo recibe de esta planta, también llamada "Ben" .

El tercero en importancia de los ácidos grasos presentes en las semillas de los ecotipos de moringa analizados fue otro ácido graso saturado, el palmítico. Los promedios encontrados fueron inferiores en aproximadamente un punto porcentual a los reportados para variedades de África, India y Pakistán (Tsaknis y col., 1998; Tsaknis y col., 1999; Lalas y Tsaknis, 2002; Anwar y col., 2005; Anwar y Rashid, 2007; Leone y col., 2016). Es importante recalcar que de los 4 ácidos grasos presentes en mayor proporción, tres son saturados y solamente uno monoinsaturado. Los poliinsaturados representan menos del 0.8% del total. Esta característica le da al aceite de moringa mayor resistencia a la oxidación, por lo que desde el punto de vista industrial es una enorme ventaja, por lo que es ideal para ser considerado para su uso en la elaboración de biodiésel (Anwar y col., 2005).

Cuadro 21. Ácidos grasos detectados por CG del aceite de semilla de cuatro ecotipos de *M. oleifera*

Ácido graso		Elota	Culiacán	Mojolo	Guerrero	Tsaknis y col. (1998)	Lalas y Tsaknis (2002)	Anwar y col. (2005)	Anwar y Rashid (2007)
Palmítico	C16:0	4.82 ± 0.66 a	5.11 ± 0.43 a	5.37 ± 0.32 a	4.56 ± 0.05 a	6.04	6.46	5.98	6.45
Palmitoleico	C16:1	1.18 ± 0.23 a	1.11 ± 0.07 a	1.29 ± 0.07 a	1.28 ± 0.02 a	1.46	1.36	1.10	0.97
Margárico	C17:0	0.031 ± 0.04 a	0.017 ± 0.007 a	0.036 ± 0.004 a	0.020 ± 0.003 a	0.09	0.08	ND	ND
Esteárico	C18:0	4.61 ± 1.11 b	4.72 ± 0.27 b	6.69 ± 0.34 a	6.57 ± 0.25 a	4.14	5.88	4.47	5.50
Oleico	C18:1	75.91 ± 0.70 a	75.18 ± 0.06 ab	74.14 ± 0.93 b	72.51 ± 0.99 c	73.6	71.21	76.00	73.22
Linoleico	C18:2	0.538 ± 0.12 a	0.418 ± 0.09 a	0.575 ± 0.02 a	0.443 ± 0.05 a	0.73	0.66	1.20	1.27
Linolénico	C18:3	0.162 ± 0.12 a	0.128 ± 0.04 a	0.061 ± 0.02 a	0.060 ± 0.10 a	ND	0.22	ND	0.30
Araquídico	C20:0	3.31 ± 0.58 a	3.23 ± 0.24 a	4.92 ± 1.11 a	4.41 ± 0.02 a	2.76	3.62	3.50	4.08
Gondoico	C20:1	1.78 ± 0.17 a	1.80 ± 0.06 a	1.89 ± 0.06 a	1.70 ± 0.16 a	2.4	2.22	1.40	1.68
Behénico	C22:0	7.04 ± 0.71 a	7.17 ± 0.42 a	7.54 ± 0.07 a	7.36 ± 0.52 a	6.73	6.41	5.65	6.16
Lignocérico	C24:0	1.26 ± 0.30 a	1.19 ± 0.18 a	1.13 ± 0.03 a	1.10 ± 0.08 a	ND	ND	ND	ND

La desviación estándar se debajo del valor promedio. Letras diferentes en la misma fila denotan diferencias significativas entre ecotipos para un ácido graso determinado.

5 Perfil lignocelulósico de tallo de moringa

Los resultados presentados en el Cuadro y Figura 22 muestran que el tallo libre de extraíbles de los ecotipos estudiados contiene de 52.12% ("Guerrero") a 55.87% ("Culiacán") de celulosa. Estos resultados son semejantes a los reportados por Khider (2012), y Benítez y col. (2014), e inferiores a los señalados por Mahmoud (2013). En cuanto al contenido de hemicelulosa, se encontraron promedios entre 13.88% para el ecotipo "Culiacán" y 26.30% para "Sonora". Basado en estos resultados se puede estimar la parte fermentable, proveniente de la celulosa y hemicelulosa (holocelulosa), que representan del 69.75% ("Culiacán") al 79.48% ("Sonora") del total. Los porcentajes de lignina complementan el 100%, por lo que a mayor proporción de holocelulosa, menor la de lignina. Los resultados del contenido de holocelulosa obtenidos en este trabajo son similares a los reportados para moringa de Argentina (Benítez y col., 2014), donde se encontró 73.31% de holocelulosa, y superiores a los de Khider (2012) para moringa de Sudán con 68.5%. Tomando en consideración este factor, se infiere que el ecotipo "Sonora" sería más apropiado para ser utilizado en un bioproceso para la producción de etanol, al contar con la mayor proporción de holocelulosa y menor de lignina. Sin embargo, las diferencias que existen entre este ecotipo, "Sinaloa" y "Elota" no son significativas ($p<0.05$), por lo que de ninguna manera se pueden descartar estos últimos. Además, como también se mostró en Cuadro 19, el ecotipo "Sonora" fue el de menor productividad de ramas de todos los estudiados. En cambio, el ecotipo "Mojolo" fue el de mayor producción de biomasa (tallos y hojas), por lo que lo hacen, desde este punto de vista, como el más apropiado para tal propósito.

6 Productividad de biomasa lignocelulósica de tallos

En el Cuadro 23 se presentan los comparativos de las cantidades calculadas por hectárea (densidad de siembra de 1,667 plantas ha^{-1}) de los componentes de la biomasa de 6 ecotipos de *M. oleifera*. Como se aprecia en dicho cuadro, a los 16 meses de la siembra, el mayor rendimiento por hectárea de biomasa lignocelulósica de tallo fue obtenido claramente para el ecotipo "Mojolo" (4,287.6 kg), seguida de "Culiacán" (3,598.8 kg) y "Guerrero" (3,518.8 kg). Para el resto de los ecotipos se obtuvieron rendimientos mucho menores.

Cuadro 22. Proporciones de celulosa, hemicelulosa y lignina de la parte libre de extraíbles de tallo de seis ecotipos regionales de *M. oleifera*

Fracción	Culiacán	Elota	Guerrero	Mojolo	Sinaloa	Sonora	Benítez y col. (2014)[1]	Khider (2012)[1]	Mahmoud (2013)[1,2]
Celulosa	55.87 ± 1.75 a	55.46 ± 0.72 ab	52.12 ± 0.31 c	56.19 ± 0.39 a	54.48 ± 0.82 ab	53.18 ± 0.73 bc	53.85	52.01	65.09
Hemicelulosa	13.88 ± 0.96 c	22.97 ± 1.56 ab	21.71 ± 2.97 ab	17.88 ± 1.97 bc	21.77 ± 0.14 ab	26.30 ± 1.83 a	18.65	17.58	15.04
Lignina	30.25 ± 1.38 a	21.56 ± 1.16 bc	26.17 ± 2.76 ab	25.92 ± 2.34 ab	23.75 ± 0.95 bc	20.52 ± 1.77 c	27.48	30.41	19.86[3]
Holocelulosa	69.75 ± 1.38 b	78.43 ± 1.16 a	73.83 ± 2.76 bc	74.08 ± 2.34 bc	76.24 ± 0.95 ab	79.48 ± 1.77 a	72.50	68.50	80.13

** Obtenidos de la fracción libre de extraíbles (cenizas, carbohidratos solubles, proteínas y lípidos).

*** Suma de celulosa y hemicelulosa. [1] Valores calculados en base a los datos proporcionados por el autor. [2] Ramas jóvenes de moringa. [3] Determinada como lignina detergente ácida (ADL).

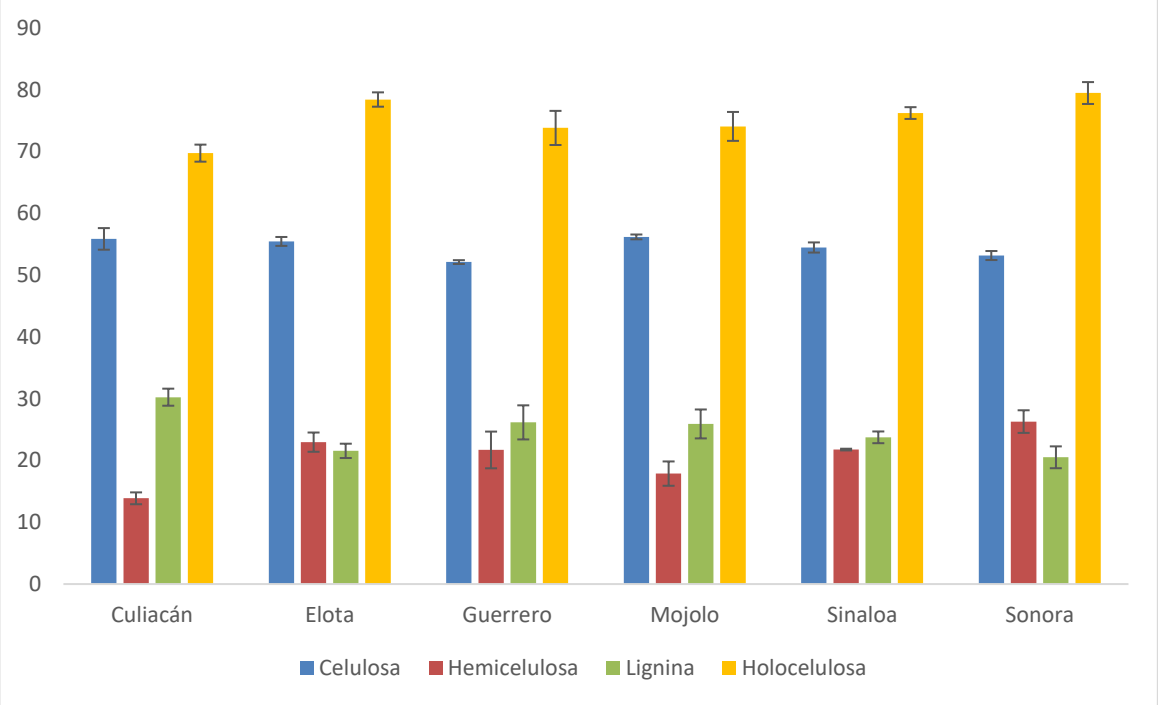


Figura 22. Perfil lignocelulósico de tallo de ecotipos regionales de *M. oleifera*

De la lignocelulosa de los tallos del ecotipo “Mojolo” se obtendrían 2,708.8 kg de holocelulosa, la cual, mediante un proceso de segunda generación, podría rendir 1,384.2 kg de etanol, considerando una conversión de 51.1% (Horisawa y col., 2019). Por otro lado, si se suma el total de la biomasa aérea, para el ecotipo “Mojolo” se obtuvo un total de 6,229.6 kg ha^{-1}. Esta cifra es aproximadamente la mitad de lo reportado por Mendieta-Araica y col. (2012) en Nicaragua, quienes obtuvieron 11,600 kg ha^{-1} a los 18 meses, a una densidad de 100,000 plantas ha^{-1}. Si bien la cifra dada por el autor señalado muy superior a lo obtenido en el presente trabajo, es necesario considerar que en ella está incluida la biomasa total producida en múltiples cosechas, mientras que en el presente trabajo sólo se realizó un corte. También se deben considerar los factores agroculturales y climáticos.También es importante señalar que el objetivo principal del presente experimento no es producir las mayores rendimientos de biomasa, sino el aprovechamiento como coproducto de los residuos lignocelulósicos de un cultivo destinado a la producción de aceite de la semilla.

Así mismo, del Cuadro 23, se deduce que la lignina es el segundo componente en importancia de la lignocelulosa. Ésta es una materia prima infravalorada, ya que prácticamente sólo se ha usado como combustible en la industria papelera. Sin embargo, se han venido desarrollando recientemente aplicaciones de alto valor agregado, tales como termoplásticos (Sadeghifar y col., 2012) y ácidos húmicos (Jeong y col., 2018). Para el caso de la hoja, el ecotipo más productivo fue “Mojolo”, de donde se obtendrían los mayores rendimientos por hectárea de carbohidratos, proteínas y lípidos. Los carbohidratos son los componentes más abundantes en la hoja, destacando nuevamente el ecotipo “Mojolo” con los mayores rendimientos por hectárea. A futuro sería interesante probar la productividad de los ecotipos “Mojolo” y “Guerrero” en la producción de biomasa en un cultivo intensivo en la región Noroeste de México

Cuadro 23. Productividad calculada por árbol y por hectárea de celulosa, hemicelulosa, lignina y holocelulosa de tallos de seis ecotipos de *M. oleifera* al momento de la primera cosecha de semilla

	Composición de la hemicelulosa (%)					Rendimiento por árbol (kg)					Rendimiento por hectárea (kg)					
Ecotipo	Extraíbles[1]	Celulosa[2]	Hemicel[2]	Lignina[2]	Holocel[2]	Tallos	Celulosa	Hemicel.	Lignina	Holocel.	Tallos	Celulosa	Hemicel.	Lignina	Holocel.	Etanol
Elota	14.85	47.23	19.56	18.36	66.78	1.71	0.81	0.33	0.31	1.14	2845.0	1342.8	556.1	522.0	1898.9	970.3
Culiacán	13.68	48.23	11.98	26.11	60.21	2.16	1.04	0.26	0.56	1.30	3598.8	1734.6	430.9	939.2	2165.6	1106.6
Mojolo	14.65	47.96	15.26	22.12	63.22	2.57	1.23	0.39	0.57	1.63	4287.6	2054.9	653.9	947.9	2708.8	1384.2
Guerrero	13.22	45.23	18.84	22.71	64.07	2.11	0.95	0.40	0.48	1.35	3518.8	1590.5	662.5	798.6	2253.0	1151.3
Sinaloa	14.55	46.55	18.60	20.29	65.15	1.74	0.81	0.32	0.35	1.13	2898.4	1348.4	538.8	587.8	1887.3	964.4
Sonora	14.21	47.58	19.71	18.50	67.28	1.39	0.66	0.27	0.26	0.94	2319.7	1103.0	456.8	428.8	1559.8	797.1

[1] Suma de proteínas, lípidos y cenizas del tallo. [2] Valores del cuadro 18, recalculados para expresarlos en porcentajes absolutos en la madera.

7 Productividad de macronutrientes de hojas

En el Cuadro 24 se muestran las cantidades de dichos nutrientes a los 16 meses de la siembra. Como se puede deducir, en orden de concentración, los carbohidratos son los más abundantes, destacando nuevamente el ecotipo “Mojolo”. El resto de los ecotipos presentaron valores muy por debajo de los encontrados para “Mojolo”, del cual teóricamente en un cultivo de 1,666.67 plantas ha^{-1} se obtendrían de la hoja 326.9 kg de carbohidratos, 247.2 kg de proteínas y 76.7 kg de lípidos. En estudios realizados en Nicaragua, Foidl y col. (2001) estimaron que un cultivo intensivo de 1,000,00 de plantas de *M. oleifera* ha^{-1} es capaz de producir 16.8 ton de proteínas, 17.8 ton de azúcares y 4.9 ton de lípidos.

De los macro componentes presentes en las hojas de moringa, las fracciones lipídica y proteica representan las de mayor interés comercial ya que a partir de ellas se pueden obtener alimentos, productos nutracéuticos y medicinales. La riqueza de los nutrientes contenidos en la hoja la hacen una fuente prometedora de alimentos para animales, como lo demuestran trabajos recientes.(Nouman y col., 2014; Oghenebrorhie y Oghenesuvwe, 2016; Al-Juhaimi y col., 2017; Biel y col., 2017; Castillo y col., 2018; Falowo y col., 2018; Gandji y col., 2018). En el caso del uso de la hoja para la alimentación humana, también se han realizado diversos estudios, encontrándose que es una opción interesante para ese propósito, siendo utilizada principalmente en la suplementación de alimentos como panes, galletas, sopas y productos cárnicos, lográndose incrementos en los valores nutricionales de los mismos y buena aceptabilidad por parte de los consumidores (Liu y col., 2011; Al-Juhaimi y col., 2015; Devisetti y col., 2016; Gopalakrishnan y col., 2016; Glover-Amengor y col., 2017).

Si bien es cierto que los carbohidratos no representan una fracción tan atractiva económicamente, no debe desdeñarse su posible aplicación en procesos biotecnológicos. Así mismo, de los azúcares contenidos en la biomasa se podrían obtener hasta 20,000 litros ha^{-1} de etanol.

Cuadro 24. Productividad calculada por árbol y por hectárea de lípidos, proteínas y carbohidratos de hojas de seis ecotipos de *M. oleifera* a los 16 meses

	Rendimiento por árbol (kg)				Rendimiento por hectárea (kg)				
Ecotipo	Hoja seca	Lípidos	Proteínas	Carbohidratos	Hoja seca	Lípidos	Proteínas	Carbohidratos	Etanol
Culiacán	0.261	2.281	7.632	10.503	435.3	38.0	127.2	175.0	89.4
Elota	0.248	1.510	7.529	10.421	413.6	25.2	125.5	173.7	88.8
Guerrero	0.330	2.732	9.547	14.573	550.3	45.5	159.1	242.9	124.1
Mojolo	0.502	4.603	14.829	19.613	837.2	76.7	247.2	326.9	167.0
Sinaloa	0.209	1.827	6.243	8.312	348.5	30.4	104.0	138.5	70.8
Sonora	0.223	1.699	5.553	10.702	371.9	28.3	92.5	178.4	91.1

8 Productividad de macronutrientes de semilla

Los macronutrientes de mayor interés en la semilla descascarada son los lípidos y las proteínas. En el Cuadro 25 se presentan los cálculos de los rendimientos obtenidos por hectárea de estos dos componentes nutrimentales. Como se desprende de este cuadro, el ecotipo “Sinaloa” es el de mayor productividad de proteína y aceite provenientes de la semilla. Esto es debido principalmente a la gran productividad de semilla descascarada, pues este ecotipo alcanzó una producción de 508 kg ha^{-1} de semilla descascarada a los 480 días, que se traducen en 230 kg ha^{-1} de aceite y 171 kg de proteína. Para el caso del aceite, estos valores son ligeramente inferiores a los reportados por Ayerza (2012), quien obtuvo 268 kg ha^{-1} en árboles de moringa de más de dos años de la variedad PKM-1, mientras que en este trabajo se trató de un cultivo de sólo 16 meses. La intensidad de cultivo utilizada por el autor citado anteriormente fue exactamente la misma del presente experimento. Es importante señalar que del aceite de la semilla de moringa se pueden obtener, aparte de biodiésel, compuestos de alto valor agregado como tocoferoles y carotenoides (Anwar y col., 2007; Raman y col., 2017). La pasta de la semilla desgrasada se podría aprovechar como fuente de proteínas en alimentos para animales y humanos (Ogunsina y col., 2010). Como se verá en la cuarta sección de este trabajo de investigación, se demuestra la posibilidad del uso de la semilla desgrasada de *M. oleifera* en la alimentación de aves (*Coturnix japonica japonica*).

Cuadro 25. Productividad de proteínas y lípidos por árbol y por hectárea de las semillas descascaradas de seis ecotipos de *M. oleifera*

	Composición (%)		Rendimiento por árbol (kg)			Rendimiento por Ha (kg)		
Ecotipo	Proteínas	Lípidos	*Kernel*	Proteínas	Lípidos	*Kernel*	Proteínas	Lípidos
Elota	31.51	48.23	0.170	0.054	0.082	283.34	89.28	136.65
Culiacán	36.95	42.63	0.175	0.065	0.075	291.67	107.77	124.34
Mojolo	35.18	41.73	0.196	0.069	0.082	326.67	114.92	136.32
Guerrero	32.77	40.62	0.096	0.031	0.039	160.00	52.43	64.99
Sinaloa	33.61	45.22	0.305	0.103	0.138	508.34	170.85	229.87
Sonora	36.91	40.75	0.112	0.041	0.046	186.67	68.90	76.07

9 Selección de ecotipos de *M. oleifera* para biomasa y aceite

En la Figura 23 se presentan un resumen de los totales acumulados de las distintas fracciones químicas de la biomasa aérea de los 6 ecotipos estudiados. En base a dichos resultados se puede deducir que para las condiciones climáticas de la región (Municipio de Culiacán, Sinaloa), el más productivo en proteínas en hoja es sin duda “Mojolo”, siendo además el segundo en producción de semilla y aceite, por lo que bien podría ser considerado interesante para un cultivo multipropósito.

En cuanto a la producción de semilla y aceite, el ecotipo más productivo de los estudiados resultó el ecotipo “Sinaloa”.

Respecto al porcentaje de aceite contenido en la semilla, el ecotipo “Elota” fue el de mayor proporción, sin embargo, en términos de rendimiento no fue tan alto como “Sinaloa”.

Por lo anterior sería de gran interés realizar experimentos de hibridación entre los ecotipos anteriores con el fin de obtener variedades que sumen las mejores características de sus progenitores.

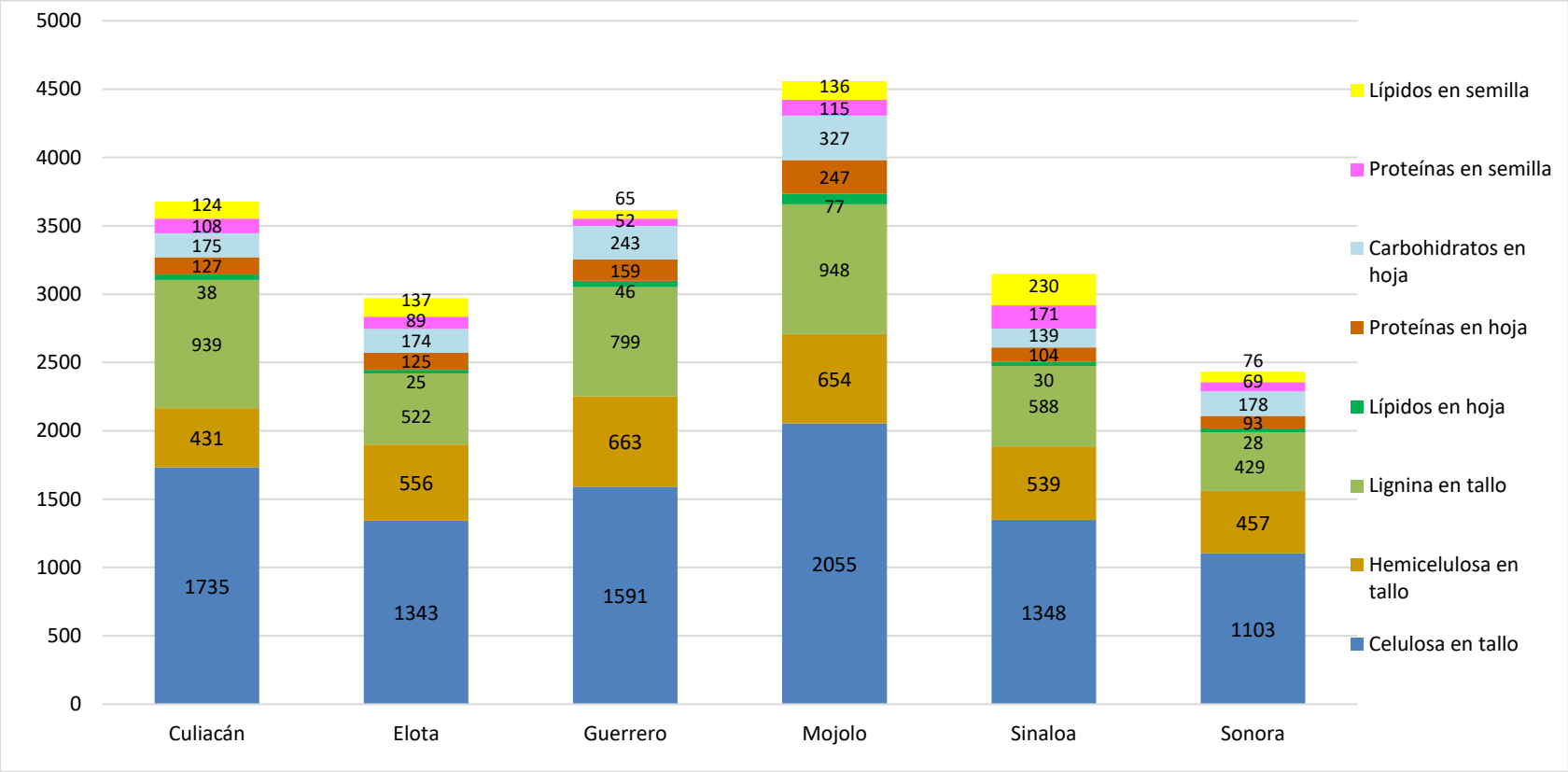


Figura 23. Rendimientos por hectárea (kg) de los principales componentes químicos de tallo, hoja y semilla de ecotipos de *M. oleifera* a los 16 meses

B PRODUCCIÓN ENZIMÁTICA Y DE ETANOL DE HONGOS NATIVOS EN *Moringa oleifera*

1 Recolección

a Primera etapa de recolección

En el Cuadro 26 y Figuras 24 y 25 muestran las características morfológicas de las cepas aisladas, así como los lugares de recolección y los sustratos donde fueron encontradas. Se encontraron un total de 49 carpóforos de los cuales se aislaron 6 basidiomicetos y 13 ascomicetos, 12 de estos últimos encontrados en la madera de moringa. La baja sobrevivencia mostrada se debió probablemente al uso de etanol al 70% e hipoclorito de sodio durante el aislamiento. La cepa C1502, proveniente de un carpóforo seco de *Ganoderma* sp. inicialmente fue clasificada como basidiomiceto, pero posteriormente se reclasificó como el ascomiceto *Mucor circinelloides* (Figura 25). El 68% de las cepas fueron aisladas de tallo de *Moringa oleifera*, el 16% fue aislado de madera de naranjo próxima a los cultivos de moringa, un 10% fue recolectado de material leñoso de otras especies de árboles alrededor del cultivo de moringa. En aislamientos hechos a partir de madera de moringa en México se encontraron cepas de *Penicillum funiculosum*, *Cladosporium cladosporioides y Fusarium verticillioides* con gran capacidad de producción de celulasas (Vázquez y col., 2019). También se ha reportado evidencias del ataque de *Alternaria* sp., *Curvularia* sp., *Fusarium* sp. y *Cladosporium* sp. en plántulas de *M. oleifera* (Lezcano y col., 2014), por lo que se puede afirmar que los géneros y especies mencionados están bien adaptados a crecer o a descomponer madera de esa planta. De las 13 cepas de ascomicetos aisladas, la identificación morfológica de esporas y colonias mostró que fueron de los géneros *Cladosporium* (C1a y C1b), *Aspergillus* (C3a, C3b y C3c y C3d), *Penicillum* (C5a y C5b), *Fusarium* (C6a y C7a), *Curvularia* (C7b), *Alternaria* (C7a) y *Mucor* (C1502). De éstos, como se verá más adelante, solamente fueron identificados molecularmente las cepas C6a, C7a y C1502, por su mayor conveniencia para ser utilizados en un CBP ya que demostraron tener una mayor capacidad de producción de etanol.

Cuadro 26. Cepas fúngicas recolectadas de material lignocelulósico en diferentes sitios del Estado de Sinaloa (primera etapa)

Cepa	Genero/especie	Fecha	Lugar	Coordenadas	Sustrato
C1a	*Penicillum* sp.	22-05-15	Rancho Tecolotes	24°59'0.66"N 107°22'57.94"O	Madera de *M. oleifera*
C1b	*Penicillum sp.*	22-05-15	Rancho Tecolotes	24°59'0.66"N 107°22'57.94"O	Madera de *M. oleifera*
C3a	*Aspergillus* sp.	22-05-15	Rancho Tecolotes	24°59'0.66"N 107°22'57.94"O	Madera de *M. oleifera*
C3b	*Aspergillus* sp.	22-05-15	Rancho Tecolotes	24°59'0.66"N 107°22'57.94"O	Madera de *M. oleifera*
C3c	*Aspergillus* sp.	22-05-15	Rancho Tecolotes	24°59'0.66"N 107°22'57.94"O	Madera de *M. oleifera*
C3d	*Aspergillus niger*	22-05-15	Rancho Tecolotes	24°59'0.66"N 107°22'57.94"O	Madera de *M. oleifera*
C5a	*Penicillum* sp.	22-05-15	Rancho Tecolotes	24°59'0.66"N 107°22'57.94"O	Madera de *M. oleifera*
C5b	*Penicillum* sp.	22-05-15	Rancho Tecolotes	24°59'0.66"N 107°22'57.94"O	Madera de *M. oleifera*
C6a	*Fusarium equiseti*	22-05-15	Rancho Tecolotes	24°59'0.66"N 107°22'57.94"O	Madera de *M. oleifera*
C7a	*Fusarium verticillioides*	22-05-15	Rancho Tecolotes	24°59'0.66"N 107°22'57.94"O	Madera de *M. oleifera*
C7b	*Curvularia* sp.	22-05-15	Rancho Tecolotes	24°59'0.66"N 107°22'57.94"O	Madera de *M. oleifera*
C7c	*Alternaria* sp.	22-05-15	Rancho Tecolotes	24°59'0.66"N 107°22'57.94"O	Madera de *M. oleifera*
C1502	*Mucor circinelloides*	14-08-15	Elota, Sin	23°58´34.2”N 106°43´01.7”O	*Ganoderma* muerto en guaje (*Leucaena*)
C1503	*Trametes* sp.	14-08-15	Elota, Sin	23°58´34.2”N 106°43´01.7”O	Madera de *M. oleifera*
C1504	*Trametes* sp.	16-02-16	Rancho Tecolotes	24°59'0.66"N 107°22'57.94"O	Madera naranjo (*Citrus sinensis*)
C1505	*Pycnoporus sanguineus*	14-08-15	Rancho Tecolotes	24°59'0.66"N 107°22'57.94"O	Madera naranjo (*Citrus sinensis*)
C1506	*Trametes* sp.	14-08-15	Elota	23°58´34.2”N 106°43´01.7”O	Madera de *M. oleifera*
C1507	*Trametes* sp.	14-08-15	Elota, Sin.	23°58´34.2”N 106°43´01.7”O	Madera de *M. oleifera*
C1508	*Pleurotus* sp.	14-08-15	Higueras de Urrea	24°25'49.33"N 106°41'34.63"O	Madera de arroyo

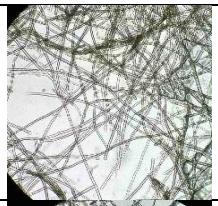
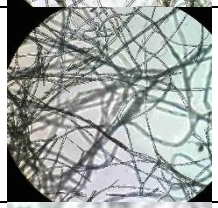
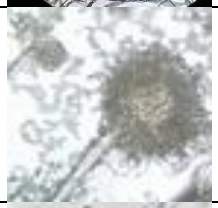
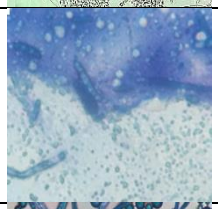
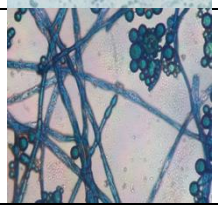
Cepa	Especie identificada	Cultivo PDA	Microscopio (40x)
C1a	*Penicillum* sp.		
C1b	*Penicillum* sp.		
C3a	*Aspergillus ochraceus*		
C3d	*Aspergillus niger*		
C5a	*Penicillium* sp.		
C6a	*Fusarium equiseti*		
C7a	*Fusarium verticillioides*		
C1502	*Mucor circinelloides*		

Figura 24. Cultivo en PDA y vista al microscopio (40X) de hongos ascomicetes de la primera etapa de recolección

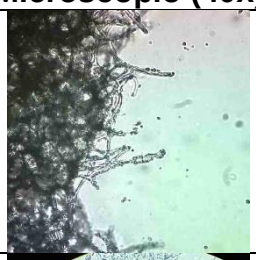
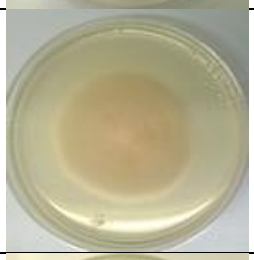
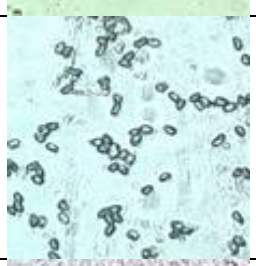
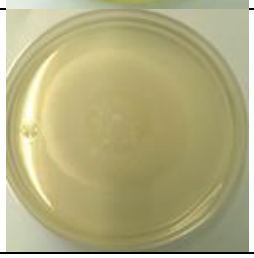
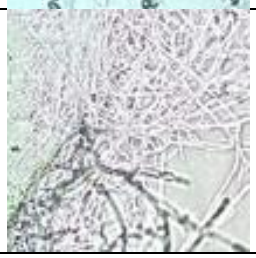
Cepa	Basidiocarpo	Cultivo PDA	Microscopio (40x)
1503 *Trametes* sp.			
1504 *Trametes* sp.			
1505 *Pycnoporus sanguineus*			
1506 *Trametes* sp.			
1507 *Trametes* sp.			
1508 *Pleurotus* sp.			

Figura 25. Carpóforos, cultivo en PDA y vista al microscopio (40X) de hongos basidiomicetes de la primera etapa de recolección

b Segunda etapa de recolección

En el Cuadro 27 se señalan las cepas aisladas, los sitios y coordenadas de los lugares de donde se recogieron, así como los sustratos de donde fueron obtenidas. Para la segunda recolección, todos los hongos fueron aislados a partir de los cuerpos fructíferos. Se lograron aislar en total 9 basidiomicetes, de ellos, las cepas *Coriolopsis occidentalis* Coc-2, *Pleurotus opuntiae* Ppu y *Pycnoporus sanguineus* Pyc provenían de madera de moringa y el resto de otros árboles. A diferencia de la primera etapa de recolección, en ésta todos los microorganismos que se recolectaron se lograron cultivar en PDA. Para ello se prescindió del uso de etanol e hipoclorito de sodio, recurriendo a una disección directa y extracción de un trozo pequeño del interior del carpóforo.

2 Identificación morfológica

Enseguida se hace una descripción de las características morfológicas de las especies de hongos identificados.

a *Trametes polyzona* (Coc-1 y Coc-2)

T. polyzona (Sin. *Coriolopsis occidentalis*) (cepas Coc-1 y Coc-2) presentaron las siguientes características. Basidiocarpos anuales, pileados y sésiles, algunos resupinados; píleo aterciopelado a hirsuto, más raramente sin pelos, zonados a azonados, amarillentos a pardo oscuro (Fig. 26a, 26d), algunos grisáceos cuando son hirsutos; superficie de poros concoloros, en algunas especies con una floración grisácea a azul, poros redondos a enteros, pequeño a moderadamente grande; contexto dorado a marrón oscuro, no delimitado claramente hacia la cubierta pilear; sistema de hifas trimítico; hifas generativas hialinas (Figura 26c, 26f), de paredes delgadas, con pinzas; hifas esqueléticas de paredes gruesas a sólidas, cianófilas, hialinas, de color ocráceo a marrón dorado intenso; unión de hifas de paredes gruesas y concoloro con hifas esqueléticas, cistidios ausentes; esporas hialinas, cilíndricas a oblongas-elipsoides, lisas, de paredes delgadas. Contexto de canela a marrón oscuro. Basidiocarpos más gruesos de 3 mm, coriáceos a duros, superficie superior de color blanco rojizo, amarillento a pardo grisáceo, tomentoso a hirsuto.

Cuadro 27. Cepas de basidiomicetes de la segunda etapa de recolección en diferentes sitios del Estado de Sinaloa

Cepa	Genero/especie	Fecha	Lugar	Coordenadas	Sustrato
Coc-1	*Trametes polyzona*	7-11-18	Elota, Sin.	23°58´34.2”N 106°43´01.7”O	Madera de bolillo (*Hesperalbizia occidentalis*)
Coc-2	*Coriolopsis occidentalis*	9-11-18	Tepuche, Culiacán, Sin.	24°56'0.78"N 107°21'42.75"O	Madera de *Moringa oleifera*
Gap	*Ganoderma oregonense*	7-11-18	Elota, Sin.	23°58´34.2”N 106°43´01.7”O	Madera de vinolo (*Acacia cochliacantha*)
Gst	*Lenzites betulina*	7-11-18	Tecorito, Culiacán, Sin.	24°59'11.25"N 107°23'22.32"O	Madera de guamúchil (*Pithecellobium dulce*)
Hhy-1	*Hexagonia hydnoides*	7-11-18	Elota, Sin.	23°58´34.2”N 106°43´01.7”O	Madera de eucalipto (*Eucalyptus melliodora*)
Hhy-2	*Hexagonia hydnoides*	7-11-18	Tecorito, Culiacán, Sin.	24°59'11.25"N 107°23'22.32"O	Madera de guásima (*Guazuma ulmifolia*)
Ppu	*Pleurotus opuntiae*	9-11-18	Tepuche, Culiacán, Sin.	24°56'0.78"N 107°21'42.75"O	Madera de *M. oleifera*
Phe	*Fuscoporia mesophila*	7-11-18	Tecorito, Culiacán, Sin.	24°59'11.25"N 107°23'22.32"O	Madera de vinolo (*Acacia cochliacantha*)
Pyc	*Pycnoporus sanguineus*	9-11-18	Tepuche, Culiacán, Sin.	24°56'0.78"N 107°21'42.75"O	Madera de *Moringa oleifera*

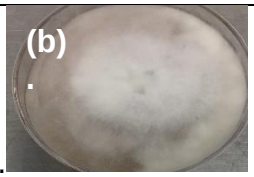
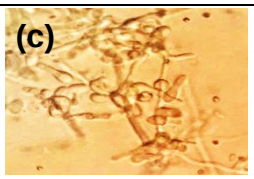
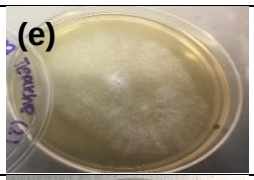
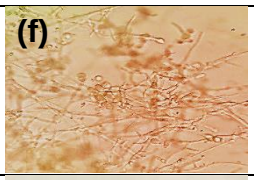
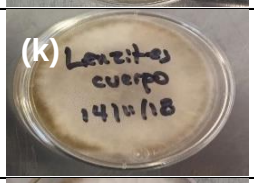
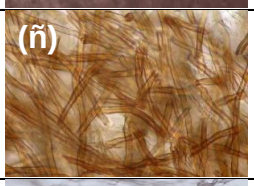
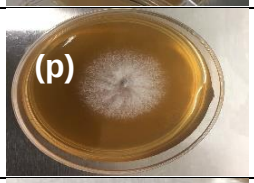
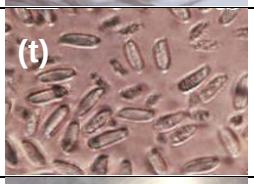
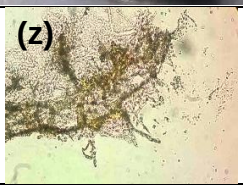
Cepa	Basidiocarpo	Cultivo en PDA	Estructuras
Coc-1 *Trametes polyzona*			
Coc-2 *Coriolopsis occidentalis*			
Gap Ganoderma oregonense			
Gst Lenzites betulina			
Hhy-1 *Hexagonia hydnoides*			
Hhy-2 *Hexagonia hydnoides*			
Ppu *Pleurotus opuntiae*			
Phe *Fuscoporia mesophila*			
Pyc *Pycnoporus sanguineus*			

Figura 26. Hongos basidiomicetes de la segunda etapa de recolección. En la primera columna se muestran los basidiocarpos; en la segunda el cultivo en PDA; en la tercera, estructuras vegetativas y/o esporas características

Basidiocarpo coriáceo, poros angulares a redondos, basidiocarpo raramente por encima de 1 cm de espesor. Píleo tomentoso a hirsuto en colores amarillentos a pardos. Píleo, tubos y contexto marrón dorado a ocráceo oscuro, superficie de los poros uniformemente marrón amarillento a marrón pálido. Coloración blanca de micelio en PDA. En el cultico en medio sumergido con *M. oleifera* presentó estructuras parecidas a clamidosporas (Figuras 26c y 26f). En este punto, la diferencia que existió entre la cepa Coc-1 y Coc-2 consistió, en que, en la primera, dichas estructuras se separaban de las hifas dando lugar aparentemente a esporas verdaderas (Figura. 26c), mientras que, en la segunda, permanecían unidas a ellas (Figura 26f). Estas últimas son similares a las reportadas por Lueangjaroenkit y col. (2018). Es interesante señalar que no hay consenso sobre la clasificación de esta especie. Algunos autores la mencionan como *Trametes polyzona*, otros como *Coriolopsis polyzona* y otros como *C. occidentalis* (Gilbertson y Ryvarden, 1986; Valenzuela-Garza, 2000; Valenzuela y col., 2002; Ryvarden, 2004; Raymundo y col., 2015; Valenzuela y col., 2016). Probablemente, se trate de dos especies diferentes y sería de gran interés un estudio molecular de las dos cepas para aclarar esta duda (Valenzuela-Garza, 2020, comunicación personal).

b *Ganoderma oregonense* (Pers.).

Las características que se consideraron para la identificación morfológica de esta especie se tomaron de Torres-Torres y col. (2015), y que a continuación se describen (Figuras 26 g-i). Basidioma de 7-23 × 10-30 cm y hasta 12 cm de espesor, anual, principalmente sésil a subestipado, generalmente con base contraída, simple o rara vez imbricado, suave cuando está fresco, muy ligero en peso en seco. Píleo redondeado-flabeliforme, superficie mate a semibrillante con restos de brillo, con costra lacada, agrietado después del secado pero difícil de eliminar, ligeramente azonado; marrón rojizo oscuro a casi negro cerca de la base, luego marrón violeta a henna, más clara en la periferia, algunos ejemplares completamente de color negro rojizo, como en el caso del ejemplar analizado en este estudio; margen más claro que la base a concoloro, espeso. Subestípite de 4-13 × 4-4.5 cm, cilíndrico, negro rojizo, más oscuro que el píleo. Contexto 2.4-11.3 cm de

grosor, corchoso suave, dúplex, azonado, blanco anaranjado, marrón claro o quemaduras solares a siena cruda cerca de los tubos, con una franja fina color albaricoque debajo de la corteza lacada, sin bandas resinosas. Poros de 3-4 por mm, blanco amarillentos; tubos de 0.3-0.6 cm de espesor, estratificados a no estratificados, frágiles, color marrón violáceo claro, casi concoloreado con la parte inferior del contexto. Sistema hifal trimítico. Hifas generativas de 2.5 a 5.5 µm de diámetro, conexiones con fíbulas conspicuas. Hifas esqueléticas de 2-10 µm de diámetro, paredes gruesas, algunas con lumen estrecho, no tabicado o tabicado cerca del ápice, no ramificado a arboriforme. Unión de hifas de 3-8 µm de diámetro, de paredes gruesas. Pileipellis tipo crustohimenidermo, células de 44-102 × 6.5-20 µm de diámetro, estrecho a ampliamente clavado, con abrazaderas basales llamativas, sin protuberancias o solo una uno, de paredes gruesas. Basidiosporas 10.8-14.4 × 7.2-9.6) µm, Q = 1.5-1.78, de elipsoide a oblongo, ápice subagudo, sin poro germinal apical visible, solo observado en basidiosporas inmaduras; exosporios con pilares entre paredes de 0.6-0.8 µm de espesor, sublibres. Basidios 24-40 × 7-9 µm, claviformes, hialinos. Cistidios en el himenio 16-28 × 3-5.5 µm, fusiforme a estrechamente utriforme, algunas con escasas protuberancias, de paredes delgadas, hialinas a amarillentas.

c *Lenzites betulina* (L.)

Este hongo fue primeramente etiquetado como *Gloeophyllum striatum* (Gst), un hongo de pudrición parda, pero un análisis a fondo indicó que se trataba del hongo de pudrición blanca *L. betulina*. La colonia forma una estera micelial muy espesa y densa, blanca, con bordes lisos, algodonosa en el medio, más o menos lisa, sedosa en el borde (Figura 26k). En las paredes se forma un anillo micelial algodonoso suave, de 0.5 cm de espesor, 1 cm de alto, con borde denticulado, a veces crema. El sistema hifal es dimítico. El micelio sumergido y de la zona de avance presenta hifas generativas, ramificadas, septadas, con conexiones fíbulas hialinas, de 2.2 a 4.5 µm de diámetro. Micelio aéreo presente hifas generativas e hifas esqueléticas muy numerosas, hialinas, paredes gruesas refringentes y con lúmina estrecha, sin septos, ocasionalmente ramificados, de 1,5-3 (4) µm de diámetro. La descripción

anterior del cultivo coincide plenamente con lo publicado por Petre y Tănase (2013). Esta especie ha sido previamente reportada en varios estados del país (Valenzuela y col., 2002)

d *Hexagonia hydnoides* (Sw.) M. Fidalgo

Basidioma anual, raramente perenne, sésil, pileado, de color oscuro, casi negro, estrechamente unido al sustrato por una porción pilear gruesa y pequeña de 20-85 x 23-50 x 7-10 mm. Consistencia más flexible y coriácea en fresco, rígida al secarse. Píleo dimidiado a flabeliforme, convexo o plano, superficie superior de color marrón oscuro a casi negro, al principio densamente cubierto con pelos ramificados oscuros de hasta 6 mm de largo, erectos o postrados, que pronto se caen por completo o en zonas concéntricas, rara vez glabras, pero a menudo brillantes. Margen fino, agudo, entero o ligeramente inciso y lobulado, concoloreado con la superficie. Capa de poros ocre a marrón oscuro con un tinte grisáceo distintivo, poros redondos a algo irregulares, 3-4 por mm, diseminación gruesa y entera, tubos pruinosos, marrón a gris, de una sola capa, ocasionalmente con algunas capas indistintas 0.1-1 cm de largo. Contexto marrón canela a marrón oscuro, de 1-10 mm de espesor, pero generalmente muy fino. Hifas generativas hialinas, de paredes finas y con pinzas, 2-2.5 µm de ancho, hifas esqueléticas de amarillo a marrón pálido, de paredes gruesas, a veces con pocos tabiques simples secundarios, de 3-6 µm de ancho. Unión de hifas hialinas a amarillentas con paredes ligeramente engrosadas, de 1.5-2.5 µm de diámetro débil a fuertemente ramificado. Los pelos pileares están dominados por hifas esqueléticas paralelas de color marrón amarillento. Cistidios con hifas cistoides y pseudosetas ausentes. Esporas cilíndricas, hialinas, lisas y de paredes delgadas 11-13.5 x 3.5-4.5 µm, no amiloideas.

e *Fuscoporia mesophila*

Estos especímenes, inicialmente clasificados como *Phellinus* sp. (Phe) fueron posteriormente identificados morfológicamente como *F. mesophila*, de acuerdo a la información obtenida de Raymundo y col. (2013). Es un hongo que habita en México en las zonas boscosas de varios estados. En el estado de g no ha sido reportado. Dentro de sus principales características, de

encontró que posee basidioma perenne, de 40-150 × 20-80 × 10-50 mm, triquetro a conchado, entre pileado y sésil, algunos especímenes imbricados, bien adheridos al substrato. La consistencia es leñosa y muy dura cuando está seco. El píleo es convexo, semicircular, marrón en el margen en las partes jóvenes y marrón dorado a marrón grisáceo cuando maduro y marrón oscuro cuando viejo; glabrescente cuando viejo o hacia la base, zonado a sulcado, con surcos concéntricos bien definidos con la edad. Margen estéril, de color marrón dorado, marrón brillante a marrón canela, agudo a obtuso, velutino, ondulado. Himenóforo poroide, de marrón amarillento a marrón oscuro, iridiscente (Figura 26w); poros circulares, de 6-8 poros por mm, bordes enteros y gruesos, velutinos; tubos de hasta 15 mm de profundidad, concoloros alosporos, rellenos de micelio amarillento. Contexto simple leñoso de hasta 15 mm de grosor de color marrón mostaza a marrón. Sistema hifal dimítico, con hifas generativas de 2.4-3.2 mm de diámetro, sinuosas a rectas con septos simples, hialinas, amarillentas a marrón amarillenta, algunas bifurcadas, con paredes delgadas y se entrelazan; hifas esqueléticas de color marrón óxido con paredes gruesas de 0.8-1.6 mm de grosor, con lumen amplio, no ramificadas, de 3.2-4 mm de diámetro. Hifas del septo y la trama con cristales incrustados. Setas himeniales de 28-40 × 6.4-8.8 mm, angostamente subuladas, marrón amarillento, con paredes gruesas de 1.6-4 mm de grosor, con ápices rectos y agudos. Basidios no observados. Basidiosporas de 4-4.8 × 3.2-4 mm, subglobosas a ovoides, hialinas, lisas, con pared delgada. En cultivo produce un micelio marrón amarillento, como las setas.

f *Pleurotus opuntiae* (Durieu & Lev.) Sacc.

Para la identificación morfológica de esta especie se consultó principalmente a Zervakis y col. (2018) quienes la describen con las características enseguida detalladas, la mayoría de las cuales se pudieron corroborar en los ejemplares que se colectaron. Aunque el sustrato en que normalmente se encuentra en su medio natural son cactáceas (de allí su nombre), puede infectar madera de otros árboles, como en el caso del presente trabajo, que fue aislado de *M. oleifera*. Suele confundirse con *P. djamor* con el cual está estrechamente relacionado genéticamente, y en menor

grado, con *P. pulmonarius* (Zervakis y col., 2018). Basidiomas gregarios, cespitosos o imbricados; píleo de 5 a 10 cm, aconchado, reniforme o flabeliforme, inicialmente convexo y después aplanado a cóncavo, margen levemente involucionado; blanquecino, luego crema o beige, radialmente fibrilosa adpresa a escamosa; cutícula parcialmente separable. Lamelas profundamente decurrentes, onduladas, con laminillas anastomosadas cerca del tallo, de color blanco y luego crema a crema amarillento, apiñadas, ancho 1-2 mm. Estípite rudimentario, corto, excéntrico o lateral, blanquecino, luego crema o beige. Carne tierna, luego fibrosa, blanca; olor débil, fungoide; sabor suave. Blanco con estampado de esporas. Sistema hifal dimítico; hifas generativas de 3-6.5 mm de diámetro, hialinas, de paredes delgadas a ligeramente gruesas (hasta 1 mm de espesor), con fíbulas numerosas y prominentes, moderadamente ramificadas, apretadas entretejidas en la trama de píleo y estípite; hifas esqueléticas de 3-5 mm de diámetro, aseptadas y poco ramificadas, hialinas, paredes gruesas (hasta 2.5 mm), sólidas, progresivamente (con la edad) dominantes en la trama del píleo y estípite, generalmente presentes en la trama de las laminillas, la cual es irregular. Basidiosporas de 10.1 x 4.6 µm en promedio, de elipsoide-oblongas, hialinas, de paredes delgadas, no amiloide o dextrinoide, apéndice hilar lateral, corto e indistinto, con depresión suprahilar poco profunda. Basidios 25-42 y 6 a 8 µm, claviformes delgados a subcilíndricos. Pleurocistidios ausentes; sin embargo, se observaron basidioles fusoides ligeramente proyectados. Laminillas con borde estéril, queilocistidios (pseudocystidia) que surgen de tramal de hifas generativas, 19-44 y 6-9.5 mm, en grupos, muy variable en forma, más a menudo subcilíndrica a subclava, de lo contrario obovadas a utriforme o piriforme, y luego hasta 19 mm de ancho, o polimórfico, curvado, rostrado con excrecencias digitiformes; hialino, de paredes delgadas a paredes ligeramente gruesas, sujetado en la base. Pileipellis con cutis delgado de hifas periclinales, con ápices cilíndricos 37 mm de diámetro, en el disco parcialmente ascendente y tortuoso y sujetado.

g *Pycnoporus sanguineus* (L.) Murrill, Bull. Torrey

Basidioma de 20-60 x 22-30 x 1-3 mm., anual sésil. Píleo en los especímenes viejos de color anaranjado rojizo a casi blanco. Himenóforo de color anaranjado rojizo (Figura 26x). Contexto de 2mm. de grosor, de colores blanco, rosa-anaranjado. En cultivo, un fuerte color naranja a rosado salmón es similar al color del basidioma (Figura 26y). Esta es una característica muy importante para el fácil reconocimiento de las especies en cultivo. Nuestros resultados concuerdan con los presentados por Nobles (1965), Bettucci y Guerrero (1971) y Wright y Deschamps (1975). Neves (1998) observó la formación de clamidosporas y cristales romboides cerca de la superficie de la estera, características ausentes en los cultivos estudiados en este trabajo.

3 Identificación molecular

a Ascomicetos productores de etanol

Para la identificación molecular, el ADN de cada aislado se analizó mediante PCR utilizando los cebadores universales ITS1 e ITS4 que amplifican fragmentos de aproximadamente 500 pb de tamaño.

1) Cepa C6a

Los amplicones completos obtenidos por el iniciador ITS1 e ITS4 para la cepa *Fusarium equiseti* C6a son los siguientes:

ITS1

```
TTGGCTCGAGTCACTCCAACCCCTGTGACATACCTATACGTTGCCTCGGCGGATCAGCCCGCGCCCCGTAAAACGGGACG
GCCCGCCCGAGGACCCCTAAACTCTGTTTTTAGTGGAACTTCTGAGTAAAACAAACAAATAAATCAAAACTTTCAACAAC
GGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATC
GAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCAG
CTTGGTGTTGGGACTCGCGGTAACCCGCGTTCCCCAAATCGATTGGCGGTCACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTAATCAT
ACACCTCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCCGTAAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATA
CCCGCTGAACTTAAGCATATCAAAAGCCGGAGGAGAACTCATTACGAGTTTACAACTCCCACACCCTGTGAACATACTAT
ACTTGGCCCCGCGGAACGCCGCCCCGTAAAAGGGAGGCCGCCGAGGGACCCTAAACTCTGTTTTTAGTGGAACTTCTGAG
TAAAACAACAAATAAATCAAAACTTTCAACAACGGACTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCACATAATGCGATGAG
TAATGTGAATTGCAGAAAGTCGTGGAATCAGCGAAATCTCTGTACGCACATTGCGACCGCCAGCTAGTTCTTGGGGGGCA
TGCTGTTCGAGCGTCTTTGCACTCTCATCATCGTGGGTTGTTGTGGACTCGGCTGGAACCCGTCTTCAAGTCGATTAGGG
AGGGTCAGCGCGTCTCTATAACGAATGAAATATAGAACCGCTCATGTGGTGATCTGCCGGCCTCCCACCAATTACCGAGT
AGTCGTAGTAGCTGTGTGAGTACCGCTGGATATGAACG
```

ITS4

```
ATGACTGGCATCTACTGATCCGAGGTCACATTCAGAAGTTGGGGTTTTACGGCGTGGCCGCGACGATTACCAGTAACGAG
GTGTATGATTACTACGCTATGGAAGCTCGACGTGACCGCCAATCGATTTGGGGAACGCGGGTTACCGCGAGTCCCAACAC
CAAGCTGAGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAG
ATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAG
ATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTTATTTGTTTGTTTTACTCAGAAGTTCCACTAAAAACAGAGTTTAGGGGTCCTCGGGC
GGGCCGTCCCGTTTTACGGGGCGCGGGCTGATCCGCCGAGGCAACGTATAGGTATGTTCACAGGGGTTTGGGAGTTGTAA
ACTCGGTAATGATCCCTCCGCAGGTACCCCTTACGAGAAAATCATTACCGAGTTTAAACTCCCAAACCCTGTGAACATAC
CTTTACATTGCCGGGCGGAACACCGCCCCGTAAAAGGGACGGCCGCCCGAGGACCCTAAACTCTGTTTTTAGTGGAACTT
CTGAGTGAAAACAACAAATAAATCAAACTTTCAACAACGGACTTGGTTCTGGCATCGATAAGAAGCACGGAATGCGATAG
TAATGTGAATTGCAGAACTCAGTGAATCACGTAGCTGTGAACGCAATGCGCGCGGTATTCTGGCGGGCATGCGATTCGAA
GCGTCATTTCAACCTACGCCTCGACTTGGGTGGTGGGACTGCGGGTGACCGGCTTACAACATCGATTGGCGTTACTTCGC
GTCCTGCGGGATAATGATACCACTCGATGTCTGTATGCGTCGTAGGAATGCAACAGGTAGCTTGGAATGGGTTGACACTC
GTACTCAGCATGCAAGTCGGAGAGATCTGT
```

Los amplicones editados mediante *Editseq* produjeron la siguiente secuencia consenso ITS1, 5.8S rARN e ITS2 de 493 nucleótidos, la cual fue depositada en el banco de genes del NCBI con el número de acceso MN128958:

```
TCCGTAGGTG AACCTGCGGA TACCTATACG TTGCCTCGGC GGATCAGCCC GCGCCCCGTA
AAACGGGACG GCCCGCCCGA GGACCCCTAA CTCTGTTTTT AGTGGAACTT CTGAGTAAAA
CAAACAAATA AATCAAAACT TTCAACAACG GATCTCTTGG TTCTGGCATC GATGAAGAAC
GCAGCAAAAT GCGATAAGTA ATGTGAATTG CAGAATTCAG TGAATCATCG AATCTTTGAA
CGCACATTGC GCCCGCCAGT ATTCTGGCGG GCATGCCTGT TCGAGCGTCA TTTCAACCCT
CAAGCTCAGC TTGGTGTTGG GACTCGCGGT AACCCGCGTT CCCCAAATCG ATTGGCGGTC
ACGTCGAGCT TCCATAGCGT AGTAATCATA CACCTCGTTA CTGGTAATCG TCGCGGCCAC
GCCGTAAAAC CCCAACTTCT GAATGTGACC TCGGATCAGT AGATGCCAGT CATGCATATC
AATAAGCGGA GGA
```

2) Cepa C7a

Los amplicones completos obtenidos por los iniciadores ITS1 e ITS4 para *Fusarium verticillioides* C7a son:

ITS1

```
GCGACGCTTGTCTCCACGCTCGACTCCTCCAACCCCTGTGACATACCAATTGTTGCCTCGGCGGATCAGCCCGCTCCCGG
TAAAACGGGACGGCCCGCCAGAGGACCCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAACTTCTGAGTAAAACCATAAATAAATCAAA
ACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATT
CAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCAAC
CCTCAAGCCCAGCTTGGTGTTGGGACTCGCGAGTCAAATCGCGTTCCCCAAATTGATTGGCGGTCACGTCGAGCTTCCAT
AGCGTAGTAGTAAAACCCTCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCCGTTAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGA
TCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAACATCCTTATCAAAAATTATCTTCTTATCTTG
CGGACATAATATTGATTACTCAGCTATTAATCTCACGACTAACAGGAAGATCCTTGAAGAAAGGATGCCTGACTATGTCT
CGTCCGGCCTTTGAGACCATAATATGTAGGTTAA
```

ITS4

```
GGCTATGGTTCTAGCGGGGTCAGGCTCTACATGATCCGAGGTCAACATTCAGAAGTTGGGGTTTAACGGCGTGGCCGCGA
CGATTACCAGTAACGAGGGTTTTACTACTACGCTATGGAAGCTCGACGTGACCGCCAATCAATTTGGGGAACGCGATTTG
ACTCGCGAGTCCCAACACCAAGCTGGGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGGCGGG
CGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTGCTGCGTTCTTCAT
CGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTTATTTATGGTTTTACTCAGAAGTTACATATAGAAACAGA
GTTTAGGGGTCCTCTGGCGGGCCGTCCCGTTTTACCGGGAGCGGGCTGATCCGCCGAGGCAACAATTGGTATGTTCACAG
GGGTTTGGGAGTTGTAAACTCGGTAATGATCCCTCCGCAGGTTCACCTACGGAAGATCATTACGAGTTTACCCTCCTTCT
TGTGAACTTCCAATTGATGCCCCCGCAATCATCGCTCCGTAAAAAGGTAGGCCGACAAGGACCCTAACCTCTGTTTCTCT
GTCTGACTGCCGAATAAAACATATATTAATCAAAATTTTCACAAGGAATCTTTGGTTCGGAATGAAGAAGAAGGACTCAA
AGCGTAAGTAATGTGCATTGAGAAATCACGCATCAAGAATTTTTGAACGCAATTGTGCCACACTATTTGGGGGGTGTGCT
GATTCAAAGTCAATTCCCCCAGATGTTTGTT
```

La secuencia consenso ITS1, 5.8S rARN e ITS2 fue de 414 nucleótidos y se depositó en el banco de genes del NCBI con el número de acceso MN128959:

```
TCCGTAGGTG AACCTGCGGT TGTTGCCTCG GCGGATCAGC CCGCTCCCGG TAAAACGGGA
CGGCCCGCCA GAGGACCCCT AAACTCTGTT TCTATATGTA ACTTCTGAGT AAAACCATAA
ATAAATCAAA ACTTTCAACA ACGGATCTCT TGGTTCTGGC ATCGATGAAG AACGCAGCAA
AATGCGATCA AAATGCGATA AGTAATGTGA ATTGCAGAAT TCAGTGAATC ATCGAATCTT
TGAACGCACA TTGCGCCCGC CAGTATTCTG GCGGGCATGC CTGTTCGAGC GTCATTTCAA
CCCTCAAGCC CAGCTTGGTG TTGGGACTCG CGAGTCAAAT CGCGTTCCCC AAATTGATTG
GCGGTCACGT CGAGCTTCCA TAGCGTAGTA GTAAGCATAT CAATAAGCGG AGGA
```

3) Cepa C1502

Los amplicones completos obtenidos por los iniciadores ITS1 e ITS4 para *Mucor circinelloides* C1502 son:

ITS1

```
GTGCTTATTCATAATTTTGGCTTGTCCATTATTATCTATTTACTGTGAAATGTATTATTACTTGACGCTTGAGGGATGCT
CCACTGCTATAAGGATAGGCGGTGGGGATGCTAACCGAGTCATAATCAAGCTTAGGCTTGGTATCCTATTATTATTTACC
AAAAGAATTCAGAATTAATATTGTAACATAGACCTAAAAAATCTATAAAACAACTTTTAACAACGGATCTCTTGGTTCTC
GCATCGATGAAGAACGTAGCAAAGTGCGATAACTAATGTGAATTGCATATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCAAC
TTGCGCTCATTGGTATTCCAATGAGCACGCCTGTTTCAGTATCAAAACAAACCCTCTATCCAACATTTTGTTGAATAGGA
ATACTGAGAGTCTCTTGATCTATTCTGATCTCGAACCTCTTGAAATGTACAAAGGCCTGATCTTGTTTGAATGCCTGAAC
TTTTTTTTAATATAAAGAGAAGCTCTTGCGGTAAACTGTGCTGGGGCCTCCCAAATAATACTTTTTTTAAATTTGATCTG
AAATCAGGCGGGATTACCCGCTGAACTTAAGCATATCATGACCCGCGGAAAAAAGAAAAGTTCATTAAATAATCAATAAT
TTTGGCTTGTCATTATTATCTATTTACTGTGAAATGTATTATTACTTGACGCTGAGGGATGCTCACTGCTATAGGATAGG
CGGTGGGGATGCTAACGAGTCATAATCAAGCTTAGGCTTGGTATCTATTATTATTTACAAAAGAATTCAGAATTAATATT
GTACATAGACTAAAAATCTATAAACACTTTTAACAACGGATCTCTGGTTCTCGCATCGATAAGAACGTAGCAAAGTGCGA
TACTAAGTGATTGCATATTCGTGAATCATCAGTCTTTGACGCACTGGCTCATGTATTCATGAGCAGCTGTTTCAGTATCA
AACAAACCTCTTTCCCACATTTTTTGTATAGGAAGACGAGAGAAGCTCGGGTGTTCTTATTCAGATCTCGCTAAGTAAAG
CCGACACGTGTTGTGATGCCTGACCATATTTTTATATTAGTAAAAGACTCGCTGGTGCAGAGCTGTGGGGCGGCCCACAC
AAATTTATCGACACGCGGGCGTCCACGCTAGTACGATACCGAGAGATGATAT
```

ITS4

```
AATGACTGGGCATCCGCCTGATTTCAGATCAATTTAAAAAAAGTATTATTTGGGAGGCCCCAGCACAGTTTACCGCAAGA
GCTTCTCTTTATATTAAAAAAAAGTTCAGGCATTCAAACAAGATCAGGCCTTTGTACATTTCAAGAGGTTCGAGATCAGA
ATAGATCAAGAGACTCTCAGTATTCCTATTCAACAAAATGTTGGATAGAGGGTTTGTTTTGATACTGAAACAGGCGTGCT
CATTGGAATACCAATGAGCGCAAGTTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACTGAATATGCAATTCACATTAGTTATCGCAC
TTTGCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTAAAAGTTGTTTTATAGATTTTTTAGGTCTATGTTA
CAATATTAATTCTGAATTCTTTTGGTAAATAATAATAGGATACCAAGCCTAAGCTTGATTATGACTCGGTTAGCATCCCC
ACCGCCTATCCTTATAGCAGTGGAGCATCCCTCAAGCGTCAAGTAATAATACATTTCACAGTAAATAGATAATAATGGAC
AAGCCAAAATTATTGATTATTTAATGATCCTTCCGCAGGTACCCCTTACGGAAGAAGAGTCATTAAATAATCAATAATTT
TGGCTTGTCCATTATTATCTATATACTGTGAAATGTATTATTACTTGACGCTGAGGGATGCTCACTGCTATAGGATAGGC
GGTGGGGATGCTACGAGTCATAATCAAGCTAGGCTTGGTATCTATTATTATTACAAAAGAATTCAGAATAATATGTAACA
TAGACTAAAAATCTATAAACAACTTTACAACGGACTTGGTTCTGCATCGATAAGAACGTAGCAAGTGCGATACTAAGTGA
AATGCAATTCGTGAATCATGAGTCTTTGACGCACTGCGCTCATGGTATTCATGAGCAGGCGTTCAGTATCAAACAAACCC
TCTTCTCACCATTTTTTTGTATATAGAAGATCAGAGAGGACCTCGTGCGATTCTCGAGCTCTGGTCATCTCGGCAGATCA
AGAGCAGGACTACTCTTTTTATCGTCGACACATCACTATTTATTATTGGAGGGCGTATCGCTGACAATACGTGGCGCGCG
TGCAAACATCGTTTTGTGACTACGACCGATGCACTCTCAACTAGACTCCGGGAGGAGAA
```

La secuencia consenso ITS1, 5.8S rARN e ITS2 fue de 514 nucleótidos y se depositó en el banco de genes del NCBI con el número de acceso MN128960:

```
TCCGTAGGTG AACCTGCGGT TACTGTGAAA TGTATTATTA CTTGACGCTT GAGGGATGCT
CCACTGCTAT AAGGATAGGC GGTGGGGATG CTAACCGAGT CATAATCAAG CTTAGGCTTG
GTATCCTATT ATTATTTACC AAAAGAATTC AGAATTAATA TTGTAACATA GACCTAAAAA
ATCTATAAAA CAACTTTTAA CAACGGATCT CTTGGTTCTC GCATCGATGA AGAACGTAGC
AAAGTGCGAT AACTAATGTG AATTGCATAT TCAGTGAATC ATCGAGTCTT TGAACGCAAC
TTGCGCTCAT TGGTATTCCA ATGAGCACGC CTGTTTCAGT ATCAAAACAA ACCCTCTATC
CAACATTTTG TTGAATAGGA ATACTGAGAG TCTCTTGATC TATTCTGATC TCGAACCTCT
TGAAATGTAC AAAGGCCTGA TCTTGTTTGA ATGCCTGAAC TTTTTTTTAA TATAAAGAGA
AGCTCTTGCG GTAAGCATAT CAATAAGCGG AGGA
```

b Basidiomiceto Coc-1

Los amplicones obtenidos por los iniciadores ITS1 e ITS4 para Coc-1 fueron:

ITS1

GTAGCTGGCCTTCCGAGGCATGTGCACACCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGCACTTACTGTAGGT
TGGCGTGGGCTTCGGACCTCCGGGTTCGAGGCATTCTGCCGGCCTATGTACACTACAAACTCCGAAGT
AACAGAATGTAAACGCGTCTAACGCATCTTAATACAACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCAT
CGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTT
GAACGCACCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATGGAATTCTCAACCC
ATAGATCCTTGTGGTCTACGGGCTTGGATTTGGAGGCTTGCCGGCCCTTACACGGGGTCGGCTCCTCT
TGAATGCATTAGCTTGATTCCGTGCGAATCGGCTTTCAGTGTGATAATTGTCTACGCTGTGGCCGTGA
AGCGTTTGGCGAGCTTCTAACCGTCCGTTAGGACAACTTCTTGACATCTGACCTCAAATCAGGTAGGA
CTACCCGCTGAACTTAAGCATATCATAGCCGGGGAGGAAGAACATTAACGAGTTTT

ITS4

GCTACAACCCGTTTCAAAACTCGTTAATGATCCTCTTCCCGTAGGGTAACCTGCGGAAGGATCATTAA
CGAGTTTTGAAACGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCATGTGCACACCCTGCTCATCCACTCTACACC
TGTGCACTTACTGTAGGTTGGCGTGGGCTTCTGACCTCCCCCCCCCCCGCATTCTGCCGGCCTATGTA
CACTACAAACTCCGAAGTAACAGAATGTAAACGCGTCTAACGCATCTTAATACAACTTTCAGCAACGG
ATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCA
GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTG
TCATGGAATTCTCAACCCATAGATCCTTGTGGTCTACGGGCTTGGATTTGGAGGCTTGCCGGCCCTTA
CACGGGGTCGGCTCCTCTTGAATGCATTAGCTTGATTCCGTGCGAATCGGCTTTCAGTGTGATAATTG
TCTACGCTGTGGCCGTGAAGCGTTTGGCGAGCTTCTAACCGTCCGTTAGGACAACTT

La secuencia consenso ITS1, 5.8S rARN e ITS2 fue de 543 nucleótidos y se depositó en el banco de genes del NCBI con el número de acceso MN128598.1, como *Trametes polyzona* COPELO01. Este último nombre proviene de “COP”, que significa *Coriolopsis polyzona*, sinónimo de *T. polyzona*, “ELO” de Elota, lugar de colecta, y “01” es el número consecutivo de ejemplar de esa especie y lugar.

TCCGTAGGTG AACCTGCGGA TACCTATACG TTGCCTCGGC GGATCAGCCC GCGCCCCGTA
AAACGGGACG GCCCGCCCGA GGACCCCTAA CTCTGTTTTT AGTGGAACTT CTGAGTAAAA
CAAACAAATA AATCAAAACT TTCAACAACG GATCTCTTGG TTCTGGCATC GATGAAGAAC
GCAGCAAAAT GCGATAAGTA ATGTGAATTG CAGAATTCAG TGAATCATCG AATCTTTGAA
CGCACATTGC GCCCGCCAGT ATTCTGGCGG GCATGCCTGT TCGAGCGTCA TTTCAACCCT
CAAGCTCAGC TTGGTGTTGG GACTCGCGGT AACCCGCGTT CCCCAAATCG ATTGGCGGTC
ACGTCGAGCT TCCATAGCGT AGTAATCATA CACCTCGTTA CTGGTAATCG TCGCGGCCAC
GCCGTAAAAC CCCAACTTCT GAATGTGACC TCGGATCAGT AGATGCCAGT CATGCATATC
AATAAGCGGA GGA

c Similitudes genéticas con especies reportadas al NCBI

Todas las especies identificadas genéticamente que se muestran el Cuadro 28 tuvieron similitudes altas con las reportadas en el banco del NCBI, excepto C7a, que sólo alcanzó un 97.07% con dos cepas de *Fusarium verticillioides.* La tercera cepa de *F. verticillioides* que aparece en dicho cuadro (FG3), no está entre las más cercanas genéticamente, pero se realizó la comparación con ella porque proviene de una colecta realizada por Vázquez y col. (2019) en el mismo huerto de moringa de donde se obtuvo la cepa C7a. Por lo anterior, era probable que se tratara de la misma especie o cepa. En cuanto a *F. equiseti*, se comparó mediante la herramienta BLAST la similitud de las secuencias ITSrDNA de la cepa *F. equiseti* FJCA reportada por Herrera-Parra y col. (2017) como agente causal de enfermedad en *Jatropha curcas* en México, encontrándose un 99.56% de similitud.

Cuadro 28. Mayores similitudes de cepas fúngicas aisladas obtenidas por BLAST-N (NCBI) usando el algoritmo Megablast de secuencias ITSrDNA

Cepa	Longitud secuencia (pb)	Secuencias con mayor similitud	Acceso a GenBank	Similitud (%)	Lugar de origen
		Fusarium sp. SX3	MH884080.1	99.78	China
C6a	493	*Fusarium equiseti* TRN	MH128127.1	99.77	Bangladesh
		F. equiseti FJCA	KY012795.1	99.56	México
C7a	414	*Fusarium verticillioides* XJ8	KP267173.1	97.07	China
		F. verticillioides F1UFSM	KX710194.1	97.07	Brasil
		F. verticillioides FG3	KR185323.1	96.04	México
C1502	514	*Mucor circinelloides* CMR 545	MT603934.1	100.00	Irán
		M. circinelloides AUMC6696	MT509983.1	100.00	China
Coc-1	543	*Trametes polyzona* MSP1-3	MN970813.1	99.41	India
(COPELO01)		*T. polyzona* EDCP2	MG825422.1	99.41	Nigeria
		T. polyzona KU-RNW027	LC190464.1	98.03	Tailandia

4 Evaluación cualitativa de enzimas lignocelulolíticas

Como se muestra en el Cuadro 29, todas las cepas de hongos aisladas en el primer muestreo presentaron actividad de celulasas y xilanasas, excepto la C1b que no produjo xilanasa. En cambio, nueve de las cepas fueron positivas para la producción de lacasas entre ellas *Penicillum* (C1a, C1b, C5a y C5b), dos de *Aspergillus* (C3a y C3b), *Curvularia* (C7b) y *Alternaria* (C7c). En cuanto a la producción de manganeso peroxidasa fueron las cepas C3b y C3c de *Aspergillus* las que dieron positiva la reacción al rojo fenol, así como las cepas de *Fusarium, Curvularia, Alternaria, Mucor* y C5a de *Penicillum*. Se ha encontrado la presencia de lacasas en *Penicillium* spp., *Aspergillus nidulans* y *Curvularia* spp. (Banerjee y Vohra, 1991; Scherer y Fischer, 1998), aunque al parecer no se trata de lacasas verdaderas, ya que no son capaces de oxidar la siringaldazina (Rodriguez y col., 1996). Así mismo, Claus y Filip (1998) reportan la producción de lacasa y manganeso peroxidasa en otros ascomicetos como *Cladosporium cladosporioides.* La presencia de enzimas oxidantes en fitopatógenos tales como *Aspergillus* spp., *Curvularia* spp. y *Penicillum* spp. tiene una aparente relación con la resistencia a fungicidas que presentan estos microorganismos (Viswanath y col., 2014).

Los hongos C3a, C3b, C5a, C5b, C7a, C7b, C7c tuvieron actividad de lacasa y MnP, mientras que los hongos C6a, C1502, C1503 y C1506 únicamente MnP. Es altamente deseable que los microorganismos seleccionados para intervenir en un proceso biológico de hidrólisis y fermentación estén dotados de un amplio potencial enzimático, que sea suficiente para degradar celulosa, hemicelulosa y lignina, los tres componentes principales de la lignocelulosa (Zerva y col., 2014). Es por ello, que considera en la selección de un microorganismo su capacidad enzimática tanto cualitativa como cuantitativamente.

Cuadro 29. Reacciones enzimáticas cualitativas de hongos colectados

Clave	Especie	Cel	Xil	Lac	MnP
C1a	*Penicillum sp*.	+	+	+	-
C1b	*Penicillum* sp.	+	-	+	-
C3a	*Aspergillus* sp.	+	+	-	-
C3b	*Aspergillus* sp.	+	+	+	+
C3c	*Aspergillus* sp.	+	+	+	+
C3d	*Aspergillus niger*	+	+	-	-
C5a	*Penicillum* sp.	+	+	+	+
C5b	*Penicillum* sp.	+	+	+	-
C6a	*Fusarium equiseti*	+	+	-	+
C7a	*Fusarium verticillioides*	+	+	+	+
C7b	*Curvularia* sp.	+	+	+	+
C7c	*Alternaria* sp.	+	+	+	+
C1502	*Mucor circinelloides*	+	+	-	+
C1503	*Trametes* sp.	+	+	-	+
C1504	*Trametes* sp.	+	+	+	-
C1505	*Pycnoporus sanguineus*	+	+	+	-
C1506	*Coriolopsis* sp.	+	+	-	+
C1507	*Trametes* sp.	+	-	-	-
C1508	*Pleurotus* sp.	+	+	+	-

5 Cuantificación de etanol

a Fermentación de sacarosa

La Figura 27 muestra que, de las 13 cepas probadas en este experimento, 5 fermentaron la sacarosa. La de mayor producción de etanol fue la cepa C6a (*F. equiseti*) con 7.9 g/L a las 96 h, seguida de C3d (*A. niger*) con 7.1 g/L a las 84 h, C7a (*F. verticillioides*, 6.4 g/L, 72 h), C3a (*A. ochraceus*, 3.9 g/L, 108 h) y C1502 (*M. circinelloides*, 2.9 g/L, 72 h). Por su capacidad etanologénica, las cepas nativas señaladas se seleccionaron para los experimentos posteriores de este trabajo de investigación, en la búsqueda de microorganismos adaptables a un bioproceso consolidado.

b Fermentación de glucosa y xilosa

El Cuadro 30 presenta los resultados de las cinéticas de producción de etanol a partir de glucosa y xilosa como fuente de carbono. Los datos obtenidos muestran que la cepa con mayor producción, rendimiento y productividad de etanol a partir de glucosa fue *F. equiseti*, seguida de *F. verticillioides* y de *M. circinelloides*. Estos resultados fueron similares a otros reportados en la literatura, aunque inferiores a los obtenidos por Panagiotou y col. (2011) y a los de Sharifia y col. (2008), quienes utilizaron respectivamente una cepa de *F. oxysporum* y de *Mucor indicus*. Ellos reportan 17.5 g/L y 8.50 de etanol, partiendo de concentraciones de glucosa/xilosa de 40 g/L, con agitación de 150 rpm. Así mismo son inferiores a los de Skory y col. (1997), quienes obtuvieron alrededor de 24 g/L utilizando cepas de *Aspergillus oryzae* y *Rhizopus javanicus* partiendo de concentraciones iniciales de 50 g/L de glucosa, con agitación de 200 rpm. Para la fermentación de xilosa la cepa más eficiente fue *M. circinelloides*, seguida de *F. verticillioides* y de *F. equiseti*. Estos resultados fueron inferiores a los obtenidos por Zerva y col. (2014) usando *Paecilomyces variotii*, y a los de Okamoto y col. (2011) con *Trametes. hirsuta y T. versicolor* (Okamoto y col., 2014). Si bien los rendimientos de este trabajo fueron más bajos a los reportados en la literatura, podrían mejorarse optimizando las condiciones de cultivo.

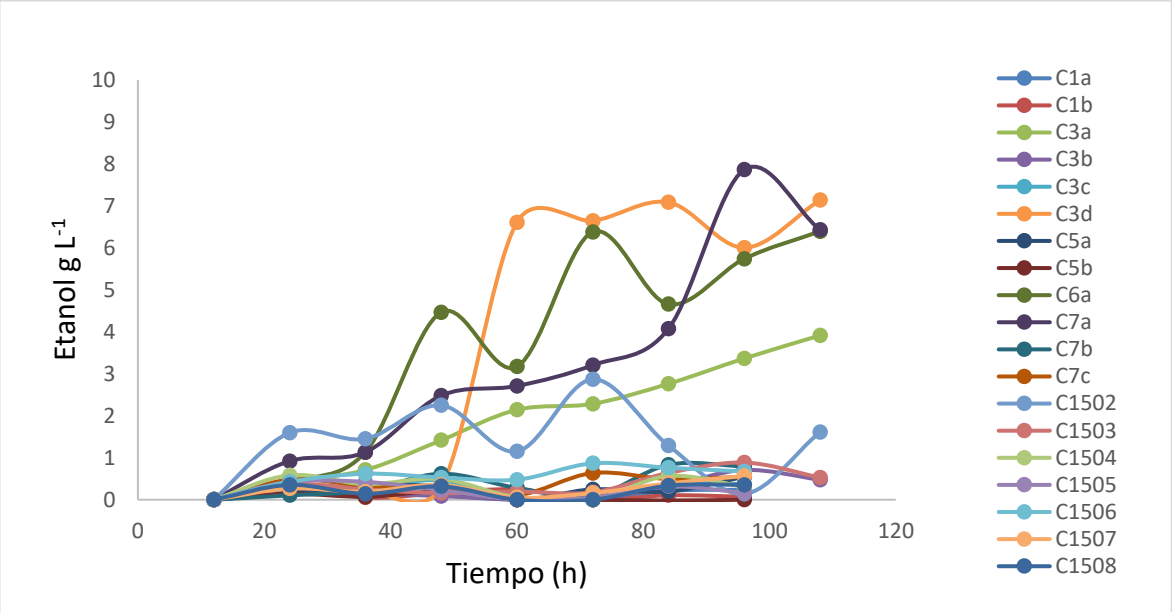


Figura 27. Producción de etanol en sacarosa de hongos regionales aislados

Cuadro 30. Máxima concentración, rendimiento y productividad de etanol en glucosa y xilosa de cultivos seleccionados de hongos ascomicetes

Cepa	Glucosa			Xilosa		
	E[1]	Y[2]	P[3]	E[1]	Y[2]	P[1]
***A. ochraceus* (C3a)**	2.74	0.14 d	0.78 c	0.60	0.03 c	0.30 bc
***A. niger* (C3d)**	2.38	0.12 d	0.59 d	0.77	0.04 c	0.26 c
***F. equiseti* (C6a)**	7.48	0.37 a	1.87 a	1.38	0.07 b	0.46 b
***F. verticillioides* (C7a)**	4.22	0.21 b	1.05 b	1.73	0.09 ab	0.69 a
***M. circinelloides* (C1502)**	3.67	0.18 c	0.92 c	2.10	0.11 a	0.70 a

[1] Máxima concentración de etanol, g/L. [2] Rendimiento de etanol, g etanol/g sustrato consumido. [3] Productividad, g/L/d. * Letras diferentes indican diferencia significativa (Tukey, α=0.05).

c Fermentación en medio sumergido con *M. oleifera*

El Cuadro 31 muestra los rendimientos y productividad de etanol de las cinco cepas seleccionadas en el cultivo sumergido con *Moringa oleifera*. En el cultivo sin *S. cerevisiae* la cepa que produjo la mayor concentración, rendimiento y productividad de etanol, fue *M. circinelloides*, seguida por *F. verticillioides* y *A. ochaceus*. Estos rendimientos son muy bajos comparados con los obtenidos por otros autores, pero como se puede observar, en el cultivo del hongo en consorcio con *S. cerevisiae*, todos los parámetros de producción de etanol se incrementaron de 3 a 6 veces. Esto parece indicar una sinergia entre hongo y levadura, lo cual se puede explicar al analizar el comportamiento de las concentraciones de etanol, azúcares reductores, actividad de endoglucanasas (CMCasa) y concentración de células de la levadura mostrados en la Figura 28. En todas las cinéticas mostradas se puede constatar que en las primeras 36 a 48 horas hay un incremento exponencial del número de células de levadura y de contenido de etanol, así como un descenso drástico de la concentración de azúcares reductores presentes en el medio provenientes del tallo de moringa. Después de ese tiempo, se observa un descenso de los primeros dos parámetros, junto con un incremento de la actividad de CMCasa y del contenido de azúcares reductores. Lo anterior podría explicarse por el crecimiento del hongo presente, el cual, al agotarse la fuente de azúcar libre disponible, pone en marcha su maquinaria de enzimas, entre ellas xilanasas, peroxidasas y celulasas. Estos ciclos se repiten aproximadamente cada 12 horas, pero con incrementos netos graduales del contenido de etanol y del número de células de *S. cerevisiae* hasta llegar a un máximo. Los tratamientos que tuvieron mejores rendimientos en consorcio con *S. cerevisiae* fueron de nuevo *M. circinelloides*, seguida del consorcio de todas las cepas, *A. ochraceus, A. niger* y *F. equiseti.* En cuanto a la productividad, el consorcio de todas las cepas fue el mejor ya que alcanzó un pico máximo de producción de etanol tan solo a las 36 h. Esto podría deberse a la influencia de la cantidad de inóculo utilizado en ese consorcio y la carga enzimática contenida en éste, que fue 5 veces mayor que la de los demás tratamientos. A pesar de la alta productividad del consorcio mencionado, la producción máxima de etanol y el rendimiento fue similar al de *M. circinelloides*.

Cuadro 31. Concentración de etanol, rendimiento y productividad de hongos seleccionados y en consorcio con *S. cerevisiae* en cultivo de medio sumergido con lignocelulosa *M. oleifera*

	Sin *S. cerevisiae*			Con *S. cerevisiae*		
Cepa de hongo	**E[1]**	**Y[2]**	**P[3]**	**E[1]**	**Y[2]**	**P[1]**
Aspergillus ochraceus (C3a)	0.016 bc	4.746	0.05 bc	0.06 b	18.55	0.51 b
Aspergillus niger (C3d)	0.010 c	2.779	0.03 c	0.06 b	17.64	0.27 c
Fusarium equiseti (C6a)	0.016 bc	4.687	0.05 bc	0.05 b	14.57	0.22 c
Fusarium verticillioides (C7a)	0.018 b	5.280	0.06 b	0.05 b	13.99	0.48 b
Mucor circinelloides (C1502)	0.027 a	7.831	0.09 a	0.11 a	31.53	0.48 b
Consorcio (C3a, C3d, C6a, C7a, C1502)	n.a.	n.a.	n.a.	0.10 a	29.51	1.35 a

[1] Máxima concentración de etanol, g/L. [2] Rendimiento porcentual basado en un teórico máximo de 0.343 g etanol/g de moringa. [3] Productividad calculada del proceso, g/L/d. *Letras diferentes representan diferencia significativa. Prueba Tukey (α= 0.05).

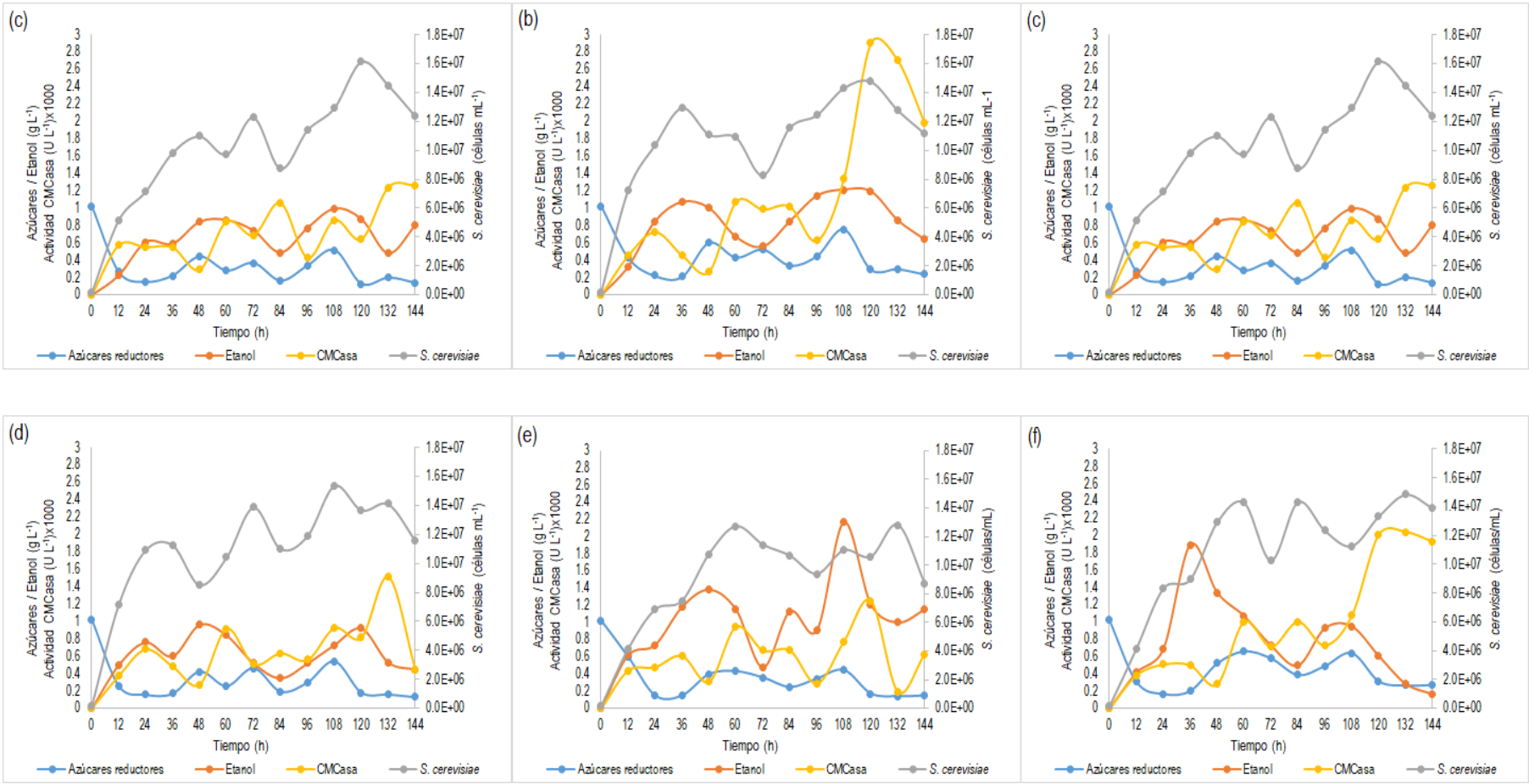


Figura 28. Cinéticas de producción de azúcares reductores, etanol, CMCasa y crecimiento celular de *S. cerevisiae*, de cepas C3a (a), C3d (b), C6a (c), C7a (d), C1502 (e) y consorcio con todas las anteriores (f) en medio sumergido con madera de *M. oleifera*

Para la cepa C3a, si bien tuvo buenos rendimientos de etanol, se observó un efecto de disminución drástica del número de células de *S. cerevisiae* y de la concentración de etanol entre las 48 y 96 h. Esto podría deberse a un posible antagonismo entre los dos microorganismos en lugar de una sinergia. Por esta razón dicha cepa no seleccionarla para los experimentos posteriores tendientes a desarrollar un CBP en consorcio con *S. cerevisiae*.

Los resultados anteriormente expuestos son inferiores a los obtenidos por algunos autores como Panagiotou y col. (2011), quienes utilizando a *Fusarium oxysporum* y una cepa *S. cerevisiae* recombinante en paja de trigo pretratada por explosión de vapor, obtuvieron una productividad 2.59 g L^{-1} d^{-1}, que es 1.9 veces mayor al del consorcio de todas las cepas y *S. cerevisiae* (1.35 g L^{-1} d^{-1}) de este estudio. La fuente de lignocelulosa y el pretratamiento son determinantes en los rendimientos obtenidos ya que de ellos depende parcialmente la eficiencia con que los microorganismos realizan la hidrólisis depende del perfil de los diferentes componentes lignocelulósicos de la materia prima utilizada (Vardakou y col., 2004). En nuestro estudio se utilizó madera de *M. oleifera* con un contenido de lignina de 21.6%, que es mayor que el de la paja de trigo (14.1%). El consorcio entre *M. circinelloides* y *S. cerevisiae* produjo una concentración máxima de etanol y rendimiento muy similares al consorcio de todas las cepas de hongos y *S. cerevisiae*. El rendimiento de 0.11 $g_{etanol}/g_{sustrato}$ con la cepa *M. circinelloides* C1502 es similar al de otros trabajos de investigación, donde se utilizó algún pretratamiento o hidrólisis seguida de una fermentación. Entre ellos, podemos citar a Montaño-Morales (0.13 $g_{etanol}/g_{sustrato}$) (Montaño-Morales, 2014), quien combinó hidrólisis ácida más fermentación alcohólica con *S. cerevisiae* en madera de *M. oleifera*; a los de Kumar y col. (2015), quienes aplicaron hidrólisis ácida y fermentación con *Kluyveromyces sp.* en bagazo de caña obteniendo 0.165 $g_{etanol}/g_{sustrato}$ y a los de Chander y col. (2010) que usaron un coctel enzimático y fermentación con *S. cerevisiae*, alcanzando 0.14 g_{etanol} mL^{-1}, utilizando un caldo de periódico degradado con enzimas. Sin embargo, en otros trabajos se reportan rendimientos mucho mayores. Destacan Chandel y col. (2011) quienes señalan rendimientos de 0.49 $g_{etanol}g_{sustrato}$ combinando

pretratamientos de secado, molienda y fermentación con *Pichia stipitis*, una levadura que fermenta xilosa y una cepa termotolerante *de S. cerevisiae*. Si bien los resultados obtenidos en este trabajo son menores a los más sobresalientes reportados en la literatura, no dejan de ser alentadores. Futuros trabajos de investigación con CBP deberían orientarse al uso combinado de pretratamientos benévolos con el medio ambiente y consorcios de microorganismos con alta capacidad lignocelulolítica y etanologénica, así como a la optimización de las condiciones físicoquímicas y nutricionales del proceso y a la pesquisa de nuevos microorganismos con alta capacidad hidrolítica y fermentativa de la lignocelulosa.

6 Cuantificación de actividad enzimática y azúcares reductores

a Actividad de celulasa (CMCasa)

Como se aprecia en el Cuadro 32 y Figura 29, la actividad de celulasas, medida por la acción del extracto enzimático sobre la carboximetilcelulosa, no presentó diferencias significativas a las 36 h para 14 cepas de hongos estudiadas. A las 84 h, fueron las dos cepas de *Pleurotus* las que mostraron más actividad de CMCasas. Sólo hasta que transcurrieron 168 horas se apreció un marcado incremento en la actividad en la mayoría de las cepas, donde destacaron las adquiridas J-5 de *P. ostreatus* y G-1 de *G. lucidum*, así como las nativas Hhy-1 (*Hexagonia hydnoides*) y C1507 (*Trametes sp*.). En general, los valores encontrados son similares a los reportados por Vázquez y col. (2019) quienes reportaron 1835 U L^{-1} de endoglucanasas (CMCasas) a las 168 h para el ascomiceto *Penicillum. funiculosum* crecido en medio sumergido con 2% de tallo de *M. oleifera.* Castro y col. (2009) reportaron 1635 U L^{-1} en bagazo de caña. Sin embargo, Elisashvili y col. (2008) informaron de valores mucho más elevados de CMCasas a los 15 días que van de 5,000 a 35,000 U L^{-1} para *Coriolopsis polyzona, Pycnoporus coccineus*, *T. versicolor,* y *P. ostreatus*, cultivados en medio sumergido con hojas de árbol y cáscaras de plátano. Resultados similares fueron reportados también por Metreveli y col. (2017) para cultivos sumergidos de *Schizophyllum commune, P. coccineus,* y *Trametes hirsuta*, utilizando Avicel como fuente de carbohidratos.

Cuadro 32. Actividad de celulasas (CMCasas) de cepas de hongos autóctonos en medio sumergido conteniendo madera e *M. oleifera*

Hongo	Actividad de CMCasas (U L^{-1})					
	36 h		84 h		168 h	
Trametes sp. (C1503)	1308.3	a	1240.5	bc	1760.2	ab
Pycnoporus sanguineus. (C1505)	1602.1	a	1647.3	ab	1692.4	ab
Trametes sp.(C1507)	1511.7	a	1353.5	abc	1918.4	ab
Trametes polyzona (Coc-1)	1669.8	a	1873.2	ab	1308.3	b
Curvularia sp. (C7b)	1895.8	a	1082.4	c	1353.5	b
Ganoderma oregonense (Gap)	1669.8	a	1466.5	abc	1376.1	b
Ganoderma lucidum G-1 (Glu)	1330.9	a	1760.2	abc	1941.0	ab
Lenzites betulina (Gst)	1466.5	a	1715.0	abc	1647.3	b
Hexagonia hydnoides (Hhy-1)	1217.9	a	1624.7	abc	1918.4	ab
Hexagonia hydnoides (Hhy-2)	1489.1	a	1602.1	abc	1240.5	b
Mucor circinelloides (C1502)	1421.3	a	1669.8	abc	1669.8	b
Fuscoporia mesophila (Phe)	1376.1	a	1760.2	abc	1353.5	b
Pleurotus ostreatus J-5 (Pos)	1692.4	a	1828.0	ab	2754.4	a
Pleurotus opuntiae (Ppu)	1986.2	a	2008.8	a	1692.4	ab
Hongo	Referencias					
	Medio sintético		Medio bajo en fibra		Medio alto en fibra	
Penicillum funiculosum	206	[1]A	1835	[2]	1683	[1]B
P. sanguineus CS2	116	[7]A	159	[7]B	18	[7]C
Pycnoporus coccineus	65600	[3]A	111000	[4]A	35000	[4]B
T. polyzona			39000	[4]A	32000	[4]B
T. hirsuta	34000	[3]A	64600	[3]B		
P. ostreatus	1450	[5]	27000	[4]A	15000	[4]B
T. versicolor	11800	[6]	45000	[4]A	29000	[4]B

Medias que no comparten una letra en la misma columna son estadísticamente diferentes (Tukey, $p<0.05$). [1] Vázquez y col. (2019), A en Avicel, B en tallo de *M. oleifera*; [2] Castro y col. (2009), en bagazo de caña parcialmente deslignificado; [3] Metreveli y col. (2017) A en Avicel, B en cáscaras de mandarina; [4] Elisashvili y col. (2008), A en cáscaras de plátano, B en hojas del árbol *Fagus sylvatica*; [5] Daba y col. (2011), en Avicel; [6] Machado y col. (2020), en Avicel. [7] Gutiérrez-Soto y col. (2015), A con CMC, B con cáscaras de naranja, C con fibra de trigo.

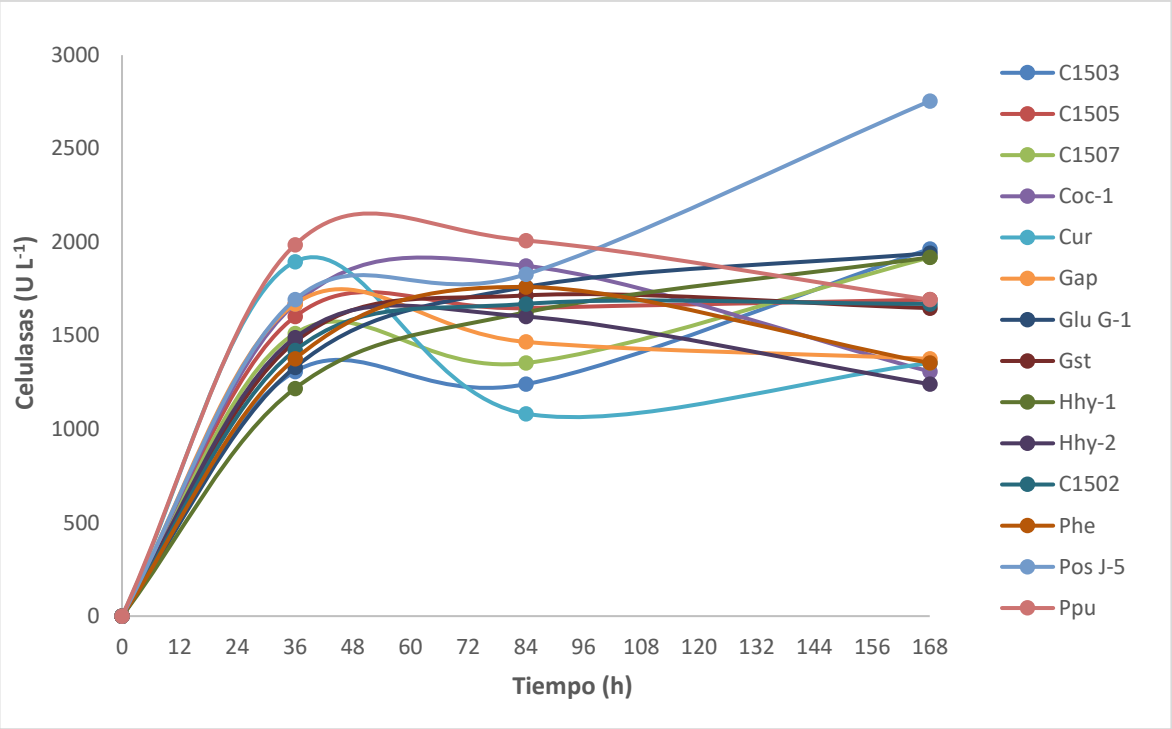


Figura 29. Cinética de la actividad de CMCasas de cepas de hongos autóctonos y adquiridos, en medio sumergido conteniendo *M. oleifera*

La diferencia tan marcada entre los trabajos señalados y el obtenido en el presente experimento pudiera deberse a la naturaleza de los sustratos empleados por dichos autores, que son residuos agrícolas con un ínfimo contenido de fibra y mayor proporción de celulosa fácilmente degradable, por lo que son más susceptibles a una temprana producción de celulasas.

Lo anterior pudiera explicar también el hecho de que la aparición de CMCasas en el presente trabajo sólo se incrementó notoriamente hasta las 168 horas, una vez que las enzimas lignolíticas hubieron actuado sobre los tallos de *M. oleifera* y liberado celulosa disponible para ser degradada. Como se puede constatar en el Cuadro 32, aún para un mismo microorganismo cultivado bajo las mismas condiciones, la influencia de la fuente de carbono es determinante en la producción de enzimas celulolíticas.

Generalmente, al aumentar el contenido de lignina y xilosa de la fuente de carbono, disminuye proporcionalmente la producción de celulasas. En el caso particular de la moringa, por lo mostrado en el presente experimento, no parece ser tan apropiada como otros desechos agrícolas tales como las cáscaras de mandarina o plátano para la producción de celulasa (Elisashvili y col., 2008) . Esto concuerda también con lo señalado por Bentil y col. (2018) quienes indican que sustratos que contienen azúcares libres son mejores que pajas y maderas para la producción de celulasa y de xilanasa.

b Actividad de xilanasa

Para la actividad de xilanasa, solamente destacaron la cepa autóctona *T. polyzona* (Coc-1) a las 84 horas, y la cepa adquirida *G. lucidum* G-1 a las 168 h (Cuadro 33 y Figura 30). Las cepas autóctonas *P. sanguineus* (C1505), *Curvularia* sp.(C7b) *y H. hydnoides (Hhy-2)* mostraron un nivel moderado de producción de la enzima. Es de destacar la alta actividad de xilanasas de *T. polyzona*, que concuerda con lo señalado por Elisashvili y col. (2008), quienes reportaron valores de 14,000 a 33,000 U L^{-1} para una cepa de esta especie crecida en medio sumergido conteniendo cáscaras de plátano y hojas de árbol respectivamente. Los mismos autores también reportan valores muy altos de producción de xilanasas para una cepa de *Pycnoporus coccineus* crecida en cáscaras de plátano.

Cuadro 33. Actividad de xilanasas de cepas de hongos autóctonos y adquiridos en medio sumergido conteniendo madera de *M. oleifera*

Hongo	Actividad de xilanasas (U L^{-1})					
	36 h		84 h		168 h	
Trametes sp. (C1503)	6304	abc	7407	b	5201	b
Pycnoporus sanguineus. (C1505)	5476	c	5063	b	7752	ab
Trametes sp.(C1507)	5545	bc	5545	b	5132	b
Trametes polyzona (Coc-1)	7132	ab	18269	a	5545	b
Curvularia sp. (C7b)	7476	a	6373	b	6925	ab
Ganoderma oregonense (Gap)	6166	abc	5270	b	5614	b
Ganoderma lucidum G-1 (Glu)	5270	c	8097	b	14028	a
Lenzites betulina (Gst)	5063	c	5476	b	4718	b
Hexagonia hydnoides (Hhy-1)	5407	c	5476	b	5545	b
Hexagonia hydnoides (Hhy-2)	5683	bc	4925	b	8442	ab
Mucor circinelloides (C1502)	5201	c	4856	b	4235	b
Fuscoporia mesophila (Phe)	5476	c	5821	b	5270	b
Pleurotus ostreatus J-5 (Pos)	5683	abc	6304	b	5614	b
Pleurotus opuntiae (Ppu)	5959	abc	6097	b	5270	b
Hongo	Referencias					
	Medio sintético		Medio bajo en fibra		Medio alto en fibra	
Penicillum meleagrinum					5736	[1]
P. sanguineus CS2	108	[4]A	66.5	[4]B	66.5	[4]C
Pycnoporus coccineus	63500	[3]A	135000	[2]A	48000	[2]B
T. polyzona			14000	[2]A	33000	[2]B
T. hirsuta	48800	[3]A	44700	[3]B		
P. ostreatus			83000	[2]A	29000	[2]B
T. versicolor			45000	[2]A	29000	[2]B

Medias que no comparten una letra en la misma columna son estadísticamente diferentes (Tukey, $p<0.05$). [1] Boruah y col. (2016) en tallo de bambú; [2] Elisashvili y col. (2008), A en cáscaras de plátano, B en hojas del árbol *Fagus sylvatica*; [3] Metreveli y col. (2017), A en Avicel, B en Avicel + cáscaras de mandarina; [4] Gutiérrez-Soto y col. (2015), A con xilano, B con cáscaras de naranja, C con paja de trigo.

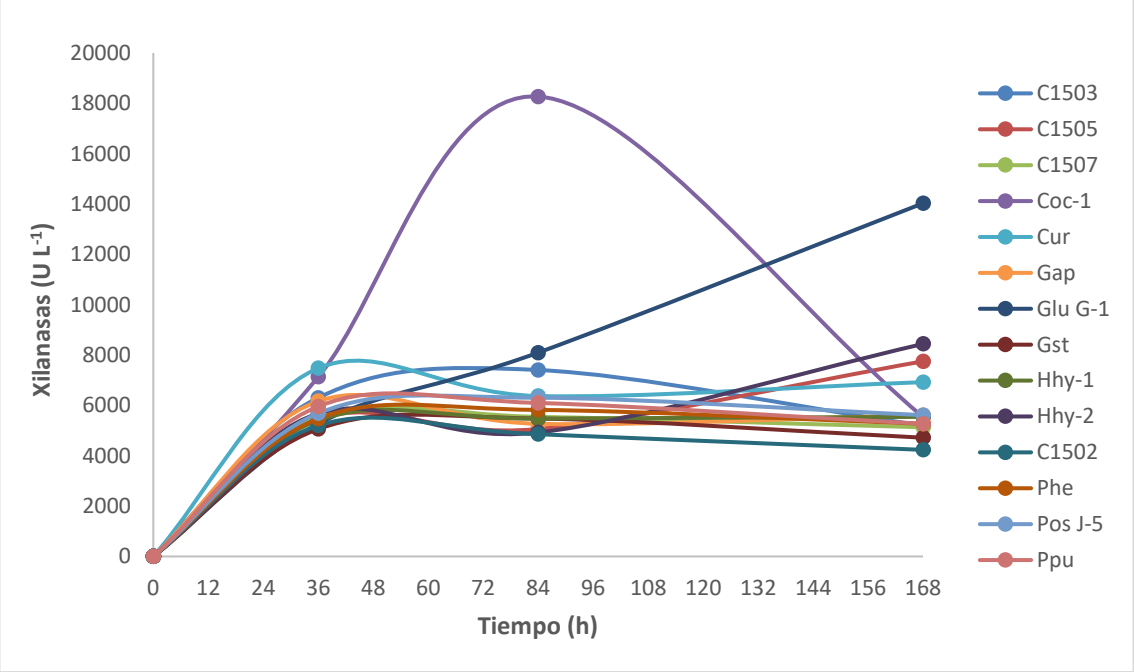


Figura 30. Cinética de la actividad de xilanasas de cepas de hongos autóctonos y adquiridos, en medio sumergido conteniendo *M. oleifera*

A diferencia del resultado anterior, la cepa de *Pycnoporus* local alcanzó sólo una moderada actividad de xilanasa. Otros trabajos realizados en México con *P. sanguineus* revelan valores de actividad de xilanasas menores a los obtenidos en el presente trabajo (Gutiérrez-Soto y col., 2015). Como en el caso de las celulasas, la madera de moringa no resultó ser un medio tan apropiado para la producción de xilanasas, si se compara con los desechos de baja fibra y que contienen cantidades moderadas de azúcares libres, como los son las cáscaras de frutas (Bentil y col., 2018). En general para la producción de enzimas de cualquier hongo, las fisicoquímicas del medio de así como la fuente de carbono tienen una influencia crítica en la productividad de enzimas (Chen, 2014). Al contrario de lo reportado por Elisashvili y col. (2008a), *G. lucidum*, *Pleurotus ostreatus* y *P. pulmonarius* no presentaron una actividad alta de xilanasas. En definitiva, de las cepas estudiadas en este experimento, *T. polyzona* Coc-1 fue la cepa que mostró la mayor capacidad de producción de xilanasa.

c Actividad de manganeso peroxidasa

Como se aprecia en el Cuadro 34, todas las cepas estudiadas produjeron altos niveles de manganeso peroxidasa en el medio sumergido con madera de *M. oleifera*, iniciando su producción desde las 36 horas y alcanzando un máximo entre el cuarto y séptimo día. La cepa que más pronto produjo altos niveles de esta enzima fue C1503, ya que a las 36 horas alcanzó una actividad de MnP de 102.42 U L^{-1}. De las 14 cepas de hongos estudiadas, 10 alcanzaron máximos de producción de MnP a las 84 horas para posteriormente descender. Aparte de C1503, las cepas que no presentaron este comportamiento fueron Coc-1, Hyd-2 y C7b, las cuales aumentaron ligeramente o mantuvieron los niveles de la enzima MnP desde las 84 hasta las 168 h.

Comúnmente las MnP actúan más rápidamente que el resto de las enzimas lignolíticas ya que poseen un mecanismo de acción en donde, en una primera etapa, degradan los compuestos fenólicos de la lignina produciendo quelatos de oxalato de Mn^{3+}, que a su vez actúan como mediadores en reacciones subsiguientes mediadas por acción de la misma enzima MnP o de

otras como lacasas que no tienen por ellas mismas la capacidad de penetrar profundamente en la estructura de la lignocelulosa (Kumar y Chandra, 2020). En el Cuadro 34 y Figura 31 se constata que las cepas más destacadas en la producción de MnP a las 84 h fueron *Lenzites betulina* (Gst), *Mucor circinelloides* (C1502) y *Fuscoporia mesophila* (Phe). Sólo la cepa de *Trametes polyzona* (Coc-1) alcanzó un valor alto de producción de MnP a las 144 h.

Estos resultados concuerdan con lo reportado por Thiribhuvanamala y col. (2017) para diversas cepas de basidiomicetes de la India de los géneros *Pleurotus, Trametes, Ganoderma, Lentinus y Pycnoporus*. En dicho estudio sobresalió la cepa *P. pulmonarius* con una actividad de MnP de 220 U L^{-1} a las 148 horas, no muy lejano del máximo encontrado en el presente experimento para la cepa Gst (120.9 U L^{-1}).

d Actividad de lacasa

Los resultados mostrados en el Cuadro 35 y Figura 32, indican que solamente 4 de las cepas de hongos estudiadas mostraron actividad de lacasas al menos al séptimo día. Se trató de las cepas autóctonas del ascomicete *Curvularia* sp. C7b y del basidiomicete *Trametes polyzona* Coc-1, así como de las cepas adquiridas *Pleurotus ostreatus* J-5 y *Ganoderma lucidum* G-1. Sólo *Curvularia* sp. mostró actividad antes de las 36 h, manteniéndose casi constante a las 84 h, para luego descender a las 168 h. Sin embargo, la cepa autóctona que destacó más por su producción de esta enzima fue *T. polyzona* Coc-1, que empezó a producirla desde las 84 horas e incrementó exponencialmente su secreción a las 168 h. Estadísticamente, los valores de actividad enzimática de *Trametes polyzona* Coc-1 y *Pleurotus ostreatus* J-5 fueron iguales ($p<0.05$). Estos resultados concuerdan con lo reportado por Neoh y col. (2013) quienes encontraron un máximo de producción de lacasas de 29.63 U L^{-1} a las 24 h en la biorremediación de efluentes de la palma de aceite por *Curvularia clavata*.

Es interesante destacar que, al igual que en el presente trabajo, una vez alcanzada la máxima concentración de enzima a las 24 horas, ésta descendió rápidamente hasta casi desaparecer a las 72 h.

Cuadro 34. Actividad de manganeso peroxidasa de cepas nativas y adquiridas cultivadas en medio sumergido con madera de *M. oleifera*

Hongo	Actividad de MnP (U L^{-1})					
	36 h		84 h		168 h	
Trametes sp. (C1503)	102.4	a	15.6	b	31.1	de
Pycnoporus sanguineus. (C1505)	15.2	c	96.7	a	94.1	ab
Trametes sp.(C1507)	63.3	b	88.3	ab	53.8	bcd
Trametes polyzona (Coc-1)	9.2	c	83.6	ab	102.3	a
Curvularia sp. (C7b)	9.4	c	80.0	ab	81.4	abc
Ganoderma oregonense (Gap)	10.3	c	99.2	a	82.6	abc
Ganoderma lucidum G-1 (Glu)	12.6	c	59.2	ab	49.5	cd
Lenzites betulina (Gst)	12.7	c	120.9	a	23.3	de
Hexagonia hydnoides (Hhy-1)	9.4	c	73.0	ab	29.7	de
Hexagonia hydnoides (Hhy-2)	17.9	c	63.8	ab	96.1	a
Mucor circinelloides (C1502)	10.0	c	114.5	a	20.2	de
Fuscoporia mesophila (Phe)	14.2	c	117.6	a	6.7	e
Pleurotus ostreatus J-5 (Pos)	68.8	b	79.4	ab	21.4	de
Pleurotus opuntiae (Ppu)	6.1	c	78.0	ab	13.6	de
Hongo	Referencias					
	Medio sintético		Medio bajo en fibra		Medio alto en fibra	
Trametes gallica	0	[6]	116	[2]A	1263	[2]B
T. polyzona	220	[7]	124	[2]A	896	[2]B
Ganoderma lucidum	0	[6]	40	[1]A	80	[1]B
Phanerochaete chrysosporium	0	[4]A	230	[4]B	650	[4]C
P. ostreatus			55	[2]A	0	[2]B
T. versicolor	200	[6]	109	[2]A	202	[2]B
P. pulmonarius	220	[3]	250	[5]A	2200	[5]B

Medias que no comparten una letra en la misma columna son estadísticamente diferentes (Tukey, $p<0.05$). [1] Songulashvili y col. (2007), A en cáscaras de mandarina, B en salvado de trigo; [2] Elisashvili y col. (2008), A en cáscaras de plátano, B en hojas del árbol *Fagus sylvatica*; [3] Thiribhuvanamala y col. (2017) en medio con alcohol veratrílico; [4] Sayadi y Ellouz (1995), A con alcohol veratrílico, B con 10 ppm de desechos de oliva, C con 100 ppm de desechos de oliva; [5] Dos Santos Bazanella y col. (2013) en FES: A en mazorca de maíz, B en cáscara de piña; [6] Elisashvili y Kachlishvili (2009) con glicerol; [7] Jaouani y col. (2006) en alcohol veratrílico.

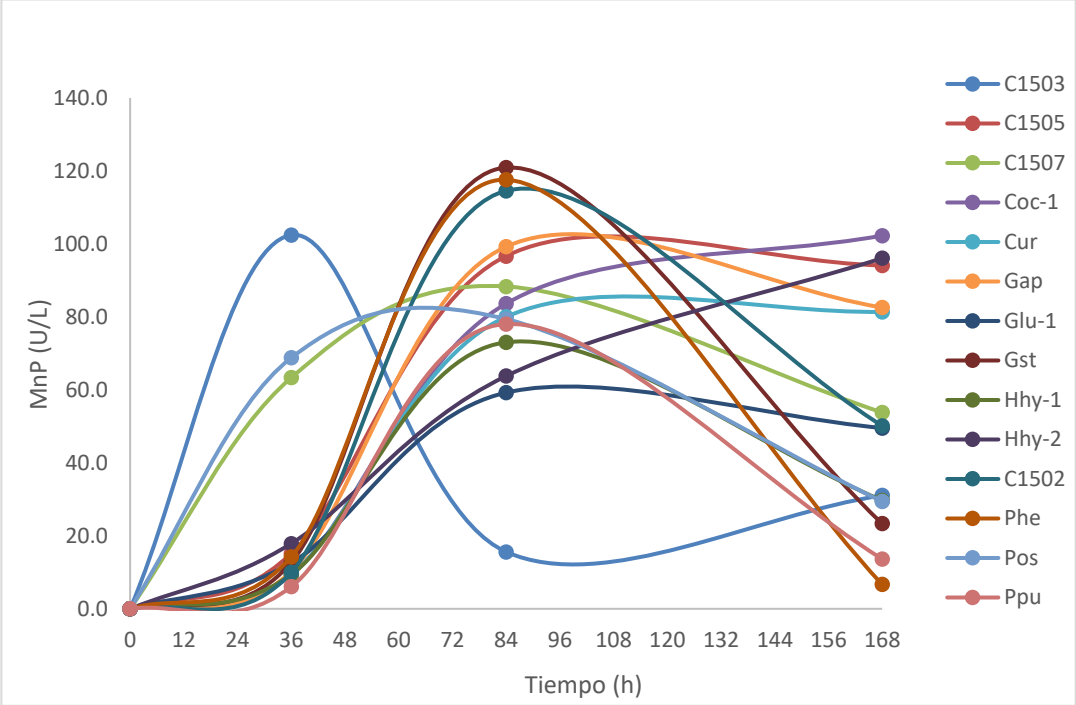


Figura 31. Actividad de MnP (U L-1) de 14 cepas aisladas de hongos de hongos autóctonos y adquiridos, en medio sumergido conteniendo madera de *M. oleifera*

Cuadro 35. Actividad de lacasa de cepas nativas y adquiridas cultivadas en medio sumergido con madera de *M. oleifera*

Hongo	Actividad de lacasa (U L^{-1})		
	36 h	84 h	168 h
Trametes sp. (C1503)	0.00 b	0.00 b	0.00 c
Pycnoporus sanguineus (C1505)	0.00 b	0.00 b	0.00 c
Trametes sp.(C1507)	0.00 b	0.00 b	0.00 c
Trametes polyzona (Coc-1)	0.00 b	17.10 a	144.90 a
Curvularia sp. (C7b)	2.62 a	3.07 b	1.37 c
Ganoderma oregonense (Gap)	0.00 b	0.00 b	0.00 c
Ganoderma lucidum G-1 (Glu)	0.14 b	14.11 a	78.38 b
Lenzites betulina (Gst)	0.00 b	0.00 b	0.00 c
Hexagonia hydnoides (Hhy-1)	0.00 b	0.00 b	0.00 c
Hexagonia hydnoides (Hhy-2)	0.00 b	0.00 b	0.00 c
Mucor circinelloides (C1502)	0.00 b	0.00 b	0.00 c
Fuscoporia mesophila (Phe)	0.00 b	0.00 b	0.00 c
Pleurotus ostreatus J-5 (Pos)	0.00 b	0.00 b	141.18 a
Pleurotus opuntiae (Ppu)	0.00 b	0.00 b	0.00 c
Hongo	Referencias		
	Medio sintético	Medio bajo en fibra	Medio alto en fibra
Curvularia clavata		29.63 [7]	
Trametes gallica	0 [6]	1294 [2]A	1417 [2]B
T. polyzona	240 [8]	119 [2]A	1780 [2]B
Ganoderma lucidum	100 [6]	27040 [1]A	61490 [1]B
Phanerochaete chrysosporium	0 [4]A	230 [4]B	650 [4]C
P. ostreatus	169 [9]	631 [2]A	73 [2]B
T. versicolor	200 [6]	1294 [2]A	769 [2]B
P. pulmonarius	660 [3]	250 [5]A	2200 [5]B

Medias que no comparten una letra en la misma columna son estadísticamente diferentes (Tukey, $p<0.05$). [1] Songulashvili y col. (2007), A en cáscaras de mandarina, B en salvado de trigo; [2] Elisashvili y col. (2008), A en cáscaras de plátano, B en hojas del árbol *Fagus sylvatica*; [3] Thiribhuvanamala y col. (2017) en medio con alcohol veratrílico; [4] Sayadi y Ellouz (1995), A con alcohol veratrílico, B con 10 ppm de desechos de oliva, C con 100 ppm de desechos de oliva; [5] Dos Santos Bazanella y col. (2013) en FES: A en mazorca de maíz, B en cáscara de piña; [6] Elisashvili y Kachlishvili (2009) con glicerol; [7] Neoh y col. (2013) en efluentes de aceite de palma; [8] Jaouani y col. (2006) en alcohol veratrílico; [9] An y col. (2018) con lignina alcalina.

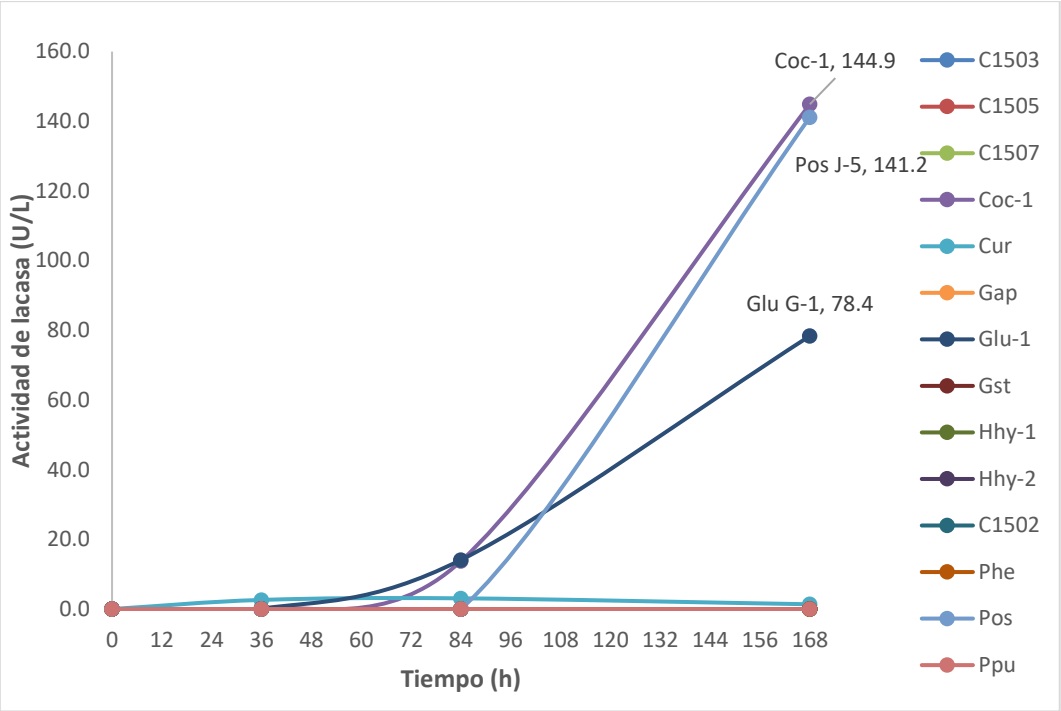


Figura 32. Actividad de lacasa de cepas de hongos nativas y adquiridas, en medio sumergido con lignocelulosa de *M. oleifera*

Para el caso de la cepa autóctona de *T. polyzona* (Coc-1), los valores obtenidos en este trabajo son similares a los de Elisashvili y col. (2008) quienes utilizaron este hongo en la biorremediación de efluentes de la cáscara de plátano. Así mismo, cuando se realizó la fermentación con hoja del árbol *Fagus sylvatica* aumentó drásticamente la actividad enzimática del hongo. Se sabe por numerosos estudios que la presencia y concentración de lignina y compuestos fenólicos tales como el alcohol veratrílico en el medio de cultivo favorecen la producción de estas enzimas, actuando como inductores. Lo anterior se ilustra en el Cuadro 35, donde se muestra que medios sintéticos que contienen ese tipo de compuestos producen niveles altos de lacasas (Jaouani y col., 2006; Elisashvili y col., 2008; Thiribhuvanamala y col., 2017; An y col., 2018). Por otro lado, como en el caso de todas las enzimas, éstas tienen cierta especificidad hacia algunos sustratos. Son de destacar los grandes niveles de producción de lacasas reportados por Songulashvili y col. (2007) para el hongo *G. lucidum*. Esta enorme diferencia respecto a lo encontrado en el presente trabajo se puede deber al tiempo en que se realizaron los muestreos. Mientras que en el trabajo realizado por los autores anteriores el muestreo se hizo el día 14, en el presente experimento fue el día 7. Este comportamiento es frecuente entre los basidiomicetes, que tienen sus máximos de producción entre el día 7 y 15 de cultivo (Elisashvili y Kachlishvili, 2009; Lueangjaroenkit y col., 2019; Kumar y Chandra, 2020). De hecho, como se verá más adelante, en un experimento realizado en la presente investigación, se obtuvieron resultados superiores a los de Songulashvili y col. (2007) con la cepa Coc-1 en condiciones optimizadas de cultivo. También es de llamar la atención que especies de hongos que han sido reportadas como productoras de lacasas, no hayan mostrado en este trabajo esa capacidad. Tal es el caso de las cepas de *P. sanguineus* C1505, *G. oregonense* y *P. pulmonarius*. Esto pudiera deberse a múltiples factores. Quizá el más importante es la adaptabilidad de las especies a distintos tipos de sustrato. Como se puede constatar en los resultados mostrados en los Cuadros 34 y 35, algunos hongos no produjeron las enzimas MnP o lacasas según el tipo y cantidad de la fuente de carbono (Sayadi y Ellouz, 1995; Elisashvili y col.,

2008; Elisashvili y Kachlishvili, 2009). En el presente experimento se utilizó madera de moringa como sustrato, la cual pudiera ser inapropiada para el crecimiento y producción de lacasa de algunas de las cepas estudiadas.

e Azúcares reductores

La producción de azúcares reductores es un indicador del grado de sacarificación de una fermentación (Isroi y col., 2011). Los datos del Cuadro 36 Figura 33 muestran que, a excepción de *G. lucidum* G-1 y de *T. polyzona* Coc-1, no se observaron cambios sustantivos en la concentración de azúcares reductores en el medio de cultivo con moringa a las 168 h. *G. lucidum* alcanzó un máximo de 0.52 mg mL^{-1}, mientras que *T. polyzona* tuvo un incremento más lento, registrándose 0.283 mg mL^{-1} en el mismo tiempo. Estos valores son ligeramente inferiores a los reportados para microorganismos tales como *Trichoderma reesei*, comúnmente utilizado industrialmente para sacarificar sustratos celulósicos. Patel y col. (2007) señalan haber obtenido 0.728 mg mL^{-1} de azúcares reductores en el pretratamiento biológico de bagazo de caña con ese hongo. Estos mismos autores obtuvieron hasta 0.95 mg mL^{-1} de azúcares en la hidrólisis realizada por el basidiomicete *Phanerochaete chrysosporium* en un medio de cultivo conteniendo 1% de bagazo de caña. Sin embargo, cuando el cultivo se desarrolló en sustrato con paja de trigo, la concentración obtenida de azúcares fue mucho menor.

Así mismo, Isikhuemhen y col. (2014) obtuvieron a los 14 días 1.25 mg mL^{-1} en la sacarificación de biomasa de biomasa de canola utilizando el hongo *Bjerkandera adusta*. En medios de cultivo sintéticos, Horisawa y col. (2019) alcanzaron 0.20 mg mL^{-1} de azúcares reductores con CMC como fuente de carbono con el hongo de pudrición blanca *Fomitopsis palustris* NBRC 30339. Además, las lacasas de una cepa o especie pueden ser diferentes a las de otra, por lo que aún en las mismas condiciones físicas y químicas pueden actuar de manera distinta (Kumar y Chandra, 2020). Por su parte, Elsebaay y col. (2018) encontraron que una cepa de *Pleurotus sapidus* produjo 0.52 mg mL^{-1} , utilizando también CMC.

Cuadro 36. Producción de azúcares reductores por cepas de hongos autóctonos en medio sumergido con madera de *M. oleifera*

Hongo	Producción de azúcares reductores (mg mL^{-1})*		
	36 h	84 h	168 h
Trametes sp. (C1503)	0.203 abc	0.113 bc	0.159 c
Pycnoporus sanguineus (C1505)	0.201 abc	0.115 bc	0.132 c
Trametes sp.(C1507)	0.196 abc	0.126 bc	0.174 c
Trametes polyzona (Coc-1)	0.209 abc	0.232 ab	0.283 b
Curvularia sp. (C7b)	0.232 a	0.105 c	0.129 c
Ganoderma oregonense (Gap)	0.223 ab	0.116 bc	0.141 c
Ganoderma lucidum G-1 (Glu)	0.152 abc	0.289 a	0.520 a
Lenzites betulina (Gst)	0.140 c	0.121 bc	0.127 c
Hexagonia hydnoides (Hhy-1)	0.149 bc	0.110 c	0.129 c
Hexagonia hydnoides (Hhy-2)	0.154 abc	0.149 bc	0.148 c
Mucor circinelloides (C1502)	0.151 bc	0.132 bc	0.132 c
Fuscoporia mesophila (Phe)	0.152 abc	0.144 bc	0.151 c
Pleurotus ostreatus J-5 (Pos)	0.157 abc	0.151 bc	0.163 c
Pleurotus opuntiae (Ppu)	0.206 abc	0.159 bc	0.165 c
Hongo	Referencias		
	Medio sintético	Medio bajo en fibra	Medio alto en fibra
Aspergillus awamori		0.396 [1]A	0.150 [1]B
Bjerkandera adusta			1.250 [4]
Trichoderma reesei		0.728 [1]A	0.180 [1]B
Phanerochaete chrysosporium		0.905 [1]A	0.140 [1]B
Pleurotus sajor-caju		0.465 [1]A	0.150 [1]B
Pleurotus sapidus	0.52 [2]		
Fomitopsis palustris	0.20 [3]A		0.30 [3]B

* Medias que no comparten una letra en la misma columna son estadísticamente diferentes (Tukey, $p<0.05$). [1] Patel y col. (2007), A con bagazo de caña, B con paja de trigo; [2] Elsebaay y col. (2018) con CMC; [3] Horisawa y col. (2019), A con CMC, B con aserrín de cedro japonés (*Cryptomeria japonica*); [4] Isikhuemhen y col. (2014) en biomasa de planta de canola.

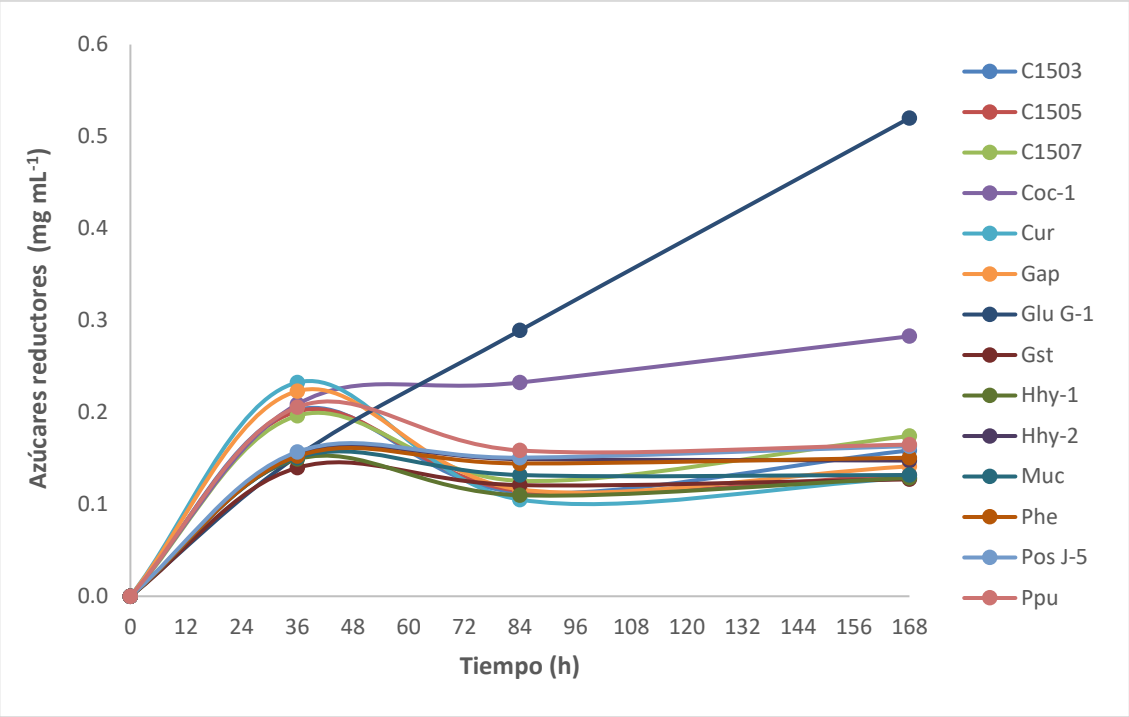


Figura 33. Producción de azúcares reductores de cepas de hongos en medio sumergido con lignocelulosa de *M. oleifera*

7 Selección de cepa para el pretratamiento

Debido a su destacada capacidad de producción de enzimas lignolíticas mostradas en el presente experimento, en particular, lacasas, así como por su buena producción de xilanasas, se seleccionó la cepa autóctona del hongo *Trametes polyzona* Coc-1 para la realización de experimentos posteriores tendientes a optimizar la producción de lacasas en medio sumergido, conteniendo madera de *Moringa oleifera* como fuente de carbono y asimismo la capacidad de dichas enzimas en la eliminación de la lignina.

C OPTIMIZACIÓN DE CONDICIONES DE CULTIVO DE *T. polizona* COC-1 PARA LA PRODUCCIÓN DE LACASAS

1 Optimización de pH, temperatura y cobre

En el experimento anterior las condiciones de pH, temperatura y concentración del ion Cu^{+2} fueron fijadas a valores considerados apropiados para la mayoría de las especies de hongos. Durante el presente paso del experimento se buscó encontrar mediante la metodología de superficie de respuesta, los valores más apropiados de 3 de los factores más importantes para el crecimiento de *T. polyzona* Coc-1: temperatura, pH y concentración del ion Cu^{+2} .

Los valores de actividad enzimática y el modelo de regresión que representan la producción de las lacasas producidas a las 168 h se muestran en los Cuadros 37 y 38, respectivamente. Como se puede constatar en estas tablas, *T. polyzona* Coc-1 produjo mayor cantidad de lacasas entre 32.0 y 34.0 °C, concentraciones de Cu^{+2} de 0.5 a 1.0 mM y a pH entre 4.75 y 5.20.

Como se puede constatar en el Cuadro 38, el modelo de regresión de superficie de respuesta fue altamente significativo para los tres factores estudiados, encontrándose un R^2 de 98.6% y un R^2 ajustado de 97.34%.

La ecuación de regresión del modelo obtenida fue:

$\mathbf{AE_{168\,h}}$ = 679 - 141.5 pH - 17.21 Temperatura - 226.8 [Cu] + 3.66 pH*pH + 0.0219 Temperatura*Temperatura - 102.72 [Cu]*[Cu] + 3.382 pH*Temperatura + 6.36 pH*[Cu] + 11.24 Temperatura*[Cu]

[Cu] = concentración de $CuSO_4{\cdot}5H_2O$

La ecuación cuadrática mostró significancia para el factor [Cu]*[Cu] e interacción significativa entre los factores pH*Temperatura y Temperatura*[Cu]. Al observarse esta gran interacción del factor concentración de cobre, se decidió para la siguiente etapa no fijarlo, sino considerarlo como un factor más de los ocho a estudiar, previendo una posible interacción con alguno de los otros factores utilizados.

Cuadro 37. Actividad de lacasa de *T. polyzona* Coc-1 a las 168 h en medio sumergido con *M. oleifera* en un diseño de superficie de respuesta para los factores pH, temperatura y concentración molar de cobre

Tratamiento	pH	Temperatura	[Cu]	$AE_{168\,h}$ (U L^{-1})
1	5.50	29.0	0.50	115.2
2	4.30	32.0	0.80	139.4
3	5.20	26.0	0.20	79.7
4	4.75	29.0	0.50	115.9
5	4.75	29.0	0.00	73.8
6	4.75	34.0	0.50	140.0
7	4.75	29.0	0.50	115.4
8	4.75	29.0	0.50	111.7
9	5.20	26.0	0.80	76.7
10	4.75	24.0	0.50	88.6
11	4.75	29.0	0.50	111.8
12	4.75	29.0	0.50	114.4
13	4.75	29.0	1.00	102.3
14	4.75	29.0	0.50	110.9
15	5.20	32.0	0.80	142.0
16	4.00	29.0	0.50	116.4
17	5.20	32.0	0.20	105.6
18	4.30	32.0	0.20	106.0
19	4.30	26.0	0.20	98.4
20	4.30	26.0	0.80	91.6

Cuadro 38. . Regresión de superficie de respuesta: AE de lacasas de *T. polyzona* Coc-1 a las 168 h vs. pH, temperatura y concentración molar de cobre

FUENTE	G L	SC AJUSTADO	MC AJUSTADO	VALOR F	VALOR P
MODELO	9	7113.56	790.40	78.23	0.000
Lineal	3	4917.76	1639.25	162.24	0.000
pH	1	81.87	81.87	8.10	0.017
Temperatura	1	3981.30	3981.30	394.04	0.000
[Cu]	1	854.59	854.59	84.58	0.000
Cuadrado	3	1239.78	413.26	40.90	0.000
pH*pH	1	7.62	7.62	0.75	0.406
Temperatura*Temperatura	1	0.54	0.54	0.05	0.822
[Cu]*[Cu]	1	1187.98	1187.98	117.58	0.000
Interacción de dos factores	3	956.03	318.68	31.54	0.000
pH*Temperatura	1	160.85	160.85	15.92	0.003
pH*[Cu]	1	5.69	5.69	0.56	0.470
Temperatura*[Cu]	1	789.49	789.49	78.14	0.000
ERROR	10	101.04	10.10		
Falta de ajuste	5	77.74	15.55	3.34	0.106
Error puro	5	23.30	4.66		
TOTAL	19	7214.60			

S	R^2	R^2 Ajustado	R^2 predicho
3.1763	98.60%	97.34%	91.35%

En la Figura 34, en el inciso (a) se constata, la gran influencia de la temperatura en la producción de lacasa, observándose un incremento constante hasta los 34 °C que es el límite superior del rango. En cambio, En el inciso (b) se aprecia poca variación atribuible al pH, no habiendo prácticamente interacción para la producción de lacasa entre los factores concentración de $CuSO_4$ y pH, por lo que se obtuvo una máximo de producción de esta enzima de 110 U L^{-1} a 29 °C. En el inciso c se puede advertir que las mayores concentraciones de lacasa se alcanzaron en donde se combinaron la mayor temperatura (34 °C) y alrededor de 0.9 mM de $CuSO_4$. Un análisis de predicción realizado sobre los resultados con el paquete estadístico Minitab® 17, mostrados en el Cuadro 39, confirmó los valores óptimos pronosticados de temperatura, pH, y concentración de cobre observados en las figuras señaladas, los cuales fueron 34 °C, 5.5 y 0.93 mM, respectivamente. Estos valores indican, que se pronostica, en caso de aplicarlos (intervalo de confianza del 95%) una respuesta de actividad enzimática de 171.90 U L^{-1} a las 168 horas de cultivo. Al contrario de lo encontrado en esta investigación, la mayoría de los trabajos realizados con la especie estudiada, reportan temperaturas de incubación inferiores a 30 °C (Songulashvili y col., 2007; Elisashvili y col., 2008; Pinar y col., 2017). Es interesante señalar que las especímenes utilizados en esos estudios provenían de lugares de clima templado, a diferencia de la cepa Coc-1 de este trabajo, cuyo origen es la comunidad de Elota, Sinaloa, lugar subtropical, con temperaturas máximas en verano promedio mayores de 32 °C (INIFAP, 2018). En lo que concierne al pH, los valores óptimos encontrados se encuentran dentro de los mismos rangos que los utilizados en la literatura señalada anteriormente. Respecto a la concentración de cobre en el medio de cultivo, no se encontraron reportes sobre la concentración óptima para la producción de lacasas de esta especie. No obstante, algunos estudios con especies del género *Trametes* reportan valores próximos a 0.8 mM (Rosales y col., 2007; Román y col., 2010), lo cual es muy cercano a lo encontrado en este trabajo.

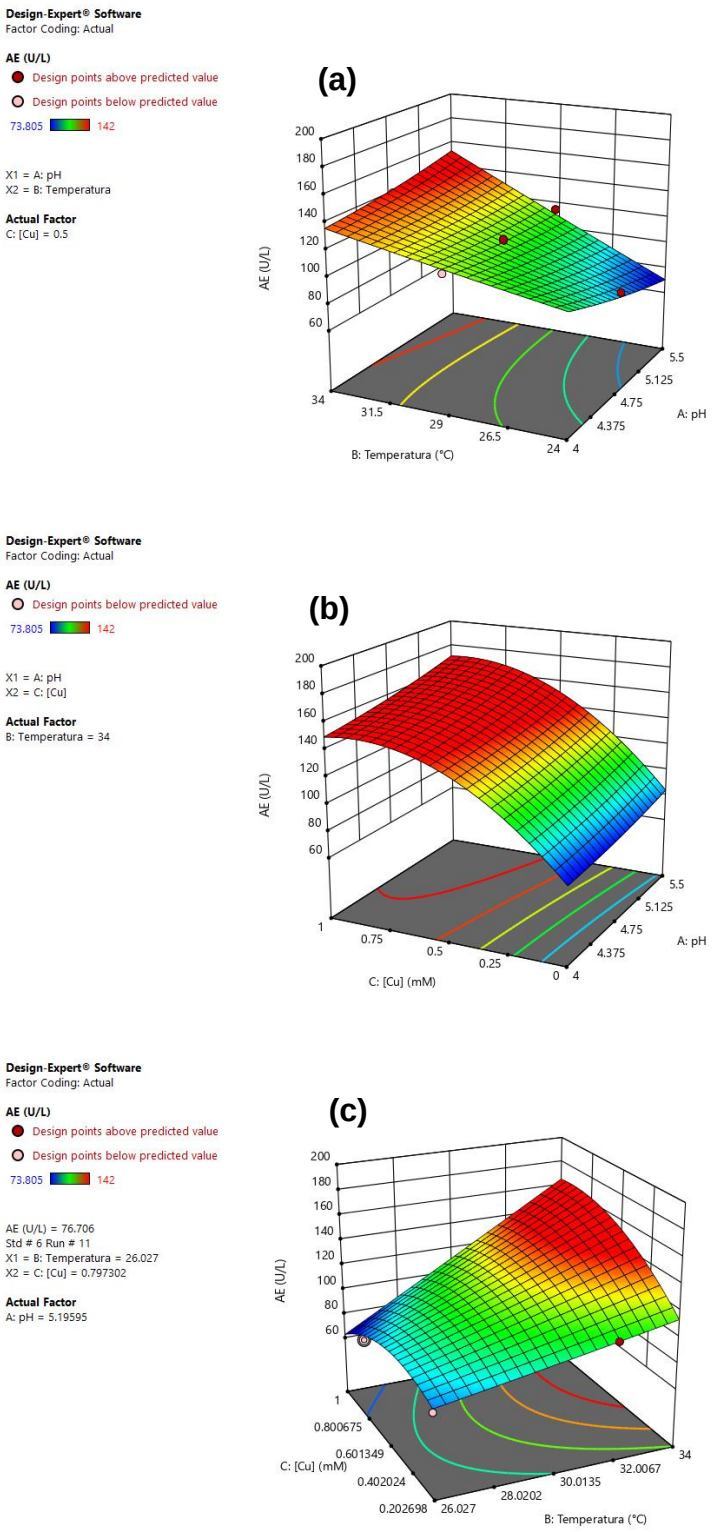


Figura 34. Gráfica de superficie de respuesta para la actividad de lacasa (a) pH*Temperatura; (b) pH*[Cu] y (c) Temperatura*[Cu]

Cuadro 39. Valores pronosticados óptimos de producción de lacasas por *T. polyzona* obtenidos del modelo de superficie de respuesta a las 168 h

Variable	Valor de configuración				
pH	5.50				
Temperatura	34.00				
[Cu]	0.929				
Valores ajustados	Respuesta AE 168 h	Ajuste 171.90	EE de ajuste 6.37	IC de 95% (157.72,186.09)	IP de 95% (156.05,187.76)

EE = error estándar; IC = intervalo de confianza; IP = intervalo de predicción

Es importante señalar que no se encontraron reportes científicos sobre la optimización de las condiciones de optimización de temperatura, pH y concentración de cobre para la producción de lacasas por *T. polyzona*.

2 Optimización de nutrientes

En el Cuadro 40 se muestran los resultados de la aplicación del modelo ortogonal de Taguchi para determinar el efecto de 8 factores seleccionados en la producción de lacasa por *T. polyzona* en cultivo en medio sumergido. Como se puede observar, el tratamiento 12 destacó significativamente sobre todos los demás, alcanzando 68842 U L^{-1} de lacasa a los 11 días a 34 °C y pH 5.5.

Es importante señalar que todos los tratamientos que usaron extracto de levadura (1–2%) obtuvieron mayores rendimientos de lacasa, aumentando hasta 151.3 veces (Trat12/Trat1) el rendimiento de la enzima respecto a tratamientos en donde no se utilizó. El extracto de levadura es un suplemento utilizado en microbiología por su alto contenido de proteínas, vitaminas, minerales y otros metabolitos importantes para el desarrollo de muchos microorganismos. En segunda posición de importancia estuvieron los tratamientos que contenían, aparte de extracto de levadura, los mayores niveles de $MgSO_4$. Por el contrario, en los tratamientos en que se aplicó mayor concentración de KH_2PO_4 se observó un efecto negativo sobre la producción de lacasa.

3 Análisis del modelo y predicción

a Análisis del modelo

El resumen de dicho análisis de varianza con el porcentaje de contribución de cada factor y sus interacciones se muestra en el Cuadro 41. La comparación realizada con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$. Un valor de P mayor que 0.05, indica que la contribución de ese factor es insignificante o despreciable. Los resultados obtenidos muestran que todos los factores tuvieron un efecto significativo sobre la producción de lacasa. La contribución porcentual se calculó para cada factor individual mediante la relación entre una suma pura y la suma total de los cuadrados.

Cuadro 40. Actividad de lacasa de *T. polyzona* Coc-1 en medio sumergido con *M. oleifera* y otros nutrientes en un modelo de Taguchi

	Factores (%)								Actividad de lacasa (U L^{-1})			
Trat	$MnSO_4$	Glucosa	Tallo de Moringa	$(NH_4)_2SO_4$	Extracto de levadura	KH_2PO_4	$CuSO_4$	$MgSO_4$	**5 d**	**6 d**	**7 d**	**11 d**
1	0.015	1.0	2.0	0.0	0.0	1.5	0.01	0.05	61	137	181	455 ± 157 h
2	0.015	1.0	2.5	0.5	1.0	2.0	0.02	0.10	1493	4625	5886	44750 ± 2684 cd
3	0.015	1.0	3.0	1.0	2.0	2.5	0.03	0.15	164	2736	5035	50273 ± 850 c
4	0.015	1.5	2.0	0.0	1.0	2.0	0.03	0.15	355	1958	3075	47617 ± 2001 cd
5	0.015	1.5	2.5	0.5	2.0	2.5	0.01	0.05	205	1839	4254	27781 ± 1572 e
6	0.015	1.5	3.0	1.0	0.0	1.5	0.02	0.10	733	1413	1867	7412 ± 1158 fg
7	0.015	2.0	2.0	0..5	0.0	2.5	0.02	0.15	229	325	763	10904 ± 3347 f
8	0.015	2.0	2.5	1.0	1.0	1.5	0.03	0.05	1089	3746	5222	43134 ± 1848 d
9	0.015	2.0	3.0	0.0	2.0	2.0	0.01	0.10	31	1972	4356	30147 ± 2768 e
10	0.025	1.0	2.0	1.0	2.0	2.0	0.02	0.05	734	4242	6006	49110 ± 4099 cd
11	0.025	1.0	2.5	0.0	0.0	2.5	0.03	0.10	110	150	458	3072 ± 741 gh
12	0.025	1.0	3.0	0.5	1.0	1.5	0.01	0.15	1386	4341	10139	68842 ± 1168 a
13	0.025	1.5	2.0	0.5	2.0	1.5	0.03	0.10	976	3785	9264	58862 ± 2565 b
14	0.025	1.5	2.5	1.0	0.0	2.0	0.01	0.15	429	2513	7043	9403 ± 570 fg
15	0.025	1.5	3.0	0.0	1.0	2.5	0.02	0.05	32	1045	1800	30865 ± 2827 e
16	0.025	2.0	2.0	1.0	1.0	2.5	0.01	0.10	983	3168	3919	27617 ± 2677 e
17	0.025	2.0	2.5	0.0	2.0	1.5	0.02	0.15	1137	3662	4597	42873 ± 789 d
18	0.025	2.0	3.0	0.5	0.0	2.0	0.03	0.05	412	1183	1769	4122 ± 221 gh

* Medias que no comparten una letra en la misma columna son estadísticamente diferentes (Tukey, $p<0.05$) .

Cuadro 40. ANDEVA del modelo general lineal para la actividad de lacasa utilizando diferentes nutrientes a los 11 días de crecimiento

Fuente	GL	Contribución	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor P
Extr. de levadura	2	74.76%	16965662607	8482831303	1338.12	<0.0001
MgSO4·7H2O	2	6.72%	1524096805	762048403	120.21	<0.0001
KH2PO4	2	5.78%	1310801923	655400961	103.39	<0.0001
(NH4)2SO4	2	4.25%	965169438	482584719	76.12	<0.0001
Glucosa	2	3.75%	850527406	425263703	67.08	<0.0001
CuSO4·5H20	2	2.11%	478350758	239175379	37.73	<0.0001
MnSO4·H2O	1	0.97%	220234777	220234777	34.74	<0.0001
Tallo de moringa	2	0.60%	136791353	68395676	10.79	<0.0002
Error	38	1.06%%	240896377	6339378		<0.0001
Falta de ajuste	2	0.72%	240896377	82204071	38.69	0.0000
Error puro	36	0.34%	84874745	2124673		
Total	53	100.00%				

S	R^2	R^2 Ajustado	R^2 predicho
2517.31	98.94%	98.52%	97.86%

AE = 30673 - 2020 [Mn]_0.015 + 2020 [Mn]_0.025 + 4975 [GLU]_1.0 - 238 [GLU]_1.5 - 4737 [GLU]_2.0 + 1401 [TMO]_2.0 - 2226 [TMO]_2.5 + 825 [TMO]_3.0 - 5436 [NH4]_0.0 + 4873 [NH4]_0.5 + 563 [NH4]_1.0 - 25042 [EXLEV]_0.0 + 13489 [EXLEV]_1.0 + 11553 [EXLEV]_2.0 + 6379 [PO4]_1.5 - 763 [PO4]_2.0 - 5617 [PO4]_2.5 - 3487 [Cu]_0.01 - 298 [Cu]_0.02 + 3785 [Cu]_0.03 - 5142 [Mg]_0.05 - 2174 [Mg]_0.10 + 7315 [Mg]_0.15

El factor más influyente fue el porcentaje de extracto de levadura, que representó el 74.92% de la varianza general de los datos experimentales, seguido de $MgSO_4$ (6.65%), KH_2PO_4 (5.63%), $(NH_4)_2SO_4$ (4.14%), glucosa (3.81%), $CuSO_4 \cdot 5H_20$ (2.15%), $MnSO_4 \cdot H_2O$ (0.76%) y tallo de moringa (0.55%). Los porcentajes de contribución más bajos fueron los del $MnSO_4 \cdot H_2O$ y del tallo de moringa, no obstante, los valores de P obtenidos para ambos indican que sus efectos fueron significativos para la producción de lacasa.

El valor P global es <0.0001 y el valor F 38.69 (valor F del modelo > valor p), indican, así como la prueba para aceptación del modelo realizada con el paquete estadístico Design Expert® 12, donde se calculó la relación señal / ruido Adeq Precision, donde se obtuvo un valor de 48.233 (muy superior a la mínima aceptable de 4), indican que el modelo es significativo. Así mismo, el alto coeficiente de correlación (R^2 = 0.9894), así como los valores p y F del modelo y el valor de precisión obtenidos prueban que el modelo propuesto podría usarse para navegar en el espacio de diseño. Los resultados también fueron clasificados basados en estadísticas Delta, las cuales comparan la magnitud relativa de los efectos de los diversos factores (Cuadro 42). La estadística Delta se obtiene de restarle al mayor, el menor promedio para cada factor. A mayor valor de Delta, más contribución tiene el factor respectivo. Esta forma de realizar el análisis coincide totalmente en el orden de contribución descrito anteriormente.

La Figura 35 muestra el comportamiento de los efectos principales de los 18 tratamientos. En ella podemos observar que los factores extracto de levadura, $MgSO_4$ y $CuSO_4$, tuvieron un efecto positivo en la producción de lacasa dentro de los rangos de concentración estudiados. Lo contrario se observó con KH_2PO_4 y glucosa donde el efecto en la producción de lacasa fue inversamente proporcional a la concentración del soluto. Esto concuerda con lo señalado por Galhaup y col. (2002) quienes señalan que a partir de ciertas concentraciones de glucosa en el medio de cultivo, se ejerce un efecto inhibidor sobre la actividad de la enzima lacasa.

Cuadro 41. Orden de contribución de factores utilizando el valor Delta

Nivel	$MnSO_4$	Glucosa	Tallo de Moringa	$(NH_4)_2SO_4$	Extracto levadura	KH_2PO_4	$CuSO_4$	$MgSO_4$
1	28535	35693	32007	25281	5508	36930	27175	25520
2	32729	30323	28502	35491	44161	29910	30208	28443
3	25880	31386	31124	42226	25056	34513	37932	
Delta	4195	9813	3505	10210	38653	11874	7339	12412
Clasif.	7	5	8	4	1	3	6	2

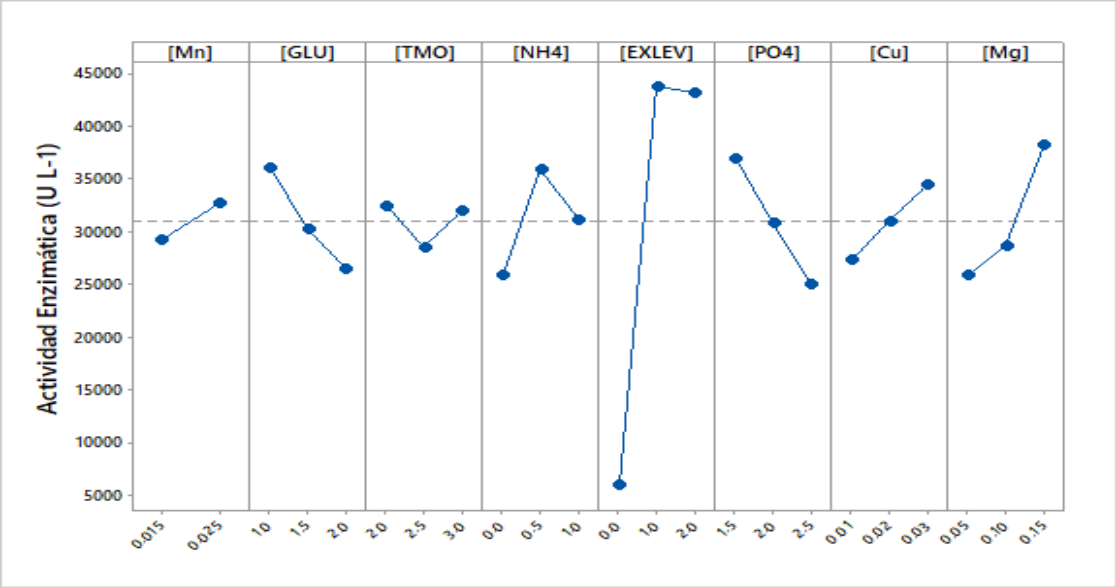


Figura 35. Gráfica de efectos principales sobre medias de los tratamientos

En cambio, se pudo constatar un efecto combinado en los factores extracto de levadura y $(NH_4)_2SO_4$, donde primero se apreció un aumento y luego una disminución en la actividad de lacasa a los niveles altos de estos nutrientes. Lo anterior pudiera deberse a interacciones como se puede apreciar en la Figura 36, donde se observa que los factores KH_2PO_4, $(NH_4)_2SO_4$, glucosa, $CuSO_4$ y tallo de moringa interactuaron fuertemente entre ellos a los niveles altos, probablemente debido a estrés osmótico, ya que son los que mayor cantidad de solutos aportan al medio de cultivo.

b Predicción de niveles óptimos

Mediante la aplicación del paquete estadístico Minitab® 17, introduciendo los niveles óptimos de cada factor considerado en el arreglo ortogonal, se obtuvieron las predicciones mostradas en el Cuadro 43. Los valores predichos mediante Minitab® 17 coinciden con los obtenidos mediante el paquete estadístico Design Expert® 12. En el cuadro mencionado también se presentan los valores correspondientes al Tratamiento 12, que resultó el de mayor rendimiento en el paso 2 del diseño de Taguchi. Como se puede observar, la diferencia entre los valores de los niveles del tratamiento 12 y los optimizados fueron solamente en los factores tallo de moringa y $CuSO_4$. La relación S/R pronosticada mediante Minitab® 17 para estos valores optimizados fue muy alta (97.5632), por lo que se pueden considerar adecuados. Aplicando estos niveles se esperaría obtener 76691 U L^{-1} de lacasa. Mediante Design Expert® el cálculo obtenido por el método numérico arroja un valor de 74910.6 U L^{-1}.

4 Validación

En resumen, hasta este punto de los experimento las condiciones de cultivo optimizadas serían: temperatura = 34 °C, pH = 5.5 y concentración de $CuSO_4$ (0.929 mM). Utilizando los niveles de los factores obtenidos en el paso 3 anterior (Cuadro 43) se realizó el experimento correspondiente, obteniéndose los resultados que se presentan en el Cuadro 44 y Figura 37. En ellos se puede constatar que efectivamente el tratamiento optimizado alcanzó un valor máximo de producción de lacasa al día 11 de 74139, contra 69622 U L^{-1} del tratamiento 12, lo que representa un incremento de 6.49%.

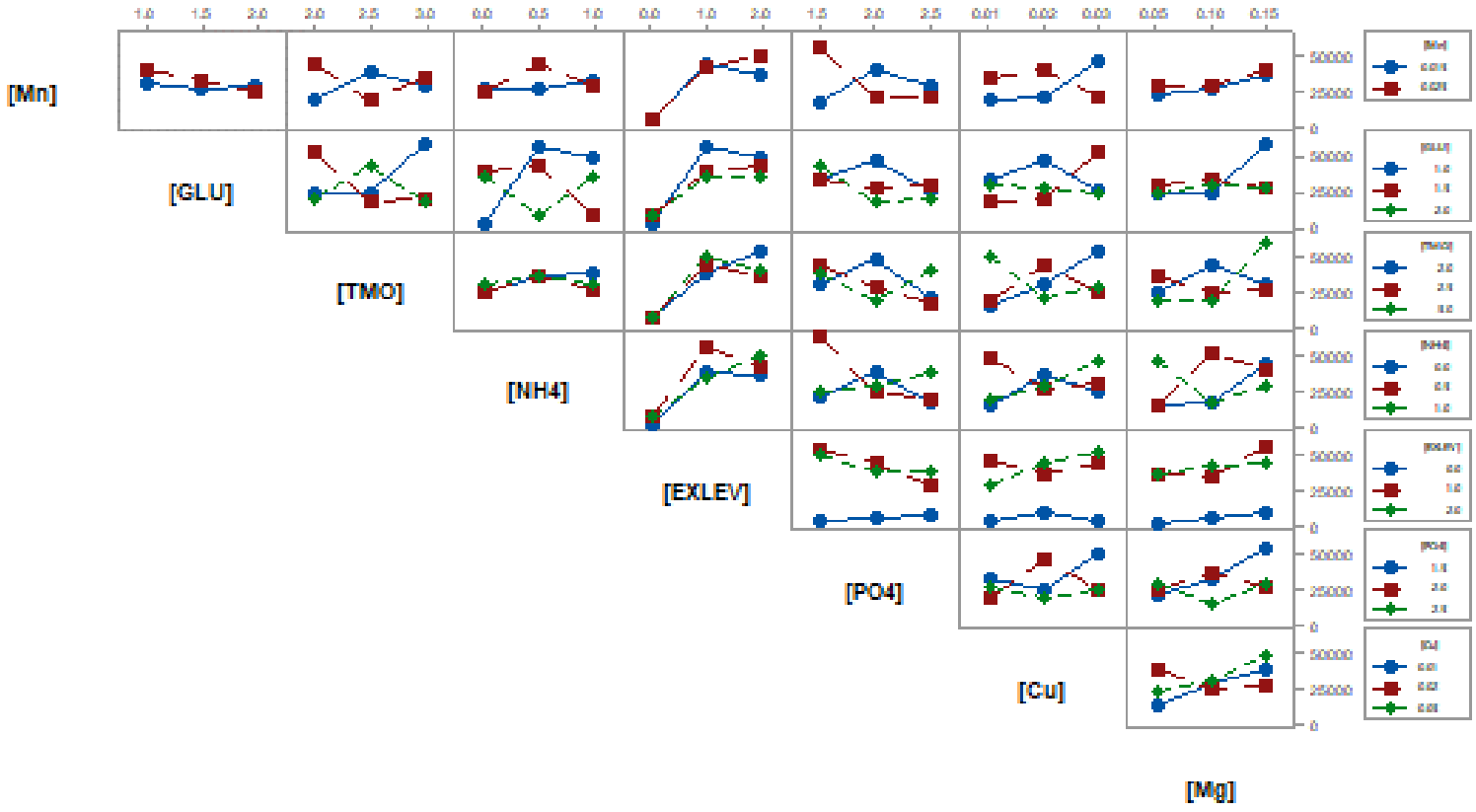


Figura 36. Interacciones entre factores para la producción de lacasas de *T. polyzona* en medio sumergido

Cuadro 42. Niveles óptimos de factores y rendimiento predicho de lacasa

Tratamiento	$MnSO_4$	Glucosa	Tallo de Moringa	$(NH_4)_2SO_4$	Extracto de levadura	KH_2PO_4	$CuSO_4$	$MgSO_4$
Tratamiento 12	0.025	1.00	3.00	0.50	1.00	1.50	0.01	0.15
Optimizado	0.025	1.00	2.00	0.50	1.00	1.50	0.03	0.15

Relación S/R	Media pronosticada	Desv. Estándar	Ln (Desv. Estándar)
97.5632	76691.0	1762.55	7.7378

El pronóstico estimado mediante Minitab ® 17 era de 76691 U L^{-1}, mientras que con Design Expert® 12 fue de 74910.6 U L^{-1} por lo que sólo hubo un error de menos de 1% por debajo de lo pronosticado, por lo que este resultado valida el modelo. La actividad de lacasa obtenida a través de experimentos de confirmación están dentro del 95% del nivel de confianza y por lo tanto en correlación con el resultado previsto. Es importante señalar que el tratamiento optimizado todavía aumentó la producción de lacasa el día 12, a donde alcanzó su máximo de 74665 U L^{-1}. Es interesante analizar la influencia en el tiempo de los factores que intervienen en las formulación del medio de cultivo.

En este caso, se observa que, si bien el tratamiento 12 inició siendo más productivo en lacasa en los primeros 10 días de la fermentación, a partir del día 11 la producción de la enzima se disparó en el tratamiento optimizado, superando al tratamiento 12 hasta el día 12, alcanzando niveles finales más altos. Lo anterior pudiera deberse al efecto de la concentración mayor de $CuSO_4$ del medio optimizado respecto a la del tratamiento 12, lo cual es consistente con lo reportado por Akpinar y Ozturk-Urek (2017) al optimizar las concentraciones de los iones Cu^{+2}, Fe^{+2} y Mn^{+2} en la producción de lacasa por el hongo *Pleurotus eryngii* en residuos de durazno. Dichos autores encontraron, por ejemplo, que una concentración 70 µM de Cu^{+2} producía las mayores cantidades de lacasa el día 17 de fermentación, aun cuando los demás niveles del ion iniciaron produciendo más enzima. En el presente trabajo se pudo constatar que una de las diferencias entre el tratamiento 12 y el optimizado fue precisamente que en este último la concentración de Cu^{+2} fue 3 veces mayor. Esto puede explicarse por el hecho de que al ser las lacasas enzimas que contienen cobre, al momento de mayor producción de la enzima, en este caso los días 11 y 12, se requirieron las mayores cantidades de cobre disponibles. En otros experimentos sobre la producción de lacasa por basidiomicetes se han reportado valores muy cercanos a los obtenidos en el presente trabajo. Songulashvili y col. (2007) en FMS de *G. lucidum* 447 alcanzaron rendimientos de 61490 U L^{-1} de lacasa usando residuos de fermentación de trigo como sustrato y fuentes de nitrógeno como tartrato de amonio, KNO_3, $(NH_4)_2SO_4$, NH_4NO_3, y peptonas.

Cuadro 43. Cinética de producción de lacasa (U L-1) del tratamiento optimizado y del testigo (tratamiento 12)

Tratamiento/Día	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**
Optimizado ±EE	811 ±242	4488 ±1216	9401 ±396	19681 ±1803	35484 1387	47963 ±708	**74139[a]** **±1397**	**74665[a]** **±536**	70395 ±285	64675 ±822	58979 ±1926
Tratamiento 12 ±EE	1788 1018	7771 ±1459	14941 ±1328	27000 ±4141	40740 ±1371	55308 ±4185	**69622[b]** **±487**	**65619[b]** **±685**	61572 ±476	57200 ±1523	54760 ±542

* Medias que no comparten una letra en la misma columna son estadísticamente diferentes (Tukey, $p<0.05$). EE = error estándar.

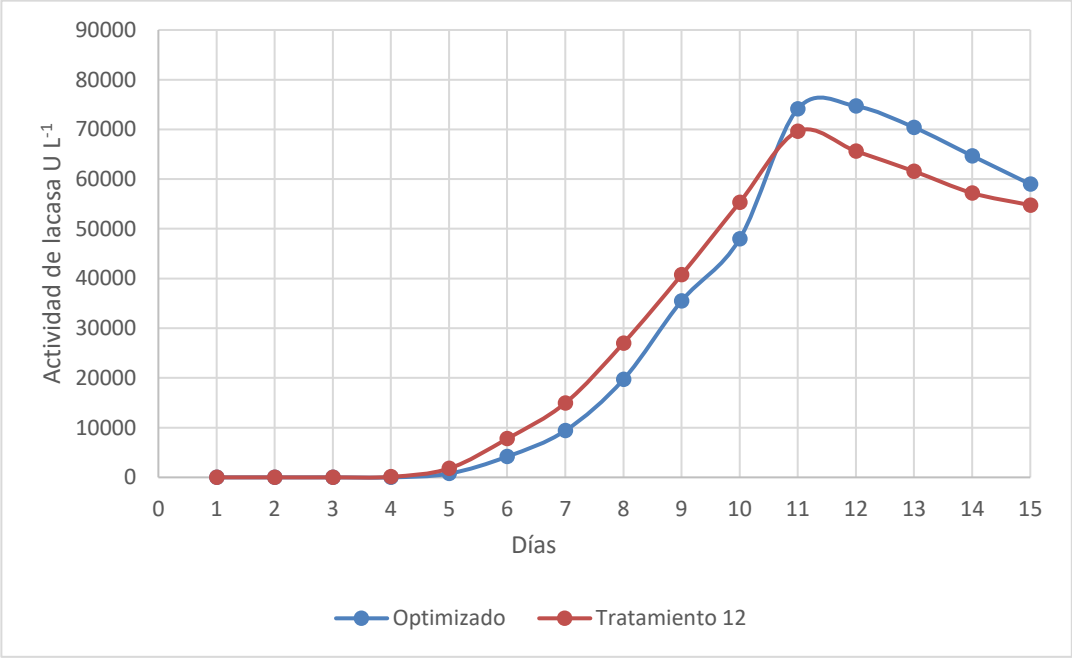


Figura 37. Cinética para la producción de lacasas de *T. polyzona* Coc-1 a las condiciones óptimas predichas comparadas con el mejor tratamiento de la etapa previa (Tratamiento 12)

Aunque no se encontraron referencias sobre optimización del medio de cultivo para la producción de lacasas de *T. polyzona*, si hay reportes para otras especies de basidiomicetes, tales como los de Chiranjeevi y col. (2014), quienes mejoraron la producción de lacasa de *P. ostreatus* hasta 3.7 veces, alcanzando 12124 U L^{-1} por optimización con la metodología de superficie de respuesta de los niveles de pH, glucosa, fibra de trigo, peptona, urea y 2,5-xilideno, este último utilizado como estimulador de la producción de lacasa.

Por otra parte, Chenthamarakshan y col. (2017) con la seta *Marasmiellus palmivorus* LA1 en fermentación en estado sólido (FES) aumentaron la producción de lacasa hasta 17.6 veces aplicando la metodología de Taguchi, al variar la concentración de 7 factores, entre ellos $NH_4H_2PO_4$, galactosa y CuSO4, obteniendo 667.4 IU mL^{-1}. Este último valor de concentración equivaldría a 106784 U L^{-1}, si se considera que se utilizaron 40 mL de líquido para extraer del medio sólido la enzima producida, mientras que en las fermentaciones en medio sumergido se utilizaron 250 mL (6.25 veces más diluido). El valor calculado está dentro del orden de lo obtenido en el presente trabajo de investigación. También en estado sólido, Hariharan y Nambisan (2012), optimizando la producción de lacasa por *G. lucidum* en sustrato de hojas de piña, produjeron 472.31 U mL^{-1}, que equivalen aproximadamente a 75570 U L^{-1}, valor muy similar al obtenido en este trabajo de investigación.

5 Capacidad de remoción de lignina

Los resultados del experimento realizado para medir la capacidad lignolítica del extracto crudo del cultivo en medio sumergido de *T. polyzona* en tallo de *M. oleifera* se presentan en el Cuadro 45. Es necesario aclarar que, aunque solamente se optimizó la actividad de lacasa y se cuantificó esta enzima en el extracto, otras enzimas secretadas por *T. polyzona*, tales como MnP y xilanasas pudieron haber participado en la deslignificación, aunque en menor grado, ya que como se discutió anteriormente, éstas disminuyeron su producción y actividad enzimática antes del día 15 de fermentación y por lo tanto podemos asumir que no se encontraban presentes en cantidades importantes en el día de la toma de la alícuota utilizada para el presente experimento. Como se puede constatar, de acuerdo con los resultados

presentados en el Cuadro 45, todos los tratamientos produjeron reducción en la cantidad de lignina presente en la madera de moringa. En el mismo, cada tratamiento representó una combinación de uno de los 4 niveles del factor Tiempo de incubación (4, 8, 24 y 48 h) y concentración de lacasa agregada (100, 200 y 400 U L^{-1}). Partiendo de un contenido inicial de 30.17% de lignina, en tan sólo 4 h se apreció un efecto de remoción de ésta, alcanzándose un máximo a las 48 h de incubación. Sin embargo, antes de ese tiempo, a las 24 h, con el Tratamiento 9 (400 U/L de lacasa) se observó un resultado estadísticamente similar ($p<0.05$). Si bien en el presente experimento no se muestreó entre las 8 y 24 h, de acuerdo con la Figura 38, obtenida de la ecuación del modelo, se puede predecir que es posible alcanzar niveles altos de lacasa en ese periodo de tiempo. Lo anterior es importante, ya que sería útil en caso de utilizarse el extracto en un bioproceso tal como la producción de etanol de segunda generación, al acortarse el tiempo de pretratamiento.

Como se puede deducir del análisis de varianza realizado al modelo general lineal presentado en el Cuadro 46, los factores tiempo y concentración de lacasas tuvieron efecto significativo ($p<0.05$) sobre la remoción de la lignina del tallo de *M. oleifera*, obteniéndose una R^2 alta (92.34). La ecuación obtenida del modelo general lineal es la siguiente:

$$\begin{aligned}\text{Lignina removida (\%)} = {} & 29.0763 - 2.808\ \text{Trat_1} - 1.948\ \text{Trat_2} + 0.165\ \text{Trat_3} - 1.452\ \text{Trat_4} \\ & - 0.766\ \text{Trat_5} + 0.530\ \text{Trat_6} + 0.159\ \text{Trat_7} + 0.939\ \text{Trat_8} \\ & + 1.590\ \text{Trat_9} + 0.720\ \text{Trat_10} + 1.225\ \text{Trat_11} + 1.646\ \text{Trat_12}\end{aligned}$$

El modelo de regresión general que mejor se ajustó a los resultados obtenidos fue cuadrático, el cual se presenta en el Cuadro 47 y se describe en la ecuación siguiente, donde aparte de los factores lineales, se seleccionaron las cuadráticas Tiempo*Tiempo y Tiempo*Lacasas:

$$\begin{aligned}\text{Lignina removida (\%)} = {} & 25.819 + 0.2014\ \text{Tiempo} + 0.0\ \text{Lacasas (U/L)_100} \\ & + 0.841\ \text{Lacasas (U/L)_200} + 2.653\ \text{Lacasas (U/L)_400} \\ & - 0.002457\ \text{Tiempo*Tiempo} + 0.0\ \text{Tiempo*Lacasas (U/L)_100} \\ & - 0.00635\ \text{Tiempo*Lacasas (U/L)_200} \\ & - 0.03932\ \text{Tiempo*Lacasas (U/L)_400}\end{aligned}$$

Cuadro 44. Deslignificación de tallos de *M. oleifera* con extracto enzimático

Tratamiento	Tiempo (h)	Lacasas (U L^{-1})	Lignina final (%)	Remoción de lignina (%)
1	4	100	21.509 ±0.032	26.268 ±0.111 h
2	4	200	21.258 ±0.0715	27.129 ±0.245 g
3	4	400	20.642 ±0.0925	29.241 ±0.317 e
4	8	100	20.963 ±0.012	27.624 ±0.080 g
5	8	200	20.913 ±0.025	28.310 ±0.085 f
6	8	400	20.535 ±0.088	29.607 ±0.302 de
7	24	100	20.643 ±0.083	29.236 ±0.285 e
8	24	200	20.416 ±0.034	30.015 ±0.116 bcd
9	24	400	20.226 ±0.053	30.666 ±0.182 ab
10	48	100	20.480 ±0.120	29.797 ±0.413 cde
11	48	200	20.333 ±0.050	30.301 ±0.172 abc
12	48	400	20.210 ±0.038	30.722 ±0.132 a

Así mismo, la ecuación general de regresión se puede dividir en las tres ecuaciones individuales siguientes, una para cada nivel del factor “Lacasas”:

Lacasas (U/L)	
100	Lignina removida (%) = 26.061 + 0.1956 Tiempo - 0.002450 Tiempo*Tiempo
200	Lignina removida (%) = 26.663 + 0.1947 Tiempo - 0.002450 Tiempo*Tiempo
400	Lignina removida (%) = 28.475 + 0.1617 Tiempo - 0.002450 Tiempo*Tiempo

Dichas ecuaciones están representadas gráficamente en la Figura 39.

Los valores obtenidos de remoción de lignina por efecto del extracto crudo enzimático conteniendo lacasas son ligeramente inferiores a los reportados por Cardoso-Silva y col. (2014), quienes lograron 35.04% de remoción de lignina a las 4 h de incubación en bagazo de caña utilizando el extracto enzimático (236 U g^{-1}) de *Trametes villosa* optimizado para MnP.

Utilizando fermentación en estado sólido, Arora y col. (2002) alcanzaron un 25.2% de deslignificación de paja de trigo a los 32 días utilizando de *P. fascicularia*; Knežević y col. (2013) eliminaron el 5.9% de la lignina del aserrín de roble utilizando extracto enzimático crudo de *Trametes multicolor*, mientras que Deswal y col. (2014) consiguieron degradar 7.91% de lignina en bagazo de caña de azúcar usando extracto enzimático de *Pleurotus florida*. Moniruzzaman y Ono (2012) aplicando enzimas comerciales de *Trametes* sp. consiguieron deslignificar hasta 50.1% del aserrín de madera de ciprés (*Chamaecyparis obtusa*). Mukhopadhyay y col. (2011) lograron alrededor de 80% de deslignificación de *Ricinus comunis* mediante la aplicación de lacasa comercial en un experimento de optimización por la metodología de superficie de respuesta.

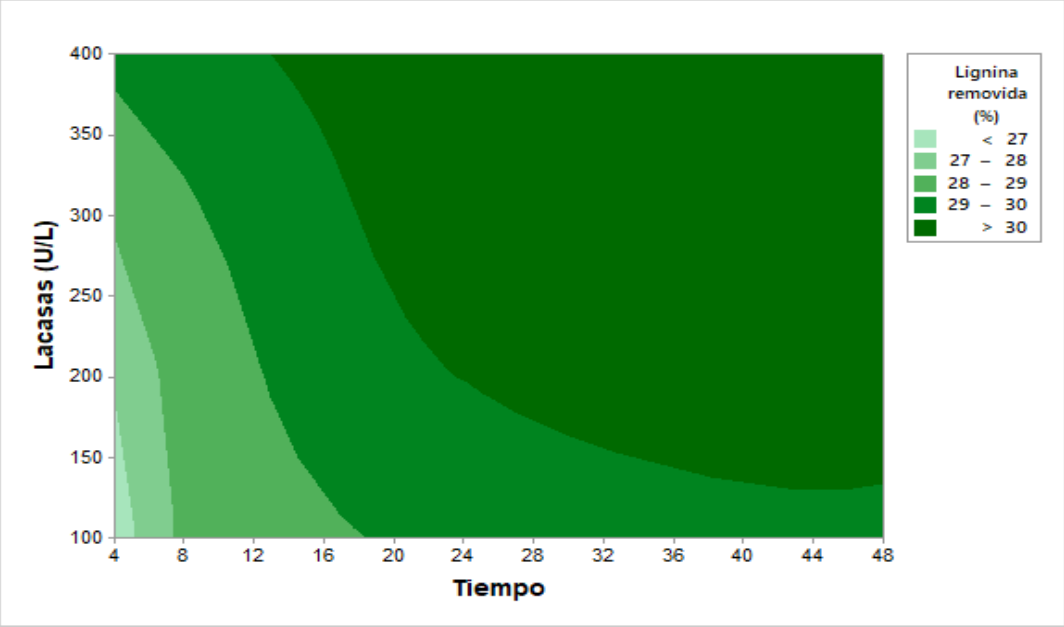


Figura 38. Gráfica de contorno para los factores Tiempo*Lacasas en el pretratamiento de madera de *M. oleifera* con lacasa de *T. polyzona*

Cuadro 45. ANDEVA del modelo general lineal para la remoción de lignina de los tratamientos utilizados

Fuente		G L	SC Ajust	MC Ajust	Valor F	Valor p
	Tiempo	3	44.043	14.681	82.37	0.000
	Lacasas	2	20.382	10.1912	57.18	0.000
Error		30	5.347	0.1782		
	Falta	6	4.101	0.6836	13.17	0.000
	Error	24	1.246	0.0519		
Total		35	69.772			

S	R^2	R^2 Ajustado	R^2 predicho
0.42217	92.34%	91.06%	88.96%

Cuadro 46. Modelo de regresión para la remoción de lignina de madera de *M. oleifera*

Fuente		G L	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Regresión						
	Tiempo	6	67.047	11.1745	118.90	0.000
	Lacasas (U/L)	1	17.801	17.8014	189.41	0.000
	Tiempo*Tiempo	2	17.830	8.9152	94.86	0.000
	Tiempo*Lacasas	1	8.328	8.3282	88.61	0.000
Error		2	3.197	1.5985	17.01	0.000
	Falta de ajuste	29	2.726	0.0940		
	Error puro	5	1.480	0.2960	5.70	0.001
Total		24	1.246	0.0519		
		35	69.772			

S	R^2	R^2 Ajustado	R^2 predicho
0.306571	96.09%	95.29%	93.99%

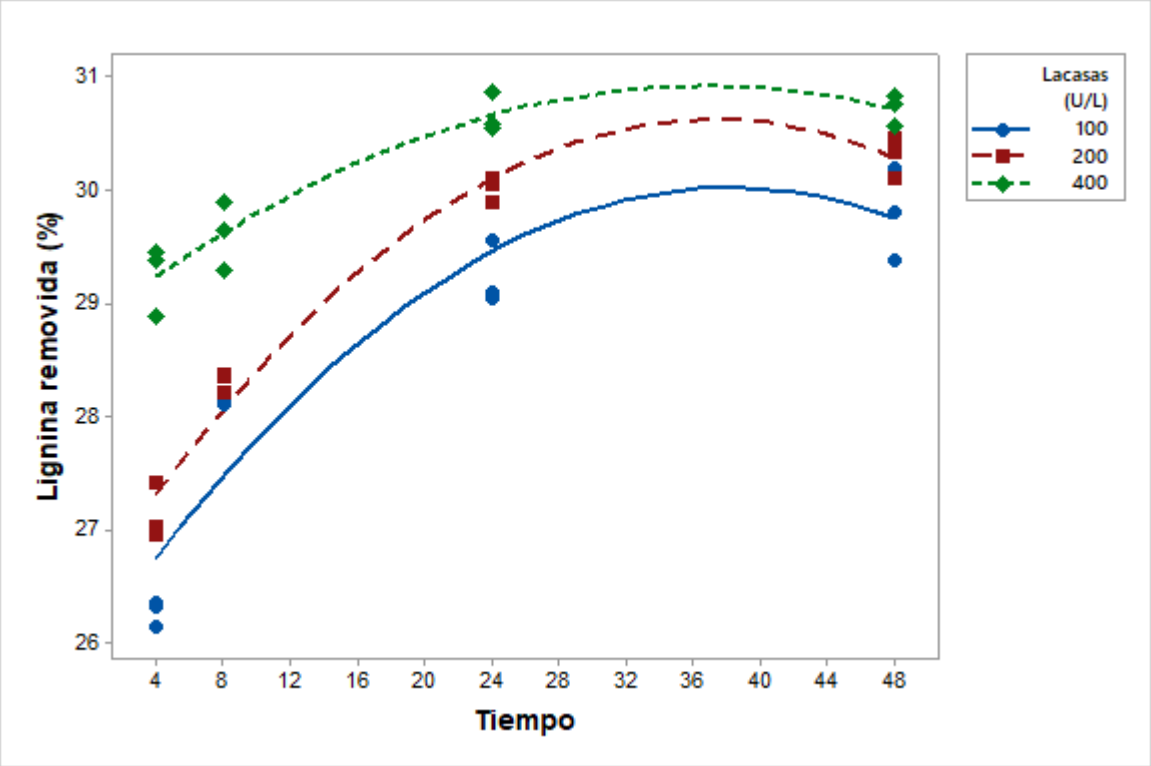


Figura 39. Gráfica de dispersión de lignina removida (%) vs. Tiempo en función de la concentración de lacasa utilizada

El tiempo de reacción varió de 4 a 8 horas no habiendo distinción entre ellos, a diferencia de este estudio, donde sí se encontraron diferencias entre los cuatro tiempos de reacción. En un experimento similar al aquí desarrollado, Cardoso-Silva y col. (2014) obtuvieron a las entre las 4 y 72 horas hasta 37.8, 40.2 y 63.2 % de deslignificación de bagazo de caña, cáscara de coco y fibra de yute respectivamente utilizando extracto enzimático de *Trametes villosa*. En este experimento, al igual que en el anterior, no hubo diferencia entre los niveles de deslignificación atribuibles al tiempo de reacción. Esto pudiera explicarse al hecho de que la madera de Moringa, como muchas maderas suaves tiene un alto contenido de lignina a diferencia de la utilizada por los autores mencionados, lo cual puede influir significativamente en el tiempo de reacción necesario para provocar un efecto en la deslignificación .

D USO DE RESIDUOS DE BIORREFINERÍA DE *M. oleifera* EN LA ALIMENTACIÓN DE CODORNICES JAPONESAS

1 Rendimientos de harina desgrasada de semilla de moringa

Por cada 100 g de semilla descascarada de *M. oleifera* se obtuvieron durante el prensado 25.5 g de aceite y 74.5 g de pasta desgrasada. De esta manera, el aceite extraído por prensado sólo representa aproximadamente una cuarta parte de la semilla cruda (SMOC). Este porcentaje es menor al contenido de lípidos encontrado en la sección A para el ecotipo utilizado (“Mojolo”). Esto es debido a que la eficiencia de extracción de aceite por prensado es menor a la de solventes que se utiliza en el análisis (Abdulkarim y col., 2005). En consecuencia, la torta de prensado contiene una porción importante de lípidos, como se puede constatar en el Cuadro 48.

2 Rendimientos del fermentado de biomasa de moringa

Para los 5 fermentadores utilizados, el balance de materia general se resume la Figura 40 donde se muestra que a partir de 3.75 kg de hoja y raquis de moringa se obtuvieron 2.5 kg de residuo. Aunque no se cuantificó, teóricamente, se obtendrían también 625 g de etanol y 625 g de dióxido de carbono. Por lo tanto, el residuo fermentado representa el 66.67% de la biomasa empleada en el proceso.

3 Análisis proximales de materia primas

Los resultados de los análisis proximales de las materias primas a base de moringa se muestran en el Cuadro 48. Para la harina de hoja de moringa los valores obtenidos son similares a los reportados por Castillo y col. (2018), excepto para el contenido de proteínas que es más bajo. En la hoja fermentada en cambio, el contenido de carbohidratos disminuyó respecto a la hoja cruda, debido probablemente a su uso por parte del hongo y la levadura como fuente de energía y para la construcción de sus estructuras celulares. Lo anterior se pudo reflejar también en el aumento del contenido de fibra cruda, ya que M. circinelloides, como la mayoría de los hongos producen el carbohidrato quitina para la construcción de su pared celular (Fai y col., 2011).

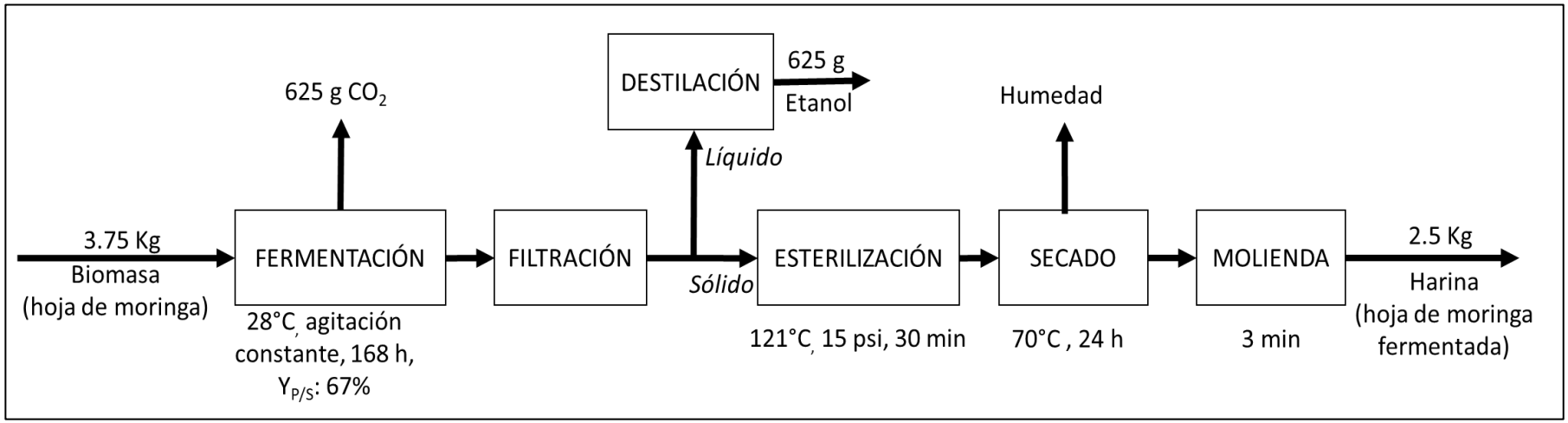


Figura 40. Balance de materia para la producción del residuo fermentado

Cuadro 47. Composición proximal de las materias primas a base de moringa utilizadas

Nutriente	HMNT[1]	HMHF[2]	SMOC[3]	SMOD[4]
Humedad	6.42	4.44	3.88	5.70
Minerales%	7.60	4.18	3.34	4.42
Proteínas%	17.78	20.81	40.62	48.51
Lípidos%	7.64	7.35	32.77	11.14
Fibra cruda%	13.30	30.06	1.35	2.76
Carbohidratos	47.26	33.16	21.93	27.47

[1]HMNT, hoja y raquis de moringa no tratados (sin fermentar); [2]HMHF, hoja y raquis de moringa hidrolizada y fermentada; [3]SMOC, semilla de moringa cruda; [4]SMOD, semilla de moringa desgrasada.

El contenido de proteínas presentó un leve aumento, ya que el balance general del proceso de fermentación se inclinó más hacia un descenso del contenido de carbohidratos, transformados en alcohol y dióxido de carbono, que a la degradación de las proteínas en otro tipo de compuestos.

Para la SMOD, el contenido de proteínas fue inferior al reportado por Ogunsina y col. (2010), quienes reportan 62.76%. Lo anterior se debe a que en el presente trabajo se empleó harina desgrasada por prensado, con una proporción alta de lípidos (11.14%), mientras que los autores citados, usaron harina de desgrasada por solventes.

4 Composición de las dietas de iniciación y finalización

El Cuadro 49 presenta los datos de las formulaciones para las dietas de iniciación (1) y finalización (2) que fueron proporcionados a las codornices, mientras que en el Cuadro 50 se muestra el contenido nutrimental calculado de dichas dietas, donde se buscaron niveles equivalentes de calorías, macronutrientes y micronutrientes. Estas dietas fueron diseñadas para proporcionar cantidades equivalentes de nutrientes y calorías.

5 Parámetros de crecimiento

a Peso vivo

El Cuadro 51 muestra que hubo diferencias significativas desde el día 7 y hasta el día 35 ($p<0.05$) en los pesos de las codornices alimentadas con las diferentes dietas de finalización, siendo claro el bajo peso relativo en las dietas con hoja no fermentada de moringa, lo cual no fue observado con la hoja fermentada. Lo anterior concuerda también con lo reportado por Castillo y col. (2018), quienes encontraron que niveles de inclusión de harina de hoja de *M. oleifera* mayores de 10% en las dietas de iniciación codornices japonesas, están relacionados a menores pesos vivos. El uso de la harina de hoja fermentada moringa pudiera tener un efecto favorable en el desarrollo de las codornices, posiblemente debido a la inactivación de factores antinutricionales y al aumento en la disponibilidad de proteínas, aminoácidos esenciales y carbohidratos. Este fenómeno, ya ha sido comprobado en muchos alimentos fermentados, y específicamente en la semilla de moringa (Ijarotimi y col., 2013).

Cuadro 48. Composición de las fórmulas de las dietas de iniciación (1) y finalización (2) (g/100g)

Ingrediente	TEST1	HMNT1	HMHF1	SMOD1	TEST2	HMNT2	HMHF2	SMOD2
Maíz	36.70	26.90	19.00	36.45	48.55	40.36	41.15	49.42
Soya	55.60	53.30	58.80	50.10	44.63	42.85	41.90	39.88
Hoja de moringa no tratada	0.00	10.00	0.00	0.00	0.00	10.00	0.00	0.00
Hoja de moringa fermentada	0.00	0.00	10.00	0.00	0.00	0.00	10.00	0.00
Semilla moringa desgrasada	0.00	0.00	0.00	5.00	0.00	0.00	0.00	5.00
Aceite de soya	4.30	4.30	5.00	3.10	3.05	2.95	3.11	1.75
Azúcar	0.00	2.10	3.80	1.95	0.00	0.00	0.00	1.95
Sal	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Metionina	0.20	0.20	0.20	0.20	0.22	0.25	0.25	0.13
Caliza fina	1.30	1.30	1.30	1.30	1.30	1.25	1.25	1.25
Ortofosfato de sodio	0.90	0.90	0.90	0.90	0.95	1.00	1.00	1.05
Mezcla de vitaminas [1]	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Minerales [2]	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Prebiótico (*S. cerevisiae*)	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Adsorbente [3]	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Fitasa [4]	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

[1] Premezcla de vitaminas que proveen lo siguiente por kg de dieta: 12,500 IU (retinol); 4,480 IU (colecalciferol); 30 IU (acetato de tocoferol); 3 mg de menadiona bisulfuro de sodio; 1.5 mg de tiamina; 6 mg de riboflavina; 3 mg piridoxina; 15 mg cianocobalamina; 1.5 mg de ácido fólico; 55 mg de niacina; 15 mg pantotenato de calcio; 180 µg de biotina; 600 mg de colina;120 mg de Banox (BHA + BHT). [2] Premezcla de minerales que proveen lo siguiente por kg de dietat:75 mg de Mn; 75 mg de Zn; 75 mg de Fe; 900 mg de Mo; 750 µg de Co; 105 mg de Se. [3] Aluminosilicato, Zeolex. [4] Natuphos* 5000 GP Fitasa, Basf Mexicana, S.A. de C.V.

Cuadro 49. Contenido nutrimental calculado de las dietas de iniciación y finalización (g/100 g)

Nutriente	HMNT1	HMHF1	SMOD1	TEST1	HMNT2	HMHF2	SMOD2	TEST2
EM Kcal/kg	2886.59	2853.97	2893.17	2857.48	2903.13	2902.05	2899.61	2900.12
Humedad	9.62	9.17	9.96	10.29	9.94	9.72	10.20	10.40
Proteína cruda%	27.49	27.50	27.50	27.51	24.00	23.94	24.01	23.64
Fibra cruda%	4.66	6.48	3.29	3.57	4.43	5.99	3.20	3.28
Extracto etéreo%	2.23	1.94	1.88	1.80	2.65	2.61	2.49	2.15
Ácido linoleico	2.92	3.17	2.44	3.09	2.40	2.49	1.92	2.60
Ácido linolénico	0.16	0.19	0.12	0.37	0.12	0.12	0.08	0.28
Lisina%	1.69	1.86	1.36	1.50	1.66	1.68	1.41	1.39
Metionina%	0.59	0.63	0.62	0.53	0.59	0.60	0.51	0.49
Cisteína%	0.43	0.47	0.31	0.41	0.38	0.38	0.33	0.35
Treonina%	1.21	1.31	0.99	1.05	1.16	1.18	1.02	1.01
Triptófano%	0.50	0.55	0.39	0.44	0.44	0.44	0.33	0.36
Calcio%	0.83	0.84	0.85	0.83	0.80	0.79	0.83	0.81
Fósforo%	0.36	0.37	0.35	0.36	0.36	0.35	0.36	0.35

[1]HMNT1, dieta de iniciación con hoja de moringa no fermentada; [2]HMHF1, dieta de iniciación con hoja de MO fermentada; [3] SMOD1, dieta de iniciación con pasta de semilla de MO desgrasada; TEST1, dieta de iniciación convencional; [1]HMNT2, dieta de finalización con hoja de MO no fermentada; [2]HMHF2, dieta de finalización con hoja de MO fermentada; [3] SMOD2, dieta de finalización con pasta desgrasada de semilla de MO; TEST2, dieta de finalización convencional.

Cuadro 50. Peso vivo individual por semana de codornices alimentadas con diferentes dietas conteniendo *M. oleifera*

Tratamiento	Estadístico	Inicio	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28	Día 35
SMOD	Media	12.216 a	52.296 a	109.56 a	166.750 a	216.050 a	244.420 a
		±1.157	±5.241	±11.790	±17.060	±20.630	±23.450
HMHF	Media	12.140 a	50.820 a	105.510 a	162.780 ab	211.430 ab	235.990 ab
		±1.087	±5.586	±12.190	±15.490	±17.360	±23.680
HMNT	Media	12.040 a	45.660 b	97.050 b	154.700 b	204.16 b	229.160 b
		±0.945	±7.300	±15.330	±17.720	±19.110	±22.170
TEST	Media	11.97 a	51.396 a	109.640 a	167.860 a	216.56 a	233.870 ab
		±1.110	4.792	±8.830	±13.990	±17.810	±23.310

Las medias que no comparten una letra en la misma columna son significativamente diferentes (Tukey, $p < 0.05$).

Los tratamientos conteniendo pasta de semilla desgrasada (SMOD) y fermentado de hoja de moringa (HMHF) no presentaron diferencias respecto al testigo ($p<0.05$). Lo anterior concuerda también con lo reportado por Gakuya y col. (2014), quienes encontraron que niveles de inclusión de harina de hoja de *M. oleifera* mayores de 7.5% en las dietas de pollos de engorde, están relacionados a un menor peso final de los animales, menores ganancias de peso, consumo de alimento y más baja conversión alimenticia

b Ganancia de peso

El Cuadro 52 muestra que para la ganancia de peso hubo diferencias significativas entre tratamientos en la etapas de iniciación y acumulada final, pero no entre los tratamientos de la etapa de finalización. Incluso, para ese período, la dieta HMNT2, que contiene hoja no tratada de moringa fue muy similar a las demás dietas. Esto coincide con lo señalado por Gadzirayi y Mupangwa (2013), y con Castillo y col. (2018), quienes observaron menor GP en la etapa de iniciación en codornices japonesas alimentadas parcialmente con de hoja de moringa, mientras que en la etapa de finalización este efecto no fue significativo. Mateos y col. (2012) observaron el mismo comportamiento en pollos y lo atribuyen al alto contenido de fibra cruda de las dietas con hoja de moringa, que provoca, en el periodo de iniciación, una menor retención y asimilación de los alimentos en el tracto digestivo aún inmaduro de las aves. Este efecto no se observó en el tratamiento con hoja fermentada, a pesar de su mayor contenido de fibra cruda, el cual pudo deberse a la quitina producida por el hongo. Se sabe que *Mucor circinelloides*, al igual que la mayoría de los hongos transforman carbohidratos en quitina, un componente importante de su pared celular (Fai y col., 2011). La quitina es cuantificable en el análisis proximal como parte de la fibra (Cheung, 2013).

Por otro lado, se ha reportado que las aves de corral tienen capacidad de digerir parcialmente la quitina, gracias a que sintetizan la enzima quitinasa (Veldkamp y col., 2012), lo que podría explicar en parte la mejor respuesta de las codornices a este subproducto que a la harina cruda.

Cuadro 51. Ganancia de peso, alimento consumido, conversión alimenticia y mortalidad durante las etapas de iniciación (0-14 d), finalización (15-35 d) y acumuladas (0-35 d) de codornices japonesas

Trat.	Iniciación				Finalización				Acumuladas			
	GP	AC	CA	Mort	GP	AC	CA	Mort	GP	AC	CA	Mort
SMOD	96.28 a	151.51 ab	1.574 ab	0.000 a	135.230 a	533.29 a	3.951a	0.000 a	231.580 a	684.80 a	2.947 a	0.000 a
(DE)	±1.557	±0.977	±0.0356	±0.000	±6.730	±17.80	±0.251	±0.000	±7.450	±18.80	±0.138	±0.000
HMHF	93.37 a	154.63 a	1.659 b	0.000 a	123.51 a	519.10 a	4.214a	2.222 ab	217.10 ab	673.73 a	3.17 ab	2.222 ab
(DE)	±3.01	±9.16	±0.141	±0.000	±9.840	±15.97	±0.219	±0.000	±12.350	±19.00	±0.197	±0.000
HMNT	84.14 b	154.63 a	1.8335 c	0.000 a	122.65 a	512.05 a	4.185a	2.960 b	206.92 b	665.92ª	3.38 b	2.960 b
(DE)	±5.490	±1.72	±0.109	±0.000	±8.430	±11.80	±0.238	±2.570	±13.290	±12.52	±0.291	±2.570
TEST	97.67 a	139.88 b	1.4323 a	0.000 a	125.16 a	510.25a	4.095a	0.741 ab	223.11 ab	650.14ª	2.96 a	0.741 ab
(DE)	±2.240	±3.96	±0.243	±0.000	±12.130	±16.38	±0.287	±1.283	±13.790	±19.80	±0.167	±1.283

*Las medias que no comparten una letra en la misma columna son significativamente diferentes (Tukey, $p < 0.05$). GP=ganancia de peso; AC=alimento consumido; CA=conversión alimenticia; Mort =mortalidad; DE=desviación estándar

Adicionalmente, la quitina tiene un efecto estimulante de la respuesta inmune (Lee y col., 2008).

En contraparte, con las dietas de SMOD se obtuvieron las más altas ganancias de peso. Lo anterior es contrario a lo señalado por Abbas y Ahmed (2012) quienes indican menores ganancias de peso en aves alimentadas con semilla de *M. oleifera* a niveles de inclusión tan bajos como 1.5%. Lo anterior hace suponer un efecto del proceso de prensado sobre las cualidades nutricionales de la harina de semilla, lo cual es muy común en los alimentos extrudidos debido a transformaciones químicas ocurridas a las altas temperaturas y presiones alcanzados durante el proceso de extrusión (Nouman y col., 2014). Se recomienda realizar pruebas posteriores con mayores proporciones de SMOD para determinar los niveles óptimos y máximos de inclusión en las dietas para aves.

c Conversión alimenticia

En cuanto a la conversión alimenticia, el comportamiento de ésta fue similar a la ganancia de peso observándose en el periodo de iniciación que las más altas tasas de conversión alimenticia se presentaron en las codornices alimentadas con HMNT y las mejores con las dietas SMOD.

d Mortalidad

La mortalidad de las aves se empezó a presentar después de la tercera semana y fue mayor ($p<0.05$) en los tratamientos con HMNT. Este efecto podría deberse a situaciones accidentales durante el desarrollo del experimento, pero no se descarta un efecto nocivo en las aves por la acumulación tisular de metabolitos presentes en la hoja de moringa. Un grupo de ellos son los carotenoides, a juzgar por lo observado durante el sacrificio de las aves, donde los órganos internos, la carne y grasa de las codornices alimentadas con hoja no tratada de moringa presentaban un color amarillento (Figura 41). Saini y col. (2013) mostraron que el nivel de carotenoides totales de la hoja seca de *M. oleifera* es de alrededor de 160 mg/100 g. Si consideramos que en las dietas HMNT el nivel de inclusión de hoja fue de 10%, la dieta contendría 0.16 mg/g de alimento y durante los 35 días de alimentación cada codorniz ingiere en total 106.7 mg de retinol.

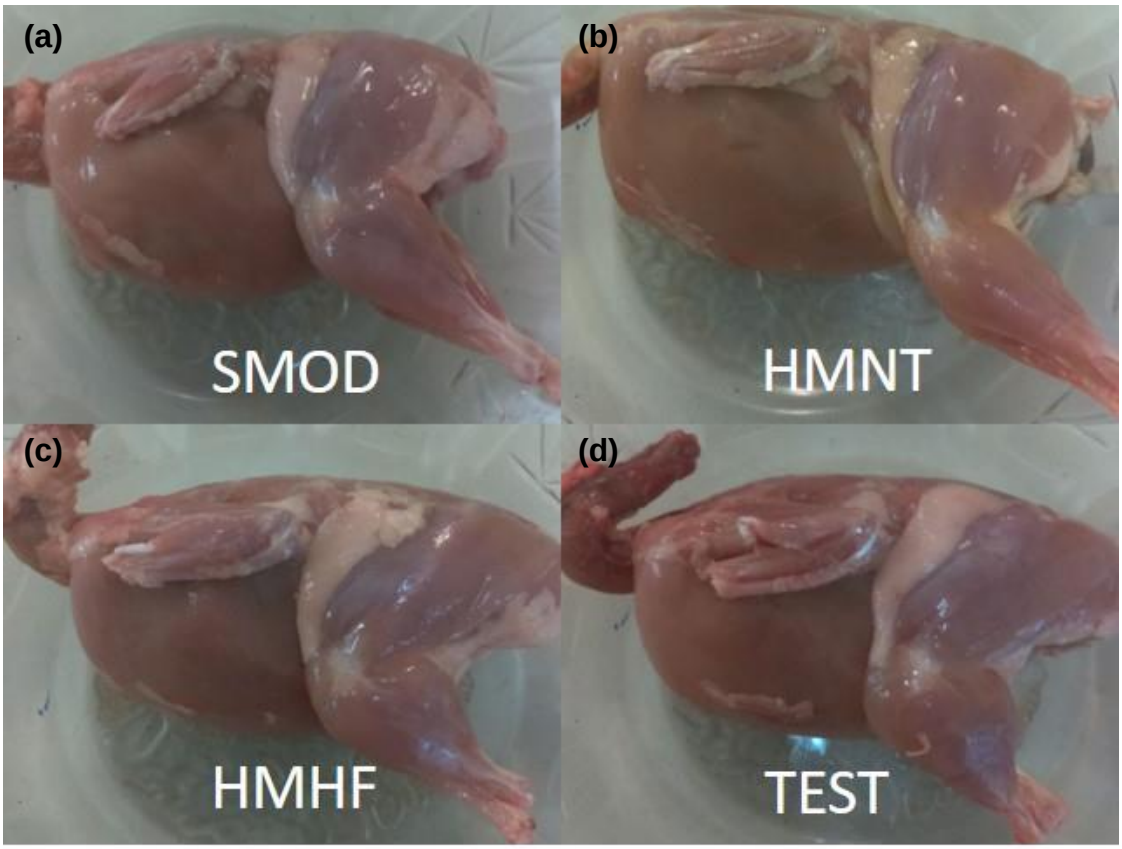


Figura 41. Canales de codorniz alimentadas con dietas conteniendo (a) semilla desgrasada por prensado de *M. oleifera* (SMOD); (b) harina de *M. oleifera* no tratada (HMNT); (c) harina de *M. oleifera* hidrolizada y fermentada (HMHF) y (d) testigo (TEST).

Lo anterior equivale a 465.6 mg/kg de peso de ave, lo cual es inferior, pero no muy lejano al DL_{50} del retinol que es de 2,000 mg/kg de peso corporal (rata), habiendo la posibilidad de que efectivamente haya una acción tóxica en algunas de las aves. Se requiere de más estudios para poder corroborar lo anterior.

En cuanto al alimento con HMHF, no se encontraron mortalidades superiores al testigo ($p<0.05$). Si bien se ha reportado que *Mucor circinelloides* es patógeno en organismos inmunodeprimidos de diferentes especies de animales y humanos, se ha encontrado que es de baja citotoxicidad (Hollmann y col., 2008). Esto explica el hecho de que las codornices alimentadas con residuos de fermentación, donde había microorganismos de esta especie no se presentaran mortalidades por encima de la media. Hay que señalar que el fermentado utilizado para las dietas fue esterilizado antes de su uso. En cuanto a las aves alimentadas con dietas conteniendo semilla desgrasada de moringa por prensado (SMOD) no se observó ninguna mortalidad.

6 Rendimientos de canal

a Pesos de canal fría y caliente

Los mayores pesos de canal caliente y fría se obtuvieron en las aves alimentadas con las dietas conteniendo SMOD, siendo aún superiores al testigo ($p<0.05$). Lo anterior no concuerda con lo reportado en la literatura (Abbas y Ahmed, 2012; Ochi y col., 2015) quienes encontraron menores pesos que el testigo en las canales de pollos alimentados con semilla entera de moringa a niveles de inclusión de 1.5% en dietas de iniciación y finalización. En el presente experimento, los niveles de inclusión fueron más de tres veces superiores (5%) y a pesar de ello no se observaron efectos negativos en el crecimiento de las codornices.

Como en el caso de los pesos vivos y, una posible razón de este comportamiento podría estribar en la eliminación e inactivación de sustancias antinutricionales como taninos y lectinas presentes en la semilla entera (Makkar y Becker, 1996; Ogbe y Affiku, 2011), durante el descascarillado y prensado de la semilla utilizada en este experimento.

En nuestro trabajo se utilizó semilla descascarada y desgrasada por prensado, que debido al calentamiento natural por efecto de la presión y fricción de la semilla en el equipo de extracción alcanza temperaturas de hasta 180 °C en unos segundos. La harina de semilla utilizada por Abbas y Ahmed (2012) no se le dio ningún proceso de extracción de grasa, sino que se utilizó la semilla entera.

b Rendimientos de canal fría y caliente

En el Cuadro 53 se aprecia que el tipo de dieta tuvo un efecto sobre el rendimiento de canal caliente respecto al peso vivo, siendo significativamente mayor ($p<0.05$) para HMNT y menor para HMHF y SMOD. De manera similar, para la canal fría se observó un mayor rendimiento en el tratamiento HMNT y menor para HMHF. Es posible que las aves alimentadas con HMNT posean menos grasa y más proteína en todos los tejidos, que las del resto de los tratamientos lo cual pudo haber influido en mayores porcentajes de rendimiento de canal fría y caliente y pesos netos de canal similares a los del testigo y HMHF. Esto parece concordar con (Abbas y Ahmed (2012)) quienes observaron mayor contenido de grasa y con (Castillo y col. (2018)) quienes encontraron que los niveles de triglicéridos y colesterol en la sangre disminuyeron al incrementar el contenido de hoja de *M. oleifera* en la dieta.

c Absorción de agua

El porcentaje de absorción de agua fue significativamente diferente entre los diferentes tratamientos, siendo menor en el caso de las codornices alimentadas con hoja no tratada (HMNT). Esta diferencia también podría deberse a la presencia de los compuestos carotenoides presentes en la carne, los cuales son liposolubles, que podrían impedir en parte la absorción de agua de la canal.

Cuadro 52. Peso y rendimiento de canal y absorción de agua de codornices japonesas alimentadas con diferentes dietas conteniendo *M. oleifera*

Tratamiento	Peso canal caliente (g)	Canal caliente (%)	Peso de canal fría (g)	Canal fría (%)	Absorción de agua (%)
SMOD	146.29 a	59.85 b	159.31 a	65.18 ab	8.17 a
HMHF	141.03 b	59.76 b	153.06 b	64.86 b	8.17 a
HMNT	143.68 b	62.70 a	155.14 b	67.70 a	7.37 b
TEST	143.06 b	61.17 ab	155.31 b	66.41 ab	7.88 ab

* Las medias que no comparten una letra en la misma columna son significativamente diferentes (Tukey, $p < 0.05$).

VII CONCLUSIONES

A RENDIMIENTOS Y ANÁLISIS DE BIOMASA DE *MORINGA*

- El ecotipo “Mojolo” presentó la mayor productividad de tallos y hojas y el mayor porcentaje de lípidos, proteínas de hoja y carbohidratos fermentables por hectárea por lo que se recomienda para la zona de Sinaloa como variedad de alta productividad de biomasa.
- El ecotipo “Sinaloa” produjo lo más altos rendimientos de semillas, aceite y proteínas de semilla, por lo que se recomienda para la producción de aceite de semilla.
- El ecotipo “Elota” sobresalió por su alto porcentaje de aceite y ácido oleico, por lo que se recomienda la experimentación de cruzas con los ecotipos “Sinaloa”, “Mojolo” con fines de mejoramiento genético y cultivos intensivos para producción de biomasa y aceite.

B PRODUCCIÓN ENZIMÁTICA Y ETANOL DE HONGOS NATIVOS EN *Moringa oleifera*

- Se aislaron cinco cepas de hongos con capacidad etanologénica, cuatro de ellas de madera de *M. oleifera*.
- Las cepas mejor adaptadas a un CBP fueron identificadas molecularmente como *Fusarium equiseti, F. verticillioides y Mucor circinelloides.*
- Las cepas seleccionadas aumentaron de 3 a 6 veces los rendimientos y productividades de etanol a partir de lignocelulosa de *M. oleifera* cuando crecieron en consorcio con *S. cerevisiae*.
- Entre las cepas estudiadas, C1502, identificada molecularmente como *Mucor circinelloides*, obtuvo los más altas producciones y rendimientos de etanol en lignocelulosa de *M. oleifera*.
- Se aisló y purificó la cepa de basidiomicete identificada molecularmente como *Trametes polyzona*, la cual presentó alta productividad de lacasa y xilanasa, fue seleccionada para su uso en el proceso de pretratamiento biológico.

C OPTIMIZACIÓN DE CONDICIONES DE CULTIVO DE *T. polyzona* COC-1 PARA LA PRODUCCIÓN DE LACASAS

- Se optimizó la producción de lacasa de *T. polyzona* en medio sumergido con madera de *M. oleifera* y nutrientes seleccionados, multiplicándose hasta 150 veces la excreción de la enzima.
- Se validó la optimización de producción de lacasas con niveles pronosticados de nutrientes, alcanzando los niveles esperados.
- Se demostró la utilidad del extracto crudo enzimático en la deslignificación de madera de *M. oleifera*, determinándose las concentraciones de enzima y tiempos de proceso para mayor eficacia.

D USO DE RESIDUOS DE BIORREFINERÍA DE *M. oleifera* EN LA ALIMENTACIÓN DE CODORNICES JAPONESAS

- En la etapa de iniciación, las dietas conteniendo 10% de hoja no fermentada de moringa, presentaron los menores GP y pesos vivos finales, así como peor CA. La dieta conteniendo harina fermentada de hoja de *M. oleifera* y la que incluyó pasta de semilla desgrasada por prensado fueron superiores en todos esos parámetros a la harina no fermentada.
- En la etapa de finalización, las dietas que contenían, ya sea, 5% pasta desgrasada de semilla de MO, 10% de harina de hoja no fermentada o 10% de hoja fermentada resultaron adecuadas para el desarrollo de codornices japonesas.
- El tratamiento que incluyó 5% de harina de pasta de semilla desgrasada por prensado de MO fue superior en todos los parámetros de crecimiento y en los pesos de canal caliente y fría.
- Las pasta de semilla de *Moringa oleifera* desgrasada por prensado, y la harina de hoja fermentada por *Mucor circinelloides-Saccharomyces cerevisiae* fueron bien toleradas por las codornices japonesas a lo largo de todo su desarrollo.
- Se requieren estudios posteriores para determinar los valores óptimos y máximos de inclusión de dichas pasta o harinas en las dietas, e investigación sobre la posible citotoxicidad en codornices en periodos de tiempo más prolongados.

VIII LITERATURA CITADA

Abbas, T. E. y Ahmed, M. E. (2012). Use of *Moringa oleifera* Seeds in Broilers Diet and its Effects on the Performance and Carcass Characteristics. *International Journal of Applied Poultry Research,* **1** (1): 1-4.

Abd El-Gawad, E. A., El Asely, A., Soror, E., Abbass, A. y Austin, B. (2019). Effect of dietary *Moringa oleifera* leaf on the immune response and control of *Aeromonas hydrophila* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry. *Aquaculture International* **28**. doi:10.1007/s10499-019-00469-0

Abd El-Hack, M., Alagawany, M., Elrys, A., Desoky, E.-S., Tolba, H., Elnahal, A., . . . Swelum, A. (2018). Effect of Forage *Moringa oleifera* L. (moringa) on Animal Health and Nutrition and Its Beneficial Applications in Soil, Plants and Water Purification. *Agriculture* **8** (9): 145. doi:10.3390/agriculture8090145

Abdulkadir, A. R., Zawawi, D. D. y Jahan, M. S. (2016). Proximate and phytochemical screening of different parts of *Moringa oleifera*. *Russian Agricultural Sciences* **42** (1): 34-36. doi:10.3103/s106836741601002x

Abdulkarim, M., Long, K., Lai, O. M., Muhammad, K. y Mohd Ghazali, H. (2005). Some physico-chemical properties of *Moringa oleifera* seed oil extracted using solvent and aqueous enzymatic methods. *Food Chemistry* **93** 253-263. doi:10.1016/j.foodchem.2004.09.023

Abou-Elezz, F. M. K., Luis Armando, S.-F., Santos-Ricalde, R. y Solorio, F. (2012). Nutritional effects of dietary inclusion of *Leucaena leucocephala* and *Moringa oleifera* leaf meal on Rhode Island Red hens' performance. *Cuban Journal of Agricultural Science* **45** (2): 163-169.

Adeniji, A. A. y Lawal, M. (2012). Effects of Replacing Groundnut Cake with *Moringa oleifera* Leaf Meal in the Diets of Grower Rabbits. *International Journal of Molecular Veterinary Research* **2** (3): 8-13. doi:10.5376/ijmvr.2011.01.0003

Adeshina, I., Sani, R., Adewale, Y., Tiamiyu, L. y Umma, S. (2018). Effects of dietary *Moringa oleifera* leaf meal as a replacement for soybean meal on growth, body composition and health status in *Cyprinus carpio* juveniles. *Croatian Journal of Fisheries* **76** 174-182. doi:10.2478/cjf-2018-0021

Akpinar, M. y Ozturk-Urek, R. (2017). Induction of fungal laccase production under solid state bioprocessing of new agroindustrial waste and its application on dye decolorization. *3 Biotech* **7**. doi:10.1007/s13205-017-0742-5

Al-Juhaimi, F., Ghafoor, K., Babiker, E. E., Matthäus, B. y Özcan, M. M. (2017). The biochemical composition of the leaves and seeds meals of moringa species as non-conventional sources of nutrients. *Journal of Food Biochemistry* **41** (1): e12322. doi:10.1111/jfbc.12322

Al-Juhaimi, F., Ghafoor, K., Hawashin, M. D., Alsawmahi, O. N. y Babiker, E. E. (2015). Effects of different levels of Moringa (*Moringa oleifera*) seed flour on quality attributes of beef burgers. *CyTA - Journal of Food* **14** (1): 1-9. doi:10.1080/19476337.2015.1034784

Ali, E. N. y Kemat, S. Z. (2017). Bioethanol produced from *Moringa oleifera* seeds husk. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* **206** 012019. doi:10.1088/1757-899x/206/1/012019

Alizadeh, H., Teymouri, F., Gilbert, T. I. y Dale, B. E. (2005). Pretreatment of switchgrass by ammonia fiber explosion (AFEX). *Applied biochemistry and biotechnology* **124** (1): 1133-1141. doi:10.1385/ABAB:124:1-3:1133

An, Q., Ma, H.-F., Han, M.-L., Si, J. y Dai, Y.-C. (2018). Effects of Different Induction Media as Inducers on Laccase Activities of *Pleurotus ostreatus* Strains in Submerged Fermentation. *BioResources* **13** 1143-1156. doi:10.15376/biores.13.1.1143-1156

Anandan, D., Marmer, W. y Dudley, R. (2007). Isolation, characterization and optimization of culture parameters for production of an alkaline protease isolated from *Aspergillus tamarii*. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* **34** 339-347. doi:10.1007/s10295-006-0201-5

Anasontzis, G., Kourtoglou, E., Villas-Bôas, S., Hatzinikolaou, D. y Christakopoulos, P. (2016). Metabolic Engineering of *Fusarium oxysporum* to Improve Its Ethanol-Producing Capability. *Frontiers in Microbiology* **7**. doi:10.3389/fmicb.2016.00632

Anasontzis, G., Zerva, A., Stathopoulou, P., Haralampidis, K., Karagouni, A. D. y Hatzinikolaou, D. (2011). Homologous overexpression of xylanase in *Fusarium oxysporum* increases ethanol productivity during consolidated bioprocessing (CBP) of lignocellulosics. *Journal of biotechnology* **152** 16-23. doi:10.1016/j.jbiotec.2011.01.002

Anwar, F., Ashraf, M. y Bhanger, M. (2005). Interprovenance variation in the composition of *Moringa oleifera* oilseeds from Pakistan. *Journal of Oil & Fat Industries* **82** 45-51. doi:10.1007/s11746-005-1041-1

Anwar, F., Hussain, A., Basra, S., Jamil, A. y Iqbal, S. (2006). Effect of salinity on yield and quality of *Moringa oleifera* seed oil. *Grasas y Aceites* **57**. doi:10.3989/gya.2006.v57.i4.65

Anwar, F., Latif, S., Ashraf, M. y Gilani, A. H. (2007). *Moringa oleifera:* a food plant with multiple medicinal uses. *Phytotherapy research : PTR* **21** (1): 17-25. doi:10.1002/ptr.2023

Anwar, F. y Rashid, U. (2007). Physico-chemical characteristics of *Moringa oleifera* seeds and seed oil from a wild provenance of Pakistan. *Pakistan Journal of Botany* **39** (5): 1443-1453.

AOAC (2005). "Official Methods of Analysis," 18th/Ed. Association of Official Analytical Chemists, Inc., Maryland, USA.

Arbige, M., Shetty, J. y Chotani, G. (2019). Industrial Enzymology: The Next Chapter. *Trends in biotechnology* **37**. doi:10.1016/j.tibtech.2019.09.010

Aregheore, E. (2002). Intake and digestibility of *Moringa oleifera*-batiki grass mixtures by growing goats. *Small Ruminant Research - SMALL RUMINANT RES* **46** 23-28. doi:10.1016/S0921-4488(02)00178-5

Arora, D. S., Chander, M. y Gill, P. K. (2002). Involvement of lignin peroxidase, manganese peroxidase and laccase in degradation and selective ligninolysis of wheat straw. *International Biodeterioration & Biodegradation* **50** (2): 115-120. doi:10.1016/s0964-8305(02)00064-1

Asha, R., Niyonzima, F. N. y Sunil, S. M. (2013). Purification and Properties of Pullulanase from *Bacillus halodurans*. *International Research Journal of Biological Science* **2** (3): 35-43.

ASTM (2010). "Annual Book of ASTM Standards," ASTM International, West Conshohocken, PA, USA.

Ayeni, A. O., Adeeyo, O. A., Oresegun, O. M. y Oladimeji, T., E. (2015). Compositional analysis of lignocellulosic materials: Evaluation of an economically viable method suitable for woody and non-woody biomass A. *American Journal of Engineering Research* **4** (4): 14-19.

Ayerza, R. (2012). Seed and oil yields of *Moringa oleifera* variety Periyakulam-1 introduced for oil production in four ecosystems of South America. *Industrial Crops and Products* **36** 70-73. doi:10.1016/j.indcrop.2011.08.008

Azad, K., Rasul, M., Khan, M. M., Sharma, S. y Islam, R. (2015). Prospect of *Moringa* Seed Oil as a Sustainable Biodiesel Fuel in Australia: A Review. *Procedia Engineering* **105** 601-606. doi:10.1016/j.proeng.2015.05.037

Bai, S., Kumar, M., Balashanmugam, P., Kumaran, M., Kalaichelvan, P. y Mani, R. (2012). Cellulase Production by *Bacillus subtilis* isolated from Cow Dung. *Archives of applied science research* **4** 269-279.

Bailey, R. (2011). "Growing a better future." Oxfam International.

Baldrian, P. y Valášková, V. (2008). Degradation of cellulose by basidiomycete fungi. FEMS Microbiol Rev 32: 501-521. *FEMS microbiology reviews* **32** 501-21. doi:10.1111/j.1574-6976.2008.00106.x

Ballesteros, I., Ballesteros, M., Cabañas, A., Carrasco, J., Martín, C., Negro, M., . . . Sáez, R. (1991). Selection of Thermotolerant Yeasts for Simulataneous Saccharification and Fermentation (SSF) for Cellulose to Ethanol. *Applied biochemistry and biotechnology* **28-29** 307-15. doi:10.1007/BF02922610

Banerjee, U. y Vohra, R. (1991). Production of laccase by *Curvularia* sp. *Folia Microbiologica* **36** 343-346. doi:10.1007/BF02814506

Bansal, N., Tewari, R., Soni, R. y Soni, S. (2012). Production of cellulases from *Aspergillus niger* NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues. *Waste Management* **32** 1341-1346. doi:10.1016/j.wasman.2012.03.006

Barakat, H. y Ghazal, G. A. (2016). Physicochemical Properties of *Moringa oleifera* Seeds and Their Edible Oil Cultivated at Different Regions in Egypt. *Food and Nutrition Sciences* **07** (06): 472-484. doi:10.4236/fns.2016.76049

Becerra-Pérez, L. A. (2009). La industria del etanol en México. *EconomíaUNAM* **6** (16): 17.

Beena, A. K., Geevarghes, P. I. y Jayavardan, K. K. (2012). Detergent Potential of a Spoilage Protease Enzyme Liberated by a Psychrotrophic Spore Former Isolated from Sterilized Skim Milk. *American Journal of Food Technology* **7** 89-95. doi:10.3923/ajft.2012.89.95

Belšak-Šel, N., Gregori, A., Leitgeb, M., Klinara, D. y Čelan, Š. (2015). Effect of Solid State Fermentation Medium Optimization on *Pleurotus ostreatus* Laccase Production. *Acta Chimica Slovenica* **62** 932-939. doi:10.17344/acsi.2015.1764

Ben-Younes, S., Mechichi, T. y Sayadi, S. (2007). Purification and characterization of the laccase secreted by the white rot fungus *Perenniporia tephropora* and its role in the decolourization of synthetic dyes. *Journal of applied microbiology* **102** 1033-1042. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.03152.x

Benítez, J. B., Vallejos, M. E., Area, M. C. y Felissia, F. E. (2014). Caracterización química y morfológica de *Moringa oleifera* para su aprovechamiento en

biorrefinerias. 1. Aptitud Papelera. *In* "Proceedings of the VIII CIADICYP" (J. A. Velásquez J. and G. C. Quintana M., eds.), pp. 389-396, Medellín, Colombia.

Bentil, J., Thygesen, A., Mensah, M., Lange, L. y Meyer, A. (2018). Cellulase production by white-rot basidiomycetous fungi: solid-state versus submerged cultivation. *Applied microbiology and biotechnology* **102**. doi:10.1007/s00253-018-9072-8

Bhardwaj, N., Kumar, B. y Verma, P. (2019). A detailed overview of xylanases: an emerging biomolecule for current and future prospective. *Bioresources and Bioprocessing* **6** (1): 40. doi:10.1186/s40643-019-0276-2

Bhatia, L., Johri, S. y Ahmad, R. (2012). An economic and ecological perspective of ethanol production from renewable agro waste: A review. *AMB Express* **2** 65. doi:10.1186/2191-0855-2-65

Bhattacharya, A., Tiwari, P., Sahu, P. y Kumar, S. (2018). A Review of the Phytochemical and Pharmacological Characteristics of *Moringa oleifera*. *Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences* **10** 181. doi:10.4103/JPBS.JPBS_126_18

Bhavani, M., Chowdary, G. V., M., D. y Archana, G. (2012). Screening, Isolation and Biochemical Characterization of Novel Lipase Producing Bacteria from Soil Samples. *International Journal of Biological Engineering* **2** 18-22. doi:10.5923/j.ijbe.20120202.03

Biel, W., Jaroszewska, A. y Łysoń, E. (2017). Nutritional quality and safety of moringa (*Moringa oleifera* Lam., 1785) leaves as an alternative source of protein and minerals. *Journal of Elementology* **22**. doi:10.5601/jelem.2016.21.3.1249

Bilal, M., Nawaz, M., Iqbal, H., Hou, J., Mahboob, S., Al-Ghanim, K. y Cheng, H. (2018). Engineering Ligninolytic Consortium for Bioconversion of Lignocelluloses to Ethanol and Chemicals. *Protein & Peptide Letters* **25**. doi:10.2174/0929866525666180122105835

Boateng, L., Nyarko, R., Asante, M. y Steiner-Asiedu, M. (2017). Acceptability of Complementary Foods That Incorporate *Moringa oleifera* Leaf Powder Among Infants and Their Caregivers. *Food and Nutrition Bulletin* **39** 037957211770865. doi:10.1177/0379572117708656

Bobleter, O. (1994). Hydrothermal degradation of polymers derived from plants. *Progress in Polymer Science* **19** 797-841. doi:10.1016/0079-6700(94)90033-7

Boggione, J., Allasia, M., Georgina, B. y Farruggia, B. (2016). Potential use of soybean hulls and waste paper as supports in SSF for cellulase production by *Aspergillus niger*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* **6**. doi:10.1016/j.bcab.2016.02.003

Booth, F. E. M. y Wickens, G. E. (1988). "Non Timber Uses of Selected Arid Zone Trees and Shrubs in Africa," Food and Agriculture Organization of The United Nations, Roma.

Borges, T. E., Carvalho, M., Neves, V., Silva, M. y Pereira, L. (2014). Chemical characteristics and fractionation of proteins from *Moringa oleifera* Lam. leaves. *Food chemistry* **147C** 51-54. doi:10.1016/j.foodchem.2013.09.135

Boruah, P., Dowarah, P., Hazarika, R., Yadav, A., Barkakati, P. y Goswami, T. (2016). Xylanase from *Penicillium meleagrinum* var. *viridiflavum* – a

potential source for bamboo pulp bleaching. *Journal of Cleaner Production* **116** 259-267. doi:10.1016/j.jclepro.2015.12.024

Botella, C., Díaz, A., Ory, I., Webb, C. y Blandino, A. (2007). Xylanase and pectinase production by *Aspergillus awamori* on grape pomace in solid state fermentation. *Process Biochemistry* **42** 98-101. doi:10.1016/j.procbio.2006.06.025

Bryant, J., Joly, K., Chapin Iii, F. S., Deangelis, D. y Kielland, K. (2014). Can antibrowsing defense regulate the spread of woody vegetation in arctic tundra? *Ecography* **37**. doi:10.1111/j.1600-0587.2013.00436.x

Buaban, B., Inoue, H., Yano, S., Tanapongpipat, S., Ruanglek, V., Champreda, V., . . . Eurwilaichitr, L. (2010). Bioethanol production from ball milled bagasse using an on-site produced fungal enzyme cocktail and xylose-fermenting Pichia stipitis. *Journal of Bioscience & Bioengineering* **110** 18-25. doi:10.1016/j.jbiosc.2009.12.003

Buntić, A., Milić, M., Stajković, O., Rasulić, N., Delić, D. y Mihajlovski, K. (2019). Cellulase production by *Sinorhizobium meliloti* strain 224 using waste tobacco as substrate. *International journal of Environmental Science and Technology* **16**. doi:10.1007/s13762-019-02230-9

Busic, A., Mardetko, N., Kundas, S., Morzak, G., Belskaya, H., Ivancic, S. M., . . . Santek, B. (2018). Bioethanol Production from Renewable Raw Materials and Its Separation and Purification: A Review. *Food Technoly & Biotechnoly* **56** (3): 289-311. doi:10.17113/ftb.56.03.18.5546

Cardona, C. A. y Sánchez, O. (2007). Fuel Ethanol Production: Process Design Trends and Integration Opportunities. *Bioresource technology* **98** 2415-2457. doi:10.1016/j.biortech.2007.01.002

Cardoso-Silva, M. L., Brito de Souza, V., da Silva-Santos, V., Kamida, H. M., Vasconcellos-Neto, J. R. T. d., Góes-Neto, A. y Bello Koblitz, M. G. (2014). Production of Manganese Peroxidase by *Trametes villosa;* on Unexpensive Substrate and Its Application in the Removal of Lignin from Agricultural Wastes. *Advances in Bioscience and Biotechnology* **05** (14): 1067-1077. doi:10.4236/abb.2014.514122

Carmona-Ribeiro, A. M., Prieto, T. y Nantes, I. L. (2015). Nanostructures for peroxidases. *Front Mol Biosci* **2** 50-50. doi:10.3389/fmolb.2015.00050

Castillo, L. R. I., Portillo, L. J. J., León, F. J., Gutiérrez, D. R., Angulo, E. M. A., Muy-Rangel, M. D. y Heredia, J. (2018). Inclusion of Moringa Leaf Powder (*Moringa oleifera*) in Fodder for Feeding Japanese Quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Revista Brasileira de Ciência Avícola* **20** 15-26. doi:10.1590/1806-9061-2017-0410

Castro, A., Carvalho, M., Leite, S. y Pereira Jr, N. (2009). Cellulases from *Penicillium funiculosum*: Production, properties and application to cellulose hydrolysis. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* **37** 151-8. doi:10.1007/s10295-009-0656-2

Cavalcanti, R., Ornela, P., Jorge, J. y Guimaraes, L. (2017). Screening, Selection and Optimization of the Culture Conditions for Tannase Production by Endophytic Fungi Isolated from Caatinga. *Journal of Applied Biology and Biotechnology* **5** (1): 001-009. doi:10.7324/JABB.2017.50101

Claus, H. y Filip, Z. (1998). Degradation and Transformation of Aquatic Humic Substances by Laccase-producing Fungi *Cladosporium cladosporioides*

and *Polyporus versicolor*. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica* **26** (3): 180 - 185. doi:10.1002/(SICI)1521-401X(199805)26:3<180::AID-AHEH180>3.0.CO;2-9

Clifton-Brown, J. C. y Lewandowski, I. (2002). Screening *Miscanthus* genotypes in field trials to optimise biomass yield and quality in Southern Germany. *European Journal of Agronomy* **16** 97-110. doi:10.1016/S1161-0301(01)00120-4

Cordero-Ramírez, J. D., López-Rivera, R., Calderón-Vázquez, C. L., Figueroa-López, A. M., Martínez-Álvarez, J. C., Leyva-Madrigal, K. Y., . . . Maldonado-Mendoza, I. E. (2012). Microorganismos asociados a la rizosfera de jitomate en un agroecosistema del valle de Guasave, Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* **83** 712-730.

Cori, M., Basilio, V., Ruiz, R., Michelangeli, C., Galíndez, R. y García, J. (2009). Efecto de la edad de la codorniz (*Coturnix coturnix japonica*) y del aturdimiento eléctrico al momento del beneficio sobre las características de la canal. *Zootecnia Tropical* **27** 175-185.

Crespo, G. R., Torres, U. M., Valenzuela, H. L. y Poblete, W. H. (2013). Propiedades químicas, color y humectabilidad de partículas de *Laureliopsis philippiana* (tepa) con y sin tratamiento térmico. *Maderas. Ciencia y Tecnología* **15** 337-348.

Chakraborty, S., Raut, G., Khopade, A., Mahadik, K. y Kokare, C. (2012). Study on calcium ion independent α-amylase from haloalkaliphilic marine *Streptomyces* strain A3. *Indian Journal of Biotechnology* **11** 427-437.

Chandel, A. K., Singh, O. V., Narasu, M. L. y Rao, L. V. (2011). Bioconversion of *Saccharum spontaneum* (wild sugarcane) hemicellulosic hydrolysate into ethanol by mono and co-cultures of *Pichia stipitis* NCIM3498 and thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae*-VS_3. *New biotechnology* **28** (6): 593-599. doi:10.1016/j.nbt.2010.12.002

Chander , K. R., Mehta, G., Gupta, R. y Sharma, K. K. (2010). Fed batch enzymatic saccharification of newspaper cellulosics improves the sugar content in the hydrolysates and eventually the ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biomass and Bioenergy* **34** (8): 1189-1194. doi:10.1016/j.biombioe.2010.03.009

Chandra, R. y Chowdhary, P. (2015). Properties of Bacterial Laccases and Their Application for Bioremediation of Industrial Wastes. *Environ. Science: Processes & Impacts* **17**. doi:10.1039/C4EM00627E

Chaparro, D., Rosas, D. y Varela, A. (2009). Aislamiento y evaluación de la actividad enzimática de hongos descomponedores de madera (Quindío, Colombia). *Revista Iberoamericana de Micología* **26** (4): 238-243. doi:10.1016/j.riam.2009.03.005

Chatepa, L. E. C. y Mbewe, E. C. (2018). Proximate, physical and chemical composition of leaves and seeds of Moringa (*Moringa oleifera*) from Central Malawi: A potential for increasing animal food supply in the 21st century. *African Journal of Agricultural Research* **13**. doi:10.5897/AJAR2018.13535

Chaudhary, I. y Verma, S. R. (2020). Ligninolysis: Roles of Microbes and Their Extracellular Enzymes. *In* "Microbial Bioremediation & Biodegradation" (M. P. Shah, ed.), pp. 393-407. Springer, Singapore.

Chauhan, M. y Garlapati, V. K. (2013). Production and Characterization of a Halo-, Solvent-, Thermo-tolerant Alkaline Lipase by *Staphylococcus arlettae* JPBW-1, Isolated from Rock Salt Mine. *Applied biochemistry and biotechnology* **171**. doi:10.1007/s12010-013-0433-6

Chen, H. (2013). "Modern Solid State Fermentation," Springer, Dordrecht.

Chen, H. (2014). "Biotechnology of Lignocellulose," Springer, Dordrecht.

Chen, H. (2014). Brief Introduction to the Biotechnology of Lignocellulose. *In* "Biotechnology of Lignocellulose: Theory and Practice" (H. Chen, ed.), pp. 1-24. Chemical Industry Press & Springer, Beijing and Dordrecht.

Cheng, J. J. y Timilsina, G. R. (2011). Status and barriers of advanced biofuel technologies: A review. *Renewable Energy* **36** (12): 3541-3549. doi:10.1016/j.renene.2011.04.031

Chenthamarakshan, A., Parambayil, N., Miziriya, N., P s, S., Lakshmi, M., Ramgopal, A., . . . Nambisan, P. (2017). Optimization of laccase production from *Marasmiellus palmivorus* LA1 by Taguchi method of Design of experiments. *BMC biotechnology* **17**. doi:10.1186/s12896-017-0333-x

Cheung, P. C. K. (2013). Mini-review on edible mushrooms as source of dietary fiber: Preparation and health benefits. *Food Science and Human Wellness* **2** (3): 162-166. doi:https://doi.org/10.1016/j.fshw.2013.08.001

Chiranjeevi, P., Pandian, M. y Thadikamala, S. (2014). Enhancement of Laccase Production from *Pleurotus ostreatus* PVCRSP-7 by altering the Nutritional Conditions using Response Surface Methodology. *BioResources* **9**. doi:10.15376/biores.9.3.4212-4225

Choi, S., Nguyen, V. T., Tae, N., Lee, S., Ryoo, S., Min, B. S. y Lee, J. H. (2014). Anti-inflammatory and heme oxygenase-1 inducing activities of lanostane triterpenes isolated from mushroom *Ganoderma lucidum* in RAW264.7 cells. *Toxicology and applied pharmacology* **280** (3): 434-42. doi:10.1016/j.taap.2014.09.007

Choudhary, V. (2012). Production, isolation and characterization of alkaline protease from *Aspergillus versicolor* PF/F/107. *J. Acad. Indus. Res.* **1** 272-277.

Christakopoulos, P., Macris, B. J. y Kekos, D. (1989). Direct fermentation of cellulose to ethanol by *Fusarium oxysporum*. *Enzyme and Microbial Technology* **11** 236-239. doi:10.1016/0141-0229(89)90098-7

Daba, A., Youssef, G., Kabeil, S. y Hafez, E. (2011). Production of recombinant cellulase enzyme from *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. (type NRRL-0366). *African Journal of Microbiology Research* **5**. doi:10.5897/AJMR11.014

Dai, Y. C. (1999). *Phellinus sensu lato* (Aphyllophorales, Hymenochaetaceae) in East Asia. *Acta Botanica Fennica*1-115.

David, P. y Marcia, P. (2008). Corn and Cellulosic Ethanol Cause Major Problems. *Energies* **1**. doi:10.3390/en1010035

de Castro, A., Castilho, L. y Freire, D. (2016). Characterization of babassu, canola, castor seed and sunflower residual cakes for use as raw materials for fermentation processes. *Industrial Crops and Products* **83** 140-148. doi:10.1016/j.indcrop.2015.12.050

Deka, D., Panchangam, B., Sharma, A., Goyal, D., Jawed, M. y Goyal, A. (2011). Enhancement of cellulase activity from a new strain of *Bacillus subtilis* by

medium optimization and analysis with various cellulosic substrates. *Enzyme Research* **2011** (151656): 1-8. doi:10.4061/2011/151656

Den Haan, R., Van Rensburg, E., Rose, S., Görgens, J. y van Zyl, W. (2015). Progress and challenges in the engineering of non-cellulolytic microorganisms for consolidated bioprocessing. *Current opinion in biotechnology* **33** 32-38. doi:10.1016/j.copbio.2014.10.003

Desai, S. S. y Nityanand, C. (2011). Microbial Laccases and their Applications: A Review. *Asian Journal of Biotechnology* **3** 98-124. doi:10.3923/ajbkr.2011.98.124

Deswal, D., Gupta, R., Nandal, P. y Kuhad, R. (2014). Fungal pretreatment improves amenability of lignocellulosic material for its saccharification to sugars. *Carbohydrate polymers* **99** 264-9. doi:10.1016/j.carbpol.2013.08.045

Devisetti, R., Sreerama, Y. N. y Bhattacharya, S. (2016). Processing effects on bioactive components and functional properties of moringa leaves: development of a snack and quality evaluation. *Journal of Food Science & Technology* **53** (1): 649-657. doi:10.1007/s13197-015-1962-5

Dhital, R., Panta, O. y Karki, T. (2014). Optimization of Cultural Conditions for the Production of Pectinase from Selected Fungal Strain. *Journal of Food Science and Technology Nepal* **8**. doi:10.3126/jfstn.v8i0.11752

Dorado, J., Field, J. A., Almendros, G. y Sierra-Alvarez, R. (2001). Nitrogen-removal with protease as a method to improve the selective delignification of hemp stemwood by the white-rot fungus *Bjerkandera* sp. strain BOS55. *Applied microbiology and biotechnology* **57** 205-211. doi:10.1007/s002530100737

Dos Santos Bazanella, G. C., De Souza, D. F., Castoldi, R., Oliveira, R. F., Bracht, A. y Peralta, R. M. (2013). Production of laccase and manganese peroxidase by *Pleurotus pulmonarius* in solid-state cultures and application in dye decolorization. *Folia Microbiologica* **58** (6): 641-647. doi:10.1007/s12223-013-0253-7

Duff, S. y Murray, W. (1996). Bioconversion of forest products industry waste cellulosics to fuel ethanol: A review. *Bioresource technology* **55** 1-33. doi:10.1016/0960-8524(95)00122-0

El-Refai, H., abdel-Naby, M., Mostafa, M. A., Amin, M. A. y Salem, H. A. A. (2017). Statistical optimization for tannase production by *Mucor circinelloides* isolate F6-3-12 under submerged and solid state fermentation. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy* **11** 167-180.

Elisashvili, V. y Kachlishvili, E. (2009). Physiological regulation of laccase and manganese peroxidase production by white-rot Basidiomycete. *Journal of biotechnology* **144** 37-42. doi:10.1016/j.jbiotec.2009.06.020

Elisashvili, V., Kachlishvili, E. y Penninckx, M. (2008). Effect of growth substrate, method of fermentation, and nitrogen source on lignocellulose-degrading enzymes production by white-rot basidiomycetes. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology* **35** (11): 1531-1538. doi:10.1007/s10295-008-0454-2

Elisashvili, V., Penninckx, M., Kachlishvili, E., Tsiklauri, N., Metreveli, E., Khardziani, T. y Kvesitadze, G. (2008). *Lentinus edodes* and *Pleurotus* species lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid state

fermentation of lignocellulosic wastes of different composition. *Bioresource technology* **99** 457-462. doi:10.1016/j.biortech.2007.01.011

Elsayed, M., Hassan M, M., Elshafei, A., Haroun, B. y Othman, A. (2012). Optimization of Cultural and Nutritional Parameters for the Production of Laccase by *Pleurotus ostreatus* ARC280. *British Biotechnology Journal* **2** (3): 115-132. doi:10.9734/BBJ/2012/1305

Elsebaay, H. H., Shoukry, A. A., Hassan, F. R. H. y El-Shall, H. S. (2018). Optimization of Cellulase Enzyme Production from *Pleurotus* under Submerged Fermentation. *Middle East Journal of Agriculture* **7** (1): 50-59.

Fadiyimu, A., Alokan, J., Fajemisin, A. y Onibi, G. (2017). Feed Intake, Growth Performance and Carcass Characteristics of West African Dwarf Sheep Fed *Moringa oleifera, Gliricidia sepium* or Cassava Fodder as Supplements to *Panicum maximum*. *Journal of Experimental Agriculture International* **14** 1-10. doi:10.9734/JEAI/2016/25167

Fai, A. E., Stamford, T. C., Stamford-Arnaud, T. M., Santa-Cruz, P. D., da Silva, M. C., Campos-Takaki, G. M. y Stamford, T. L. (2011). Physico-chemical characteristics and functional properties of chitin and chitosan produced by *Mucor circinelloides* using yam bean as substrate. *Molecules* **16** (8): 7143-54. doi:10.3390/molecules16087143

Falowo, A. B., Mukumbo, F. E., Idamokoro, E. M., Lorenzo, J. M., Afolayan, A. J. y Muchenje, V. (2018). Multi-functional application of *Moringa oleifera* Lam. in nutrition and animal food products: A review. *Food Research International* **106** 317-334. doi:10.1016/j.foodres.2017.12.079

FAO (2020). Meat Market Review. Overview of global meat market developments in 2019. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma.

Farooq, M., Bajwa, A., Alam, S. y Cheema, Z. (2013). Application of Allelopathy in Crop Production. *International Journal of Agriculture and Biology* **15** 1560-8530.

Ferreira, V., Faber, M., Mesquita, S. y Pereira Jr, N. (2010). Simultaneous saccharification and fermentation process of different cellulosic substrates using a recombinant Saccharomyces cerevisiae harbouring the β-glucosidase gene. *Electronic Journal of Biotechnology* **13** 5-6. doi:10.4067/S0717-34582010000200005

Foidl, N., Makkar, H. y Becker, K. (2001). The potential of *Moringa oleifera* for agricultural and industrial uses. *In* "The Miracle Tree: The Multiple Attributes of Moringa" (L. J. Fuglie, ed.), pp. 45-76. Church World Service, Dakar, Senegal.

Fonseca-Peralta, H. M. (2017). Producción de Etanol a partir de Residuos de *Moringa oleifera* Utilizando un Bioproceso Consolidado. Tesis de maestría, Universidad Autónoma de Sinaloa - FCQB, Culiacán, México.

França, F., Freitas, L., Ramos, A., Silva, G. y Brandao, S. (2017). Storage and oxidation stability of commercial biodiesel using *Moringa oleifera* Lam as an antioxidant additive. *Fuel* **203** 627-632. doi:10.1016/j.fuel.2017.03.020

Gadzirayi, C. y Mupangwa, J. F. (2013). Feed Intake and Growth Performance of Indigenous Chicks Fed Diets with *Moringa oleifera* Leaf Meal as a Protein Supplement During Early Brooding Stage. *International Journal of Poultry Science* **13**. doi:10.3923/ijps.2014.145.150

Gakuya, D. W., Mbugua, P. N., Kavoi, B. y Kiama, S. G. (2014). Effect of Supplementation of *Moringa oleifera* Leaf Meal in Broiler Chicken Feed. *International Journal of Poultry Science* **13** (4): 208-213. doi:10.3923/ijps.2014.208.213

Galhaup, C., Wagner, H., Hinterstoisser, B. y Haltrich, D. (2002). Increased Production of Laccase by the Wood Rotting Basidiomycete Trametes pubescens. *Enzyme and Microbial Technology* **30** 529-536. doi:10.1016/S0141-0229(01)00522-1

Gandji, K., Chadare, F. J., Idohou, R., Salako, V., Assogbadjo, A. y Glele Kakaï, R. L. (2018). Status and utilisation of *Moringa oleifera* Lam: A review. *African Crop Science Journal* **26**. doi:10.4314/acsj.v26i1.10

García-Cubero, M., González-Benito, G., Indacoechea, I., Coca, M. y Bolado, S. (2008). Effect of ozonolysis pretreatment on enzymatic digestibility of wheat and rye straw. *Bioresource technology* **100** 1608-13. doi:10.1016/j.biortech.2008.09.012

Geddes, C., Nieves, I. y Ingram, L. (2011). Advances in ethanol production. *Current opinion in biotechnology* **22** 312-319. doi:10.1016/j.copbio.2011.04.012

Ghasemi, Y., Sadeghi, H., Gholami, A., Mohkam, M. y Kargar, M. (2014). Isolation and Identification of Highly Xylanase Producing Bacterium *Sphingobacterium* sp. SaH-05 from Soil. *International Journal of Scientific and Engineering Research* **5** 205-209.

Giardina, P., Faraco, V., Pezzella, C., Piscitelli, A., Vanhulle, S. y Sannia, G. (2009). Laccases: a never-ending story. *Cellular and molecular life sciences* **67** 369-385. doi:10.1007/s00018-009-0169-1

Gilbertson, R. y Ryvarden, L. (1986). *Abortiporus-Lindteria*. *In* "North American Polypores", Vol. 1, pp. 447. Fungiflora, Oslo.

Gilbertson, R. y Ryvarden, L. (1987). *Megasporoporia-Wrigthoporia*. *In* "North American Polypores", Vol. 2, pp. 1-843. Fungiflora, Oslo.

Gilbertson, R. L. y Ryvarden, L. (1986). *Abortiporus-Lindteria*. *In* "North American Polypores. " (R. L. Gilbertson and L. Ryvarden, eds.), Vol. 1, pp. 443. Fungiflora, Oslo.

Glenn, J. K. y Gold, M. H. (1985). Purification and Characterization of an Extracellular Mn(ll)-Dependent Peroxidase from the Lignin-Degrading Basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **242** (2): 329-341. doi:https://doi.org/10.1016/0003-9861(85)90217-6

Glover-Amengor, M., Aryeetey, R., Afari, E. y Nyarko, A. (2017). Micronutrient composition and acceptability of *Moringa oleifera* leaf-fortified dishes by children in Ada-East district, Ghana. *Food science & nutrition* **5** (2): 317-323. doi:10.1002/fsn3.395

Gómez-Mitjans, D., Pita-Bravo, V. y Zumalacárregui de Cárdenas, B. (2016). Caracterización de aceites de las semillas de *Moringa oleifera* a partir de la extracción por diferentes métodos. *Revista Colombiana de Biotecnología* **18** (2): 106. doi:10.15446/rev.colomb.biote.v18n2.54324

Gonzalez, J., Medina, S., Rodriguez-Lopez, E. A., Osma, J., Almeciga-Diaz, C. y Sanchez, O. (2013). Production of *Trametes pubescens* Laccase under

Submerged and Semi-Solid Culture Conditions on Agro-Industrial Wastes. *PloS one* **8** e73721. doi:10.1371/journal.pone.0073721

Gopalakrishnan, L., Doriya, K. y Kumar, D. S. (2016). *Moringa oleifera*: A review on nutritive importance and its medicinal application. *Food Science and Human Wellness* **5** (2): 49-56. doi:10.1016/j.fshw.2016.04.001

Gregg, D. y Saddler, J. (1996). A Techno-Economic Assessment of the Pretreatment and Fractionation Steps of a Biomass-to-Ethanol Process. *Applied biochemistry and biotechnology* **57-58**. doi:10.1007/BF02941753

Gunjal, A. B., Patil, N. N. y Shinde, S. S. (2020). "Enzymes in Degradation of the Lignocellulosic Wastes," Springer, Switzerland.

Gupta, R., Mathur, M., Bajaj, V., Katariya, P., Yadav, S., Kamal, R. y Gupta, R. (2011). Evaluation of antidiabetic and antioxidant activity of *Moringa oleifera* in experimental diabetes. *Journal of diabetes* **4** 164-71. doi:10.1111/j.1753-0407.2011.00173.x

Gutiérrez-Soto, G., Medina, G., García-Zambrano, E., Treviño-Ramírez, J. y Hernández-Luna, C. (2015). Selection and Characterization of a Native *Pycnoporus sanguineus* Strain as a Lignocellulolytic Extract Producer from Submerged Cultures of Various Agroindustrial Wastes. *BioResources* **10**. doi:10.15376/biores.10.2.3564-3576

Güzeldağ, G. y Çolak, O. (2007). Molecular Identification of *Ganoderma lucidum* from Turkey. *International Journal of Agriculture and Biology* **9** (5): 767-770.

Hariharan, S. y Nambisan, P. (2012). Optimization of Lignin Peroxidase, Manganese Peroxidase, and Lac Production from *Ganoderma lucidum* Under Solid State Fermentation of Pineapple Leaf. *BioResources* **8**. doi:10.15376/biores.8.1.250-271

Hasan, M. M., Marzan, L., Hosna, A., Hakim, A. y Azad, A. (2017). Optimization of some fermentation conditions for the production of extracellular amylases by using *Chryseobacterium* and *Bacillus* isolates from organic kitchen wastes. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* **15**. doi:10.1016/j.jgeb.2017.02.009

Herrera-Parra, E., Cristóbal-Alejo, J., Martínez-Bolaños, M., Hernández-Arenas, M. y López-Guillén, G. (2017). Primer registro de *Fusarium solani* y *F. equiseti* en plantaciones de *Jatropha curcas* en México. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology* **35**. doi:10.18781/R.MEX.FIT.1608-1

Hickert, L., Cruz, M., Dillon, A., Fontana, R., Rosa, C. y Ayub, M. (2014). Fermentation kinetics of acid-enzymatic soybean hull hydrolysate in immobilized-cell bioreactors of *Saccharomyces cerevisiae, Candida shehatae, Spathaspora arborariae,* and their co-cultivations. *Biochemical Engineering Journal* **88**. doi:10.1016/j.bej.2014.04.004

Hollmann, M., Razzazi-Fazeli, E., Grajewski, J., Twarużek, M., Sulyok, M. y Böhm, J. (2008). Detection of 3-nitropropionic acid and cytotoxicity in *Mucor circinelloides*. *Mycotoxin research* **24** 140-50. doi:10.1007/BF03032341

Horisawa, S., Inoue, A. y Yamanaka, Y. (2019). Direct Ethanol Production from Lignocellulosic Materials by Mixed Culture of Wood Rot Fungi

Schizophyllum commune, Bjerkandera adusta, and *Fomitopsis palustris*. *Fermentation* **5** 21. doi:10.3390/fermentation5010021

Hou, H., Zhou, J., Wang, J., Du, C. y Yan, B. (2004). Enhancement of Laccase Production by *Pleurotus ostreatus* and Its Use for the Decolorization of Anthraquinone Dye. *Process Biochemistry* **39** 1415-1419. doi:10.1016/S0032-9592(03)00267-X

Hussain, A., Abdel-Salam, M., Abo-Ghalia, H., Hegazy, W. y Hafez, S. (2017). Optimization and molecular identification of novel cellulose degrading bacteria isolated from Egyptian environment. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* **15**. doi:10.1016/j.jgeb.2017.02.007

Ijarotimi, S., Adeoti, O. y Ariyo, O. (2013). Comparative study on nutrient composition, phytochemical, and functional characteristics of raw, germinated, and fermented *Moringa oleifera* seed flour. *Food science & nutrition* **1** (6): 452–463. doi:10.1002/fsn3.70

Imran, M., Anwar, Z., Irshad, M., Asad, M. y Ashfaq, H. (2016). Cellulase production from species of fungi and bacteria from agricultural wastes and its utilization in industry: A review. *Advances in Enzyme Research* **04** 44-55. doi:10.4236/aer.2016.42005

INIFAP (2018). Base de datos metereológica. Estación merereológica Ejido Culiacán, Elota, Sinaloa. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, México.

Isikhuemhen, O., Mikiashvili, N., Senwo, Z. y Ohimain, E. (2014). Biodegradation and Sugar Release from Canola Plant Biomass by Selected White Rot Fungi. *Advances in Biological Chemistry* **4** 395-406. doi:10.4236/abc.2014.46045

Isroi, I., Ria, M., Syamsiah, S., Niklasson, C., Cahyanto, M., Lundquist, K. y Taherzadeh, M. (20

11). Biological pretreatment of lignocelluloses with white-rot fungi and its applications: A review. *Bioresources* **6** 5224-5259.

Itoh, H., Wada, M., Honda, Y., Kuwahara, M. y Watanabe, T. (2003). Bioorganosolve pretreatments for simultaneous saccharification and fermentation of beech wood by ethanolysis and white rot fungi. *Journal of biotechnology* **103** 273-80. doi:10.1016/S0168-1656(03)00123-8

Ivase, T. (2015). A Review of *Moringa oleifera* Seed Oil as Feedstock for Biodiesel Production. *Journal of Multidisciplinary Engineering Science and Technology (JMEST)* **2** (12). doi:ttps://www.researchgate.net/publication/327405945

Jaouani, A., Tabka, M. y Penninckx, M. (2006). Lignin modifying enzymes of *Coriolopsis polyzona* and their role in olive oil mill wastewaters decolorisation. *Chemosphere* **62** 1421-30. doi:10.1016/j.chemosphere.2005.05.040

Jayashree, S., Rathinamala, J. y Lakshmanaperumalsamy, P. (2014). Anti-termite properties of root and leaf powder of vetiver grass. *Journal of Environmental Biology* **35** 193-196.

Jeong, H., Cha, J.-Y., Choi, J., Jang, K.-S., Lim, J., Kim, W. Y., . . . Jeon, J.-R. (2018). One-Pot Transformation of Technical Lignins into Humic-Like Plant

Stimulants through Fenton-Based Advanced Oxidation: Accelerating Natural Fungus-Driven Humification. *ACS-Omega* **3** 7441-7453. doi:10.1021/acsomega.8b00697

Jin, M., Gunawan, C., Balan, V. y Dale, B. (2012). Consolidated bioprocessing (CBP) of AFEX-pretreated corn stover for ethanol production using. *Biotechnology and bioengineering* **109** 1929-36. doi:10.1002/bit.24458

Jin, M., Sarks, C., Gunawan, C., Bice, B., Simonett, S., Avanasi Narasimhan, R., . . . Sato, T. (2013). Phenotypic selection of a wild *Saccharomyces cerevisiae* strain for simultaneous saccharification and co-fermentation of AFEX^{TM} pretreated corn stover. *Biotechnology for biofuels* **6** 108. doi:10.1186/1754-6834-6-108

Jülich, W. y Stalpers, J. A. (1980). "The resupinate non-poroid aphyllophorales of the temperate Northern hemisphere," North-Holland Publishing Company.

Juniar, I., Widodo, E. y Sjofjan, O. (2008). Effect of *Moringa oleifera* leaf meal in feed on broiler production performance. *Jurnal Ilmuilmu Peternakan Brawijaya* **18** 238-242.

Juturu, V. y Wu, J. (2013). Insight into microbial hemicellulases other than xylanases: A review. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **88** 353-363. doi:10.1002/jctb.3969

Kakengi, A. M. V., Kaijage, J. T., Sarwatt, S. V., Mutayoba, S., Shem, M. N. y Fujihara, T. (2007). Effect of *Moringa oleifera* leaf meal as a substitute for sunflower seed meal on performance of laying hens in Tanzania. *Livestock Research for Rural Development* **19**.

Kaswarjono, Y., Soedarmanto, I., Nururrozi, A., Raharjo, S. y Purnamaningsih, H. (2019). Brief Review: The Negative Impact Of Mimosin in *L. leucocephala* in Ruminant Animals and Processing Methods to Reduce Poisoning Effects on Ruminant Livestock. *Journal of Livestock Science and Production* **3** 199-213. doi:10.31002/jalspro.v3i2.2037

Keshwani, D. y Cheng, J. (2009). Switchgrass for Bioethanol and Other Value-Added Applications: A Review. *Bioresource technology* **100** 1515-23. doi:10.1016/j.biortech.2008.09.035

Khider, T. (2012). Heat Value of Four Hardwood Species from Sudan. *Journal of Forest Products and Industries* **1** 5-9.

Kholif, A., Gouda, G., Galyean, M., Anele, U. y Morsy, T. (2019). Extract of *Moringa oleifera* leaves increases milk production and enhances milk fatty acid profile of Nubian goats. *Agroforestry Systems* **93** 1877-1886. doi:10.1007/s10457-018-0292-9

Kholif, A., Gouda, G., Olafadehan, O. y Abdo, M. (2018). Effects of replacement of *Moringa oleifera* for berseem clover in the diets of Nubian goats on feed utilisation, and milk yield, composition and fatty acid profile. *Animal : an international journal of animal bioscience* **12** (5): 964–972. doi:10.1017/S1751731117002336

Kim, K. y Hong, J. (2001). Supercritical CO2 pretreatment of lignocellulose enhances enzymatic cellulose hydrolysis. *Aspen Bibliography* **77**. doi:10.1016/S0960-8524(00)00147-4

Kirk, O., Borchert, T. V. y Fuglsang, C. C. (2002). Industrial enzyme applications. *Current opinion in biotechnology* **13** (4): 345-351. doi:https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00328-2

Kirk, P., Cannon, P., Stalpers, J. y Minter, D. W. (2008). "Dictionary of the Fungi," 10/Ed. CABI Publishing-UK, London.

Kirk, T., Schultz, E. E., Connors, W., Lorenz, L. y Zeikus, J. (1978). Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of Microbiology* **117** 277-285. doi:10.1007/BF00738547

Knežević, A., Milovanovic, I., Stajic, M. y Vukojevic, J. (2013). Potential of Trametes species to degrade lignin. *International Biodeterioration and Biodegradation* **85** 52-56. doi:10.1016/j.ibiod.2013.06.017

Krishna, H. S., Reddy, T. y Chowdary, G. (2001). Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic wastes to ethanol using a thermotolerant yeast. *Bioresource technology* **77** 193-6. doi:10.1016/S0960-8524(00)00151-6

Kucharska, K., Rybarczyk, P., Holowacz, I., Łukajtis, R., Glinka, M. y Kamiński, M. (2018). Pretreatment of Lignocellulosic Materials as Substrates for Fermentation Processes. *Molecules* **23** 2937. doi:10.3390/molecules23112937

Kuhad, R., Gupta, R. y Singh, A. (2011). Microbial Cellulases and Their Industrial Applications. *Enzyme research* **2011** 280696. doi:10.4061/2011/280696

Kumar, A. y Chandra, R. (2020). Ligninolytic enzymes and its mechanisms for degradation of lignocellulosic waste in environment. *Heliyon* **6** (2): e03170-e03170. doi:10.1016/j.heliyon.2020.e03170

Kumar, C. G. y Takagi, H. (1999). Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology advances* **17** 561-94.

Kumar, P., Barrett, D., Delwiche, M. y Stroeve, P. (2009). Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **48** 3713-3729. doi:10.1021/ie801542g

Kumar, R. y Wyman, C. (2009). Effects of Cellulase and Xylanase Enzymes on the Deconstruction of Solids from Pretreatment of Poplar by Leading Technologies. *Biotechnology progress* **25** 302-14. doi:10.1002/btpr.102

Kumar, S., Dheeran, P., Singh, S. P., Mishra, I. M. y Adhikari, D. K. (2015). Bioprocessing of bagasse hydrolysate for ethanol and xylitol production using thermotolerant yeast. *Bioprocess and biosystems engineering* **38** (1): 39-47. doi:10.1007/s00449-014-1241-2

Kumar, S. y Sarma, A. (2013). "Recent Advances in Bioenergy Research. Vol. I."

Kumar, S., Sarma, A., Tyagi, S. y Yadav, Y. (2014). "Recent Advances in Bioenergy Research. Vol. III."

Kumar, V., Thakur, I. S. y Shah, M. P. (2020). Bioremediation Approaches for Treatment of Pulp and Paper Industry Wastewater: Recent Advances and Challenges. *In* "Microbial Bioremediation & Biodegradation" (M. P. Shah, ed.), pp. 1-48. Springer, Singapore.

Kumari, D. y Singh, R. (2018). Pretreatment of lignocellulosic wastes for biofuel production: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **90** 877-891. doi:https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.03.111

Lai, Y. Z. (2001). Chemical Degradation. *In* "Wood and Cellulosic Chemistry" (D. N. S. Hon and N. Shiraishi, eds.), pp. 923. Marcel Dekker, New York and Basel.

Lailaja, V. P. y Muthusamy, C. (2013). Detergent compatible alkaline lipase produced by marine *Bacillus smithii* BTMS 11. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **29**. doi:10.1007/s11274-013-1298-0

Lalas, S. y Tsaknis, J. o. I. (2002). Characterization of *Moringa oleifera* Seed Oil Variety “Periyakulam 1”. *Journal of Food Composition and Analysis* **15** 65-77. doi:10.1006/jfca.2001.1042

Lallawmsanga, Leo, V. V., Passari, A. K., Muniraj, I. K., Uthandi, S., Hashem, A., . . . Singh, B. P. (2019). Elevated levels of laccase synthesis by *Pleurotus pulmonarius* BPSM10 and its potential as a dye decolorizing agent. *Saudi journal of biological sciences* **26** (3): 464-468. doi:10.1016/j.sjbs.2018.10.006

Larsen, M. J. y Cobb-Poulle, L. A. (1990). "*Phellinus* (Hymenochaetaceae): A Survey of the World Taxa," Fungiflora.

Lashari, S., Dahot, M., Habib, S., Naqvi, S. H. y Khan, M. (2011). Optimization of culture condition for protease production by *Aspergillus niger*. Vol. 8.

Lee, J. W., Kim, H. Y., Koo, B. W., Choi, D. H., Kwon, M. y Choi, I. G. (2008). Enzymatic saccharification of biologically pretreated *Pinus densiflora* using enzymes from brown rot fungi. *Journal of bioscience and bioengineering* **106** (2): 162-7. doi:10.1263/jbb.106.162

Lee, K. Y., Yang, H. J. y Song, K. B. (2016). Application of a puffer fish skin gelatin film containing *Moringa oleifera* Lam. leaf extract to the packaging of Gouda cheese. *Journal of food science and technology* **53** (11): 3876-3883. doi:10.1007/s13197-016-2367-9

Lennartsson, P., Erlandsson, P. y Taherzadeh, M. (2014). Integration of the first and second generation bioethanol processes and the importance of by-products. *Bioresource technology* **165**. doi:10.1016/j.biortech.2014.01.127

Leone, A., Spada, A., Battezzati, A., Schiraldi, A., Aristil, J. y Bertoli, S. (2016). *Moringa oleifera* Seeds and Oil: Characteristics and Uses for Human Health. *International Journal of Molecular Science* **17** (12). doi:10.3390/ijms17122141

Levasseur, A., Lomascolo, A., Chabrol, O., Ruiz-Dueñas, F. J., Boukhris-Uzan, E., Piumi, F., . . . van den Brink, J. (2014). The genome of the white-rot fungus Pycnoporus cinnabarinus: a basidiomycete model with a versatile arsenal for lignocellulosic biomass breakdown. *BMC genomics* **15** (1): 486. doi:10.1186/1471-2164-15-486

Lezcano, J., Alonso, O., Trujillo, M. y Martinez de la Parte, E. (2014). Fungal agents associated to disease symptoms in seedlings of *Moringa oleifera* Lamarck. *Pastos y Forrajes* **37** 166-172.

Liang, L., Wang, C., Li, S., Chu, X. y Sun, K. (2019). Nutritional compositions of Indian *Moringa oleifera* seed and antioxidant activity of its polypeptides. *Food science & nutrition* **7** (5): 1754-1760. doi:10.1002/fsn3.1015

Lim, T. K. (2012). *Moringa oleifera*. *In* "Edible Medicinal and Non-Medecinal Plants", Vol. 3 pp. 453-485. Springer Science+Bussines Media B.V.

Lincoln, L. y More, S. (2017). "Screening and enhanced production of neutral invertase from Aspergillus sp. by utilization of molasses - A by-product of sugarcane industry."

Lincoln, L. y More, S. (2018). Purification and biochemical characterization of an extracellular β-D-fructofuranosidase from *Aspergillus* sp. *3 Biotech* **8** (86): 2-11. doi:10.1007/s13205-018-1109-2

Lincoln, L., Niyonzima, F. y More, S. (2015). Purification and properties of a fungal L-asparaginase from *Trichoderma viride* Pers: SF Grey. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* **2015**. doi:10.15414/jmbfs.2014.4.4.310-316

Liu, C. y Wyman, C. (2003). The Effect of Flow Rate of Compressed Hot Water on Xylan, Lignin, and Total Mass Removal from Corn Stover. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **42** 5409-5416. doi:10.1021/ie030458k

Liu, L., Lin, Z., Zheng, T., Lin, L., Zheng, C., Lin, Z., . . . Wang, Z. (2009). Fermentation optimization and characterization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* strain 10969. *Enzyme and Microbial Technology* **44** (6-7): 426-433. doi:10.1016/j.enzmictec.2009.02.008

Liu, S., Alavi, S. y Abughoush, M. (2011). Extruded Moringa Leaf–Oat Flour Snacks: Physical, Nutritional, and Sensory Properties. *International Journal of Food Properties* **14** (4): 854-869. doi:10.1080/10942910903456358

Londoño-Hernández, L., Ruiz, H. A., Ramírez-Toro, C., Ascacio-Valdés, A., Rodríguez-Herrera, R., Aguilera-Carbó, A., . . . Aguilar, C. N. (2020). Advantages and Progress Innovations of Solid-State Fermentation to Produce Industrial Enzymes. *In* "Microbial Enzymes: Roles and Applications in Industries" (N. K. Arora, J. Mishra and V. Mishra, eds.). Springer, Singapore.

López-Contreras, A., Gabor, K., Martens, A., Renckens, B., Claassen, P., Oost, J. y De Vos, W. (2004). Substrate-Induced Production and Secretion of Cellulases by *Clostridium acetobutylicum*. *Applied and Environmental Microbiology* **70** 5238-5243. doi:10.1128/AEM.70.9.5238-5243.2004

Lueangjaroenkit, P., Teerapatsakul, C. y Chitradon, L. (2018). Morphological Characteristic Regulation of Ligninolytic Enzyme Produced by *Trametes polyzona*. *Mycobiology* **46** (4): 396-406. doi:10.1080/12298093.2018.1537586

Lueangjaroenkit, P., Teerapatsakul, C., Sakka, K., Sakka, M., Kimura, T., Kunitake, E. y Chitradon, L. (2019). Two Manganese Peroxidases and a Laccase of *Trametes polyzona* KU-RNW027 with Novel Properties for Dye and Pharmaceutical Product Degradation in Redox Mediator-Free System. *Mycobiology* **47** (2): 217-229. doi:10.1080/12298093.2019.1589900

Maalej, H., Hmidet, N. y ghorbel bellaaj, O. (2013). Purification and Biochemical characterization of a detergent stable α-amylase from *Pseudomonas stutzeri* AS22. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* **18** 878-887. doi:10.1007/s12257-012-0862-z

Machado, A., Valadares, F., Silva, T., Milagres, A., Segato, F. y Ferraz, A. (2020). The Secretome of *Phanerochaete chrysosporium* and *Trametes versicolor* Grown in Microcrystalline Cellulose and Use of the Enzymes for Hydrolysis of Lignocellulosic Materials. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* **8** 1-15. doi:10.3389/fbioe.2020.00826

Machado Pasin, T., Zaghetto de Almeida, P., de Almeida Scarcela, A. S., Infante, J. d. C. y Lourdes, T. d. M. P. M. d. (2020). Bioconversion of Agro-industrial

Residues to Second-Generation Bioethanol *In* "Biorefinery of Alternative Resources: Targeting Green Fuels and Platform Chemicals" (S. Nanda, D.-V. N. Vo and P. K. Sarangi, eds.), pp. 23-47. Springer, Singapore.

Madhavan, A., Srivastava, A., Kondo, A. y Bisaria, V. S. (2011). Bioconversion of lignocellulose-derived sugars to ethanol by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Critical reviews in biotechnology* **32** 22-48. doi:10.3109/07388551.2010.539551

Mahmoud, A. E. M. (2013). Effect of feeding on *Moringa oleifera* stems on productive performance of growing lambs. *Egyptian J. Nutrition and Feeds* **16** (2): 281-292.

Makkar, H. y Becker, K. (1996). Nutrional value and antinutritional components of whole and ethanol extracted *Moringa oleifera* leaves. *Animal Feed Science and Technology* **63** 211-228. doi:10.1016/S0377-8401(96)01023-1

Makkar, H. P., Francis, G. y Becker, K. (2007). Bioactivity of phytochemicals in some lesser-known plants and their effects and potential applications in livestock and aquaculture production systems. *Animal : an international journal of animal bioscience* **1** (9): 1371-91. doi:10.1017/S1751731107000298

Makkar, H. P. S. y Becker, K. (1997). Nutrients and antiquality factors in different morphological parts of the *Moringa oleifera* tree. *The Journal of Agricultural Science* **128** (3): 311-322. doi:10.1017/S0021859697004292

Manh, L. H., Dung, N. N. X. y Ngoi, T. P. (2005). Introduction and evaluation of *Moringa oleifera* for biomass production and as feed for goats in the Mekong Delta. *Livestock Research for Rural Development* **17** 104.

Martín-Medina, C., Galbe, M. y Jönsson, L. (2002). Comparison of the Fermentability of Enzymatic Hydrolyzates of Sugarcane Bagasse Pretreated by Steam Explosion Using Different Impregnating Agents. *Applied biochemistry and biotechnology* **98-100** (02): 699-716. doi:10.1385/ABAB:98-100:1-9:699

Martín, C., Martín, G., García, A., Fernández, T., Hernández, E. y Puls, J. (2013). Potenciales aplicaciones de *Moringa oleifera*. Una revisión crítica. *Pastos y Forrajes* **36** 137-149.

Martínez, M. (1959). Plantas útiles de la flora mexicana. pp. 612. Ediciones Botas, México, D.F.

Mateos, G., Jimenez Moreno, E., Serrano, M. y Lazaro, R. (2012). Poultry response to high levels of dietary fiber sources varying in physical and chemical characteristics. *The Journal of Applied Poultry Research* **21** 156-174. doi:10.3382/japr.2011-00477

Matera, I., Gullotto, A., Tilli, S., Ferraroni, M. y Scozzafava, A. (2008). Crystal structure of the blue multicopper oxidase from the white-rot fungus Trametes trogii complexed with p-toluate. *Inorganica Chimica Acta - INORG CHIM ACTA* **361** 4129-4137. doi:10.1016/j.ica.2008.03.091

Mathur, A. (2014). Isolation, purification and characterization of alkaline pectinase from *Bacillus subtilis* isolated from soil. *Der Pharmacia Sinica* **5** (6): 1-6. doi:https://www.researchgate.net/publication/304180383

McIntosh, S. y Vancov, T. (2010). Enhanced enzyme saccharification of *Sorghum bicolor* straw using dilute alkali pretreatment. *Bioresource technology* **101** 6718-27. doi:10.1016/j.biortech.2010.03.116

Megazyme (2017). Screening for Polysaccharide endo-Hydrolases using Insoluble Dyed Polysaccharide. Vol. 4, pp. 1-9.

Mendieta-Araica, B., Spörndly, E., Reyes-Sánchez, N., Salmerón-Miranda, F. y Halling, M. (2012). Biomass production and chemical composition of *Moringa oleifera* under different planting densities and levels of nitrogen fertilization. *Agroforestry Systems* **87** 81-92. doi:10.1007/s10457-012-9525-5

Metreveli, E., Kachlishvili, E., Singer, S. y Elisashvili, V. (2017). Alteration of white-rot basidiomycetes cellulase and xylanase activities in the submerged co-cultivation and optimization of enzyme production by Irpex lacteus and *Schizophyllum commune*. *Bioresource technology* **241** 652–660. doi:10.1016/j.biortech.2017.05.148

Meza-Carranco, Z., Olivares-Sáenz, E., Gutiérrez-Ornelas, E., Bernal-Barragán, H., Arana-Ruiz, J., Vázquez-Alvarado, R. E. y Carranza-de la Rosa, R. (2016). Crecimiento y producción de biomasa de moringa (*Moringa oleifera* Lam.) bajo las condiciones climáticas del Noreste de México. *Tecnociencia Chihuahua* **10** (3).

Mikiashvili, N., Wasser, S., Nevo, E. y Elisashvili, V. (2006). Effect of carbon and nitrogen sources on *Pleurotus ostreatus* ligninolytic enzyme activity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **22** 999-1002. doi:10.1007/s11274-006-9132-6

Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry* **31** 3.

Mini, K. D., Paul, M. K. y Mathew, J. (2012). Screening of fungi isolated from poultry farm soil for keratinolytic activity. *Advances in Applied Science Research,* **3** (4): 2073-2077.

Mohd Ghazali, H. y Mohammed, A. (2011). *Moringa oleifera* seed oil: Composition, nutritional aspects and health attributes. *In* "Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention" (R. R. W. a. V. B. P. Victor R. Preedy, ed.), pp. 787-794. Elsevier Life Sciences.

Moniruzzaman, M. y Ono, T. (2012). Ionic liquid assisted enzymatic delignification of wood biomass: A new ‘green’ and efficient approach for isolating of cellulose fibers. *Biochemical Engineering Journal* **60** 156–160. doi:10.1016/j.bej.2011.11.001

Montaño-Morales, H. F. (2014). Producción de Bioetanol a Partir de Material Lignocelulósico de *Moringa oleifera*, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

More, S., Niraja, R., Evelyn, C. R., Byadgi, A. M., Shwetha, V. y Mangaraj, S. D. (2012). Isolation, purification and biochemical characterization of CGTase from *Bacillus halodurans*. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* **7** (1-2): 90-97.

More, S., Shrinivas, S., Agarwal, A., Chikkanna, A., Janardhan, B. y Niyonzima, F. (2015). Purification and characterization of phytase from *Bacillus lehensis* MLB2. *Biologia* **70**. doi:10.1515/biolog-2015-0049

More, S., Swamy, R., Mohan, N., Navyashree, M., Janardhan, B. y Niyonzima, F. (2016). Purification and Characterization of Anti-cancer l-Glutaminase of *Bacillus cereus* Strain LC13. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **88**. doi:10.1007/s40011-016-0808-x

Morton, J. (1991). The horseradish tree, *Moringa pterygosperma* (Moringaceae) - a boon to arid lands? *Economic Botany*318-333.

Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y. Y., Holtzapple, M. y Ladisch, M. (2005). Features of Promising Technologies for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass. *Bioresource technology* **96** 673-686. doi:10.1016/j.biortech.2004.06.025

Muddapur, U., Bennur, R., M0re, V., Niyonzima, F. y More, S. (2013). Isolation and Characterization of β-amylase from *Penicillim nigricans*. *Biotechnology An Indian Journal* **7** 85-88.

Mukhopadhyay, M., Kuila, A., Tuli, D. y Banerjee, R. (2011). Enzymatic depolymerization of *Ricinus communis*, a potential lignocellulosic for improved saccharification. *Biomass & Bioenergy* **35** 3584-3591. doi:10.1016/j.biombioe.2011.05.013

Mukumbo, F., Muchenje, V., Hugo, A., Nkukwana, T., Maphosa, V. y Mabusela, T. (2014). Effect of *Moringa oleifera* leaf meal on finisher pig growth performance, meat quality, shelf life and fatty acid composition of pork. *South African Journal Of Animal Science* **44** 388.

Muthukumar, M., Naveena, B., Vaithiyanathan, S., Sen, A. y Sureshkumar, K. (2012). Effect of incorporation of Moringa oleifera leaves extract on quality of ground pork patties. *Journal of food science and technology* **51**. doi:10.1007/s13197-012-0831-8

Nadeem, M. y Imran, M. (2016). Promising features of *Moringa oleifera* oil: Recent Updates and Perspectives. *Lipids in Health and Disease* **15** (12): 1-8. doi:10.1186/s12944-016-0379-0

Ndubuaku, M., N, N. y E, N. (2014). Yield Characteristics of *Moringa oleifera* Across Different Ecologies in Nigeria as an Index of Its Adaptation to Climate Change. *Sustainable Agriculture Research* **3** (1): 1-7. doi:10.5539/sar.v3n1p95

Neoh, C., Lam, C., Lim, C., Yahya, A. y Ibrahim, Z. (2013). Decolorization of palm oil mill effluent using growing cultures of *Curvularia clavata*. *Environmental Science and Pollution Research International* **21** 4397–4408. doi:10.1007/s11356-013-2350-1

Nerurkar, M., Joshi, M., Pariti, S. y Adivarekar, R. (2013). Application of Lipase from Marine Bacteria *Bacillus sonorensis* as an Additive in Detergent Formulation. *Journal of Surfactants and Detergents* **16**. doi:10.1007/s11743-012-1434-0

Neves, M., Kimura, T., Shimizu, N. y Nakajima, M. (2007). State of the Art and Future Trends of Bioethanol Production. *Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology* **1** 1-14.

Niyonzima, F. y More, S. (2013). Screening and optimization of cultural parameters for an alkaline protease production by *Aspergillus terreus* Gr. under submerged fermentation. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* **4** B1016-B1028.

Niyonzima, F. y More, S. (2014). Concomitant production of detergent compatible enzymes by *Bacillus flexus* XJU-1. *Brazilian Journal of Microbiology* **45** 903-910. doi:10.1590/S1517-83822014000300020

Niyonzima, F. N., Veena, S. M. y More, S. S. (2020). Industrial Production and Optimization of Microbial Enzymes. *In* "Microbial Enzymes: Roles and

Applications in Industries" (A. N., M. J. and M. V., eds.). Springer, Singapore.

Nouman, W., Basra, S. M. A., Siddiqui, M. T., Yasmeen, A., Gull, T. y Alcayde, M. A. C. (2014). Potential of *Moringa oleifera* L. as livestock fodder crop: a review. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* **38** 1-14. doi:10.3906/tar-1211-66

Nouman, W., Siddiqui, M., Maqsood, S., Khan, R., Gull, T., Olson, M. y Munir, H. (2012). Response of *Moringa oleifera* to Saline Conditions. *International Journal of Agriculture and Biology* **14** 557-562.

NRC (1994). Nutrient Requirements of Poultry. (N. R. Council, ed.), Vol. 3, pp. 176. The National Academies Press, Washington, DC.

Nüske, J., Scheibner, K., Dornberger, U., Ullrich, R. y Hofrichter, M. (2002). Large scale production of manganese-peroxidase using agaric white-rot fungi. *Enzyme and Microbial Technology* **30** 556-561. doi:10.1016/S0141-0229(02)00013-3

Nzikou, J. M., Matos, L., Moussounga, J. E., Ndangui, C. B., Kimboguila, A., Silou, T., . . . Desobry, S. (2009). Characterization of *Moringa oleifera* seed oil variety Congo-Brazaville. *Journal of Food Technology* **7** 59-65. doi:http://medwelljournals.com/abstract/?doi=jftech.2009.59.65

O'Hara, I. M. (2016). "Sugarcane-based biofuels and bioproducts," JohnWiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.

Ochi, E., Ismail, A., Abdalla, H., Fatur, M. y Me, E. (2015). Effect of Moringa (*Moringa oleifera* Lam) Seeds on the Performance and Carcass Characteristics of Broiler Chickens. **5**.

Ogbe, A. y Affiku, J. (2011). Proximate study, mineral and anti-nutrient composition of *Moringa oleifera* leaves harvested from Lafia, Nigeria: Potential benefits in poultry nutrition and health. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* **1** 296-308.

Oghenebrorhie, O. y Oghenesuvwe, O. (2016). Performance and Haematological Characteristics of Broiler Finisher Fed *Moringa oleifera* Leaf Meal Diets. *Journal of Northeast Agricultural University (English Edition)* **23** (1): 28-34. doi:10.1016/s1006-8104(16)30029-0

Ogunsina, B. S., Radha, C. y Govardhan Singh, R. S. (2010). Physicochemical and functional properties of full-fat and defatted *Moringa oleifera* kernel flour. *International Journal of Food Science & Technology* **45** (11): 2433-2439. doi:10.1111/j.1365-2621.2010.02423.x

Okamoto, K., Nitta, Y., Maekawa, N. y Yanase, H. (2011). Direct ethanol production from starch, wheat bran and rice straw by the white rot fungus *Trametes hirsuta*. *Enzyme and Microbiology Technology* **48** (3): 273-277. doi:10.1016/j.enzmictec.2010.12.001

Okamoto, K., Uchii, A., Kanawaku, R. y Yanase, H. (2014). Bioconversion of xylose, hexoses and biomass to ethanol by a new isolate of the white rot basidiomycete *Trametes versicolor*. *Springerplus* **3** 121-121. doi:10.1186/2193-1801-3-121

Olagbemide, P., Philip, C. y Alikwe (2014). Proximate Analysis and Chemical Composition of Raw and Defatted *Moringa oleifera* Kernel. *Advances in Science and Technology* **24** 92-99.

Oliveira, J., Silveira, S., Vasconcelos, I., Cavada, B. y Moreira, R. (1999). Compositional and nutritional attributes of seeds from the multiple purpose tree *Moringa oleifera* Lamarck. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **79** 815-820. doi:10.1002/(SICI)1097-0010(19990501)79:6<815::AID-JSFA290>3.0.CO;2-P

Olson, M. E. (2002). Combining data from DNA sequences and morphology for phylogeny of Moringaceae. *Systematic Botany*55-73.

Olson, M. E. y Alvarado-Cárdenas, L. O. (2016). ¿Dónde cultivar el árbol milagro, *Moringa oleifera*, en México? Un análisis de su distribución potencial. *Revista Mexicana de Biodiversidad* **87** (3): 1089-1102. doi:10.1016/j.rmb.2016.07.007

Olson, M. E. y Fahey, J. W. (2011). *Moringa oleifera*: un árbol multiusos para las zonas tropicales secas. *Revista mexicana de biodiversidad* **82** 1071-1082. doi:10.22201/ib.20078706e.2011.4.678

Olugbemi, T., Mutayoba, S. y Lekule, F. (2010). Evaluation of *Moringa oleifera* leaf meal inclusion in cassava chip based diets fed to laying birds. *Livestock Research for Rural Development* **22** (6): 1-6.

Orth, A. B., Royse, D. J. y Tien, M. (1993). Ubiquity of Lignin-Degrading Peroxidases among Various Wood-Degrading Fungi. *Applied and Enviromental Microbiology* **59** (12): 4017-4023.

Osorio-González, C. S., Chaali, M., Hegde, K., Brar, S. K., Kermanshahipour, A. y A., A.-R. (2020). Production and Processing of the Enzymes from Lignocellulosic Biomass. *In* "Valorization of Biomass to Value-Added Commodities" (M. O. Daramola and A. O. Ayeni, eds.), pp. 221-244. Springer, Switzerland.

Pachauri, P., More, S., Aranganathan, V., Sullia, S. B. y Deshmukh, S. (2018). Kinetic Study and Characterization of Cellulase Enzyme from Isolated *Aspergillus niger* subsp. *awamori* for Cellulosic Biofuels. *Journal of Scientific & Industrial Research* **77** 55-60. doi:http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/43308

Padhiar, J., Das, D. A. y Bhattacharya, D. S. (2011). Optimization of Process Parameters Influencing the Submerged Fermentation of Extracellular Lipases from *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* and *Aspergillus flavus*. *Pakistan Journal of Biological Sciences* **14** 1011-1018. doi:10.3923/pjbs.2011.1011.1018

Pan, X., Xie, D., Gilkes, N., Gregg, D. y Saddler, J. (2005). Strategies to Enhance the Enzymatic Hydrolysis of Pretreated Softwood with High Residual Lignin Content. *Applied biochemistry and biotechnology* **121-124** 1069-1079. doi:10.1385/ABAB:124:1-3:1069

Panagiotou, G., Christakopoulos, P., Villas-Boas, S. G. y Olsson, L. (2005). Fermentation performance and intracellular metabolite profiling of *Fusarium oxysporum* cultivated on a glucose–xylose mixture. *Enzyme and Microbial Technology* **36** (1): 100-106. doi:10.1016/j.enzmictec.2004.07.009

Panagiotou, G., Topakas, E., Moukouli, M., Christakopoulos, P. y Olsson, L. (2011). Studying the ability of *Fusarium oxysporum* and recombinant *Saccharomyces cerevisiae* to efficiently cooperate in decomposition and

ethanolic fermentation of wheat straw. *Biomass and Bioenergy* **35** (8): 3727-3732. doi:10.1016/j.biombioe.2011.05.005

Panosyan, H. (2019). Thermoactinomycetes isolated from geothermal springs in Armenia capable of producing extracellular hydrolases. *Environmental Sustainability*. doi:10.1007/s42398-019-00066-0

Parmasto, E. (2001). Hymenochaetoid fungi (Basidiomycota) of North America. *Mycotaxon* **79** 107-176.

Parrotta, J. A. (2009). *Moringa oleifera*. *In* "Enzyklopädie der Holzgewächse, Handbuch und Atlas der Dendrologie" (A. Roloff, H. Weisgerber, U. M. Lang and B. Stimm, eds.). WILEY-VCH Verlag GmbH & Co., KGaA, Weinheim, Germany.

Patel, A., Patel, V., Patel, H., Trivedi, U. y Patel, K. (2020). White Rot Fungi: Nature's Scavenger. *In* "Microbial Bioremediation & Biodegradation" (M. P. Shah, ed.), pp. 266-307. Springer, Singapore.

Patel, S., Onkarappa, R. y Shobha, K. S. (2007). Comparative Study of Ethanol Production from Microbial Pretreated Agricultural Residues. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management* **11** (4): 137-141.

Pathak, A. P. y Deshmukh, K. B. (2012). Alkaline protease production, extraction and characterization from alkaliphilic *Bacillus licheniformis* KBDL4: A Lonar soda lake isolate. *Indian Journal of Experimental Biology* **50** 569-576.

Pérez-Ángel, R. (2011). "*Moringa oleifera*: una alternativa forrajera para ovinos," Fundación Produce Sinaloa, Culiacán, México.

Pérez-Ángel, R., de la Cruz-Benítez, J. O., Vázquez-García, G. E. y Obregón, J. F. (2010). *Moringa oleifera*, una nueva alternativa forrajera para Sinaloa. pp. 1-27. Fundación Produce Sinaloa A.C.-SAGARPA-Gobierno del Estado de Sinaloa, Culiacán, México.

Pérez-Viveros, K., Gutiérrez-Dorado, R., Aldapa, C., Reyes-Moreno, C., Navarro-Cortez, R., Bautista-Monroy, S., . . . Cadena, A. (2019). Effect of extrusion in the elaboration of an animal feed based on *Moringa oleifera* Lam and *Zea mays* as a partial substitute of fishmeal in the diet of the adult stage of *Oreochromis niloticus*. *Acta Universitaria* **29** 1-17. doi:10.15174/au.2019.2266

Pérez, A., Sánchez, T., Armengol, L. N. y Reyes, F. (2010). Characteristics and potential of *Moringa oleifera*, Lamark. An alternative for animal feeding. *Pastos y Forrajes* **33** 349-362.

Petre, C. V. y Tănase, C. (2013). Culture characteristics of 20 lignicolous basidiomycetes species that synthesize volatile organic compounds. *Analele Ştiinţifice ale Universităţii "Al. I. Cuza"* **59** (2): 15.

Phalip, V., Goubet, F., Carapito, R. y Jeltsch, J.-M. (2009). Plant Cell Wall Degradation with a Powerful *Fusarium graminearum* Enzymatic Arsenal. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **19** 573-81. doi:10.4014/jmb.0807.459

Phitsuwan, P., Sakka, K. y Ratanakhanokchai, K. (2013). Improvement of lignocellulosic biomass in planta: A review of feedstocks, biomass recalcitrance, and strategic manipulation of ideal plants designed for ethanol production and processability. *Biomass and Bioenergy* **58** 390-405. doi:10.1016/j.biombioe.2013.08.027

Pinar, O., Tamerler, C. y Yazgan Karataş, A. (2017). Heterologous expression and characterization of a high redox potential laccase from *Coriolopsis polyzona* MUCL 38443. *Turkish Journal of Biology* **41** 278-291. doi:10.3906/biy-1605-51

Pointing, S. B. (1999). Qualitative methods for the determination of lignocellulolytic enzyme production by tropical fungi. *Fungal Diversity* **2** 17-33.

Poletto, P., Polidoro, T. A., Zeni, M. y da Silveira, M. M. (2017). Evaluation of the operating conditions for the solid-state production of pectinases by *Aspergillus niger* in a bench-scale, intermittently agitated rotating drum bioreactor. *LWT - Food Science and Technology* **79** 92-101. doi:https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.01.018

Polizeli, M., Rizzatti, A., Monti, R., Terenzi, H., Jorge, J. y Amorim, D. (2005). Xylanase from fungi: properties and industrial applications. *Applied microbiology and biotechnology* **67** 577-91. doi:10.1007/s00253-005-1904-7

Pollegioni, L., Tonin, F. y Rosini, E. (2015). Lignin-degrading enzymes. *The FEBS journal* **282** (7): 1190-213. doi:10.1111/febs.13224

Postemsky, P., Bidegain, M., González Matute, R., Figlas, D. y Cubitto, M. (2017). Pilot-scale bioconversion of rice and sunflower agro-residues into medicinal mushrooms and laccase enzymes through solid-state fermentation with *Ganoderma lucidum*. *Bioresource technology* **231**. doi:10.1016/j.biortech.2017.01.064

Prasad, D., Singla, A. y Negi, S. (2015). An overview of key pretreatment processes for biological conversion of lignocellulosic biomass to bioethanol. *Biotech* **5**. doi:10.1007/s13205-015-0279-4

Prasad, K., Venkata Mohan, S., Ravella, S., Pati, B. y Sarma, P. N. (2005). Laccase production by *Pleurotus ostreatus* 1804: Optimization of submerged culture conditions by Taguchi DOE methodology. *Biochemical Engineering Journal* **24** 17-26. doi:10.1016/j.bej.2005.01.019

Prasanna, H., Ramanjaneyulu, G. y Rajasekhar Reddy, B. (2016). Optimization of cellulase production by *Penicillium* sp. *3 Biotech* **6**. doi:10.1007/s13205-016-0483-x

Preethi, P. S., Ajitha Gomathi, A., Srinivasan, R., Kumar, J. G. S. P., Murugesan , K. y Muthukailannan, G. K. (2020). Laccase: Recombinant Expression, Engineering and Its Promising Applications. *In* "Microbial Enzymes: Roles and Applications in Industries" (A. N., M. J. and M. V., eds.), pp. 63-86. Springer, Singapore.

Quaratino, D., Ciaffi, M., Federici, E. y D'annibale, A. (2008). Response surface methodology study of laccase production in Panus tigrinus liquid cultures. *Biochemical Engineering Journal* **39** (2): 236-245. doi:10.1016/j.bej.2007.09.007

Raja, S., Bagle, B. G. y More, T. A. (2013). Drumstick (*Moringa oleifera* Lamk.) improvement for semiarid and arid ecosystem: Analysis of environmental stability for yield. *Journal of Plant Breeding and Crop Science* **5** (8): 164-170. doi:10.5897/JPBCS12.029

Ramachandran, C., Peter, K. V. y Gopalakrishnan, P. K. (1980). Drumstick (Moringa oleifera): A multipurpose Indian vegetable. *Economic Botany* **34** (3): 276-283. doi:10.1007/BF02858648

Raman, K. J., Alves, C. y Gnansounou, E. (2017). A review on moringa tree and vetiver grass - Potential biorefinery feedstocks. *Bioresource technology* **249** 1044-1051. doi:10.1016/j.biortech.2017.10.094

Rashid, U., Anwar, F., Moser, B. y Knothe, G. (2008). *Moringa oleifera* oil: A possible source of biodiesel. *Bioresource technology* **99** 8175-8179.

Rastogi, M. y Shrivastava, S. (2017). Recent advances in second generation bioethanol production: An insight to pretreatment, saccharification and fermentation processes. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **80** 330-340. doi:https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.225

Ravindran, R. (2018). Agro-industrial Lignocellulosic Biomass: A Sustainable Platform for the Production of α-amylase and xylanase A. Ph. D., Technological University Dublin, Dublin.

Ravindran, V. (2013). Disponibilidad de piensos y nutrición de aves de corral en países en desarrollo. *In* "Revisión del Desarrollo Avícola" (FAO, ed.).

Raymundo, T., Palacios-Pacheco, M., Bautista-Hernández, S. y Valenzuela, R. (2015). Nuevos registros de hongos poliporoides sobre madera de *Abies religiosa* en México. *Acta Botánica Mexicana* **113** 21-34. doi:10.21829/abm113.2015.1094

Raymundo, T., Valenzuela, R., Bautista-Hernández, S., Esqueda, M., Cifuentes, J. y Pacheco, L. (2013). El género *Fuscoporia* (Hymenochaetales, Basidiomycota) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* **84** S50-S69. doi:10.7550/rmb.31604

REN-21 (2019). "Renewables 2019," Renewable Energy Policy Network For The 21st Century, Paris, France.

Robl, D., Delabona Pda, S., Mergel, C. M., Rojas, J. D., Costa Pdos, S., Pimentel, I. C., . . . Padilla, G. (2013). The capability of endophytic fungi for production of hemicellulases and related enzymes. *BMC biotechnology* **13** 94. doi:10.1186/1472-6750-13-94

Rodrigues, P. M., Vieira, A. V. y Leal, M. M. L. (2013). Stability and activity of the partially purified spray-dried protease from *Bacillus* sp. SMIA-2 and its characterization as a laundry detergent additive. *International Journal of Bioassays* **02** (03): 562-567.

Rodriguez, A., Falcón, M., Carnicero, A., Perestelo, F., Fuente, G. y Trojanowski, J. (1996). Laccase activities of *Penicillium chrysogenum* in relation to lignin degradation. *Applied microbiology and biotechnology* **45** 399-403. doi:10.1007/s002530050702

Rødsrud, G., Lersch, M. y Sjöde, A. (2012). History and future of world's most advanced biorefinery in operation. *Biomass and Bioenergy* **46** 46–59. doi:10.1016/j.biombioe.2012.03.028

Román, R., Torres-Duarte, C., Ayala, M. y Vázquez-Duhalt, R. (2010). Producción a escala piloto de lacasa de *Coriolopsis gallica*. *Revista Mexicana de Micología* **32** 5.

Roohi, R., Kuddus, M. y Saima, S. (2013). Cold-active detergent-stable extracellular α-amylase from Bacillus cereus GA6: Biochemical

characteristics and its perspectives in laundry detergent formulation. *Journal of Biochemical Technology* **4** 636-644.

Rosales, E., Rodríguez Couto, S. y Sanromán, M. A. (2007). Increased laccase production by *Trametes hirsuta* grown on ground orange peelings. *Enzyme and Microbial Technology* **40** (5): 1286-1290. doi:10.1016/j.enzmictec.2006.09.015

Roy, J. y Mukherjee, A. (2013). Applications of a high maltose forming, thermo-stableamylase from an extremely alkalophilic *Bacillus licheniformis* strain AS08E in food and laundry detergent industries. *Biochemical Engineering Journal* **77** 220-230. doi:10.1016/j.bej.2013.06.012

Roy, J., Rai, S. y Mukherjee, A. (2012). Characterization and application of a detergent-stable alkaline β-amylase from *Bacillus subtilis* strain AS-S01a. *International journal of biological macromolecules* **50** 219-29. doi:10.1016/j.ijbiomac.2011.10.026

Rubin, E. (2008). Rubin, Edward M. Genomics of cellulosic biofuels. Nature 454(7206). *Nature* **454** 841-5. doi:10.1038/nature07190

Ruelas-Leyva, J., Contreras-Andrade, I., Sarmiento Sánchez, J. I., Licea-Claveríe, A., Jiménez-Lam, S., Cristerna-Madrigal, Y. y Picos-Corrales, L. (2017). The Effectiveness of *Moringa oleifera* Seed Flour and Chitosan as Coagulant-Flocculants for Water Treatment. *CLEAN - Soil, Air, Water* **45**. doi:10.1002/clen.201600339

Ryvarden, L. (2004). "Neotropical Polypores I. Introduction, Ganodermataceae and Hymenochaetaceae," Fungiflora, Oslo.

Ryvarden, L. y Iturriaga, T. (2003). Studies in neotropical polypores 10. New polypores from Venezuela. *Mycologia* **95** (6): 1066-1077. doi:10.1080/15572536.2004.11833021

Sabarathinam, S., Jayaraman, V., Balasubramanian, M. y Swaminathan, K. (2014). Optimization of culture parameters for hyper laccase production by *Trichoderma asperellum* by Taguchi design experiment using L-18 orthogonal array. 214-225.

Sadeghifar, H., Cui, C., Sen, S. y Argyropoulos, D. (2012). Toward thermoplastic lignin polymers; thermal & polymer characteristics of kraft lignin & its derivatives. **51** 16713−16720. doi:10.1021/ie301848j |

Sadh, P., Duhan, S. y Duhan, J. (2018). Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. *Bioresources and Bioprocessing* **5**. doi:10.1186/s40643-017-0187-z

SAGARPA (2014). Norma Oficial Mexicana NOM-033-SAG/ZOO-2014. Métodos para dar muerte a los animales domésticos y silvestres. *Diario Oficial de la Federación*.

Saibabu, V., Niyonzima, F. N. y More, S. S. (2013). Isolation, Partial purification and Characterization of Keratinase from *Bacillus megaterium*. *ional Research Journal of Biological Sciences* **2** (2): 13-20.

Saini, J. K., Anurag, R. K., Arya, A., Kumbhar, B. K. y Tewari, L. (2013). Optimization of saccharification of sweet sorghum bagasse using response surface methodology. *Industrial Crops and Products* **44** 211-219. doi:10.1016/j.indcrop.2012.11.011

Saini, J. K., Saini, R. y Tewari, L. (2015). Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production:

concepts and recent developments. *3 Biotech* **5** (4): 337-353. doi:10.1007/s13205-014-0246-5

Saini, R. K., Shetty, N., Prakash, M. y Giridhar, P. (2014). Effect of dehydration methods on retention of carotenoids, tocopherols, ascorbic acid and antioxidant activity in Moringa oleifera leaves and preparation of a RTE product. *Journal of food science and technology* **51** 2176-82. doi:10.1007/s13197-014-1264-3

Saloheimo, M., Paloheimo, M., Hakola, S., Pere, J., Swanson, B., Nyyssönen, E., . . . Penttilä, M. (2002). Swollenin, a *Trichoderma reesei* protein with sequence similarity to the plant expansins, exhibits disruption activity on cellulosic materials, A fungal expansin homologue. *European journal of biochemistry / FEBS* **269** 4202-11. doi:10.1046/j.1432-1033.2002.03095.x

Sánchez-Riaño, A. M., Gutiérrez-Morales, A. I., Muñoz-Hernández, J. A. y Rivera-Barrero, C. A. (2010). Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos. *Revista Tumbaga* (5): 61-91.

Sánchez, N., Rndly, E. y Ledin, I. (2006). Effect of feeding different levels of foliage of *Moringa oleifera* to creole dairy cows on intake, digestibility, milk production and composition. *Livestock Production Science* **101**. doi:10.1016/j.livprodsci.2005.09.010

Sánchez, N. R., Ledin, S. y Ledin, I. (2006). Biomass Production and Chemical Composition of *Moringa oleifera* under Different Management Regimes in Nicaragua. *Agroforestry Systems* **66** (3): 231-242. doi:10.1007/s10457-005-8847-y

Sandhya, A., Sridevi, A., Devi, P. y Golla, N. (2015). Production and optimization of phytase by *Aspergillus niger*. *Der Pharmacia Lettre* **7** (12): 148-158.

Sarkar, N., Ghosh, S. K., Bannerjee, S. y Aikat, K. (2012). Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renewable Energy* **37** (1): 19-27. doi:10.1016/j.renene.2011.06.045

Sarrouh, B., Santos, T. M., Miyoshi, A., Dias, R. y Vasco, A. (2012). Up-To-Date Insight on Industrial Enzymes Applications and Global Market. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques* **S4** (02): 1-10. doi:10.4172/2155-9821.S4-002

Sayadi, S. y Ellouz, R. (1995). Roles of Lignin Peroxidase and Manganese Peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* in the Decolorization of Olive Mill Wastewaters. *Applied and Environmental Microbiology* **61** (3): 1098-1103. doi:10.1128/AEM.61.3.1098-1103.1995

Scherer, M. y Fischer, R. (1998). Purification and characterization of laccase II of *Aspergillus nidulans*. *Archives of Microbiology* **170** 78-84. doi:10.1007/s002030050617

Sethi, S., Datta, A., Gupta, B. y Gupta, S. (2013). Optimization of Cellulase Production from Bacteria Isolated from Soil. *ISRN Biotechnology* **2013**. doi:10.5402/2013/985685

Sharifia, M., Karimi, K. y Taherzadeh, M. J. (2008). Production of ethanol by filamentous and yeast-like forms of *Mucor indicus* from fructose, glucose, sucrose, and molasses. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* **35** (11): 1253-9. doi:10.1007/s10295-008-0422-x

Sharma, B., Rashid, U., Anwar, F. y Erhan, S. (2009). Lubricant properties of Moringa oil using thermal and tribological techniques. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* **96** 999-1008. doi:10.1007/s10973-009-0066-8

Sharma, N. K., Behera, S., Arora, R. y Kumar, S. (2016). Enhancement in xylose utilization using *Kluyveromyces marxianus* NIRE-K1 through evolutionary adaptation approach. *Bioprocess and biosystems engineering* **39** (5): 835-843. doi:10.1007/s00449-016-1563-3

Shih, M.-C., Chang, C.-M., Kang, S.-M. y Tsai, M.-L. (2011). Effect of Different Parts (Leaf, Stem and Stalk) and Seasons (Summer and Winter) on the Chemical Compositions and Antioxidant Activity of *Moringa oleifera*. *International journal of molecular sciences* **12** 6077-88. doi:10.3390/ijms12096077

Shwetha, V., More, S. y Muddapur, U. (2017). Screening, optimization and production of a novel β-cyclodextrinase by *Bacillus flexus* MSBC 2. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy* **11** 137-144.

Siddhuraju, P., Abirami, A., Nagarani, G. y Sangeethapriya, M. (2014). Antioxidant Capacity and Total Phenolic Content of Aqueous Acetone and Ethanol Extract of Edible Parts of *Moringa oleifera* and *Sesbania grandiflora*. *International Journal of Nutrition and Food Engineering* **8** (9): 1090-1097.

Sidhu, A. K., Darade, S. B., Bhavsar, P. P., Gaikwad, V. B. y Patil, S. N. (2017). Isolation, Screening and Optimization for Laccase production by *Scytalidium lignicola* pesante under submerged fermentation. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* **6** 2477-2491. doi:10.20546/ijcmas.2017.604.289

Sindhu, R., Parameswaran, B. y Pandey, A. (2016). Biological pretreatment of lignocellulosic biomass - An overview. *Bioresource technology* **199**. doi:10.1016/j.biortech.2015.08.030

Singh, D., Zeng, J. y Chen, S. (2011). Increasing manganese peroxidase productivity of Phanerochaete chrysosporium by optimizing carbon sources and supplementing small molecules. *Letters in applied microbiology* **53** 120-3. doi:10.1111/j.1472-765X.2011.03070.x

Singh, G., Dwivedi, S. K. y Mishra, J. (2020). Role of Fungal Enzymes in the Removal of Azo Dyes. *In* "Microbial Enzymes: Roles and Applications in Industries" (A. N., M. J. and M. V., eds.), pp. 231-257. Springer, Singapore.

Singh, R., Shukla, A., Tiwari, S. y Srivastava, M. (2014). A review on delignification of lignocellulosic biomass for enhancement of ethanol production potential. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **32** 713-728. doi:10.1016/j.rser.2014.01.051

Sinha, R. y Khare, S. (2012). Isolation of a halophilic *Virgibacillus* sp. EMB13: Characterization of its protease for detergent application. *Indian Journal of Biotechnology* **11** 416-426.

Sinha, S. y Nigam, V. (2016). Production and characterization of L-glutaminase by *Bacillus* sp. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* **7** (4): 1620-1626. doi:10.13040/IJPSR.0975-8232.7(4).1620-26

Sivakumar, T., Ravikumar, M., Prakash, M. y Shanmugaraju, V. (2013). Production of extracelluar invertase from *Saccharomyces cerevisiae* strain isolated from grapes. *International Journal of Current Research and Academic Review* **1** (2): 72-83.

Sivers, M. y Zacchi, G. (1995). A techno-economical comparison of three processes for the production of ethanol from pine. *Bioresource technology* **51** 43-52. doi:10.1016/0960-8524(94)00094-H

Skory, C., Freer, S. y Bothast, R. (1997). Screening for ethanol-producing filamentous fungi. *Biotechnology letters* **19** 203-206. doi:10.1023/A:1018337003433

Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D. y Crocker, D. (2008). Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. Laboratory Analytical Procedure (LAP). *NREL Laboratory Analytical Procedures for Standard Biomass Analysis*(NREL/TP-510-42618): 18.

Sluiter, J., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, A. y Templeton, D. (2010). Compositional Analysis of Lignocellulosic Feedstocks. 1. Review and Description of Methods. *Journal of agricultural and food chemistry* **58**. doi:10.1021/jf1008023

Sondhi, S. y Saini, K. (2019). Response surface based optimization of laccase production from *Bacillus* sp. MSK-01 using fruit juice waste as an effective substrate. *Heliyon* **5** e01718. doi:10.1016/j.heliyon.2019.e01718

Songulashvili, G., Elisashvili, V., Wasser, S., Nevo, E. y Hadar, Y. (2007). Basidiomycetes Laccase and Manganese Peroxidase Activity in Submerged Fermentation of Food Industry Wastes. *Enzyme and Microbial Technology* **41** 57-61. doi:10.1016/j.enzmictec.2006.11.024

Soto-León, S., Zazueta-Patrón, I. E., Piña-Valdez, P., Nieves-Soto, M., Reyes-Moreno, C. y Contreras-Andrade, I. (2014). Extracción de lípidos de *Tetraselmis suecica*: proceso asistido por ultrasonido y solventes. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* **13** 723-737.

Souza, P., Maia, N., Guimarães, L. H., Resende, M. y Cardoso, P. (2015). Optimization of culture conditions for tannase production by Aspergillus sp. gm4 in solid state fermentation. *Acta Scientiarum - Biological Sciences* **37** 23-30. doi:10.4025/actascibiolsci.v37i1.22731

Sriariyanun, M., Tantayotai, P., Yasurin, P., Pornwongthong, P. y Cheenkachorn, K. (2016). Production, purification and characterization of an ionic liquid tolerant cellulase from *Bacillus* sp. Isolated from rice paddy field soil. *Electronic Journal of Biotechnology* **19**. doi:10.1016/j.ejbt.2015.11.002

Sridevi, A., Golla, N., Sandhya, A. y Devi, P. S. (2015). Enhanced production of *A. niger* cellulase with culture based strategies. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* **6** 1042-1049.

Stajić, M., Persky, L., Friesem, D., Hadar, Y., Wasser, S. P., Nevo, E. y Vukojević, J. (2006). Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected *Pleurotus* species. *Enzyme and Microbial Technology* **38** (1-2): 65-73. doi:10.1016/j.enzmictec.2005.03.026

Stevens, C. G., Ugese, F., Otitoju, G. y Baiyeri, P. (2016). Proximate and anti-nutritional composition of leaves and seeds of *Moringa oleifera* in Nigeria: a comparative study. *Agro-Science* **14** 9. doi:10.4314/as.v14i2.2

Stutzenberger, F. J. (1972). Cellulolytic activity of *Thermomonospora curvata*, nutritional requirments for cellulase production. *Applied Microbiology,* (July): 77-82.

Su, B. y Chen, X. (2020). Current Status and Potential of *Moringa oleifera* Leaf as an Alternative Protein Source for Animal Feeds. *Frontiers in Veterinary Science* **7** (53). doi:10.3389/fvets.2020.00053

Sukumaran, R. (2009). Bioethanol from Lignocellulosic Biomass Part II Production of Cellulases and Hemicellulases. *In* "Handbook of plant-based biofuels" (A. Pande, ed.), pp. 141-157. CRC Press-Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL.

Sukumaran, R., Singhania, R. y Pandey, A. (2005). Microbial cellulases: Production, applications and challenges. *Journal of Scientific & Industrial Research* **64** 832-844.

Sun, Y. y Cheng, J. (2002). Hydrolysis of Lignocellulosic Materials for Ethanol Production: A Review. *Bioresource technology* **83** 1-11. doi:10.1016/S0960-8524(01)00212-7

Suriyachai, N., Weerasaia, K., Laosiripojana, N., Champreda, V. y Unrean, P. (2013). Optimized simultaneous saccharification and co-fermentation of rice straw for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* and *Scheffersomyces stipitis* co-culture using design of experiments. *Bioresource technology* **142** 171-178. doi:https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.05.003

Taddia, A., Boggione, M. y Tubio, G. (2018). Screening of different agroindustrial by-products for industrial enzymes production by fermentation processes. *International Journal of Food Science & Technology*. doi:10.1111/ijfs.13915

Taherzadeh, M. y Karimi, K. (2008). Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. *International journal of molecular sciences* **9** 1621-51. doi:10.3390/ijms9091621

Taherzadeh, M. J., Teichert, O., Lennartsson, P. R. y Nordholman, H. (2013). Bioethanol Production Processes. *In* "Biofuels Production" (Vikash Babu, A. Thapliyal and G. K. Patel, eds.), pp. 211-253.

TAPPI (1997). T 204 cm-97. Solvent extractives of wood and pulp. pp. 12.

Teixeira, E. M., Carvalho, M. R., Neves, V. A., Silva, M. A. y Arantes-Pereira, L. (2014). Chemical characteristics and fractionation of proteins from *Moringa oleifera* Lam. leaves. *Food Chem* **147** 51-4. doi:10.1016/j.foodchem.2013.09.135

Thakur, M., Lincoln, L., Niyonzima, F. y More, S. (2014). Isolation, purification and characterization of fungal extracellular L-asparaginase from *Mucor hiemalis*. *J. Biocatal. Biotransform.* **2** 2-9.

Thiribhuvanamala, G., Gopal, K., Parthasarathy, S., Srinivasan, M. y Velappan, P. (2017). Extracellular secretion of lignocellulolytic enzymes by diverse white rot basidiomycetes fungi. *Annals of Phytomedicine* **6** 20-29. doi:10.21276/ap.2017.6.1.4

Tien, M. y Kirk, T. K. (1984). Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, characterization, and catalytic properties of a unique H_2O_2-requiring oxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **81** (April): 5.

Tinoco, R., Pickard, M. A. y Vazquez-Duhalt, R. (2001). Kinetic differences of laccases from six *Pleurotus ostreatus* strains. *Letters in applied microbiology* **32** 331-5. doi:10.1046/j.1472-765X.2001.00913.x

Tisma, M., Znidarsic-Plazl, P., Vasic-Racki, D. y Zelic, B. (2012). Optimization of laccase production by *Trametes versicolor* cultivated on industrial waste. *Applied biochemistry and biotechnology* **166** (1): 36-46. doi:10.1007/s12010-011-9401-1

Torres-Torres, M. G., Ryvarde, L. y Guzmán-Dávalos, L. (2015). *Ganoderma* subgenus *Ganoderma* in Mexico. *Revista Mexicana de Micología* **41** 27-45.

Treichel, H. (2020). Preface. *In* "Fungal Biotechnology and Bioengineering" (A. E.-L. Hesham, R. S. Upadhyay, G. D. Sharma, C. Manoharachary and V. K. Gupta, eds.). Springer, Switzerland.

Treichel, H., Fongaro, G., Scapini, T., Frumi Camargo, A., Spitza Stefanski, F. y Venturin, B. (2020). "Biotechnology Application of Pretreated Biomass," Springer, Switzerland.

Tsaknis, J. o. I., Lalas, S., Gergis, V. y Spiliotis, V. (1998). A total characterisation of *Moringa oleifera* Malawi seed oil. *Riv. Ital. Sost. Gras.* **75** 21-27.

Tsaknis, J. o. I., Spiliotis, V., Lalas, S., Gergis, V. y Dourtoglou, V. (1999). Quality changes of *Moringa oleifera* , variety Mbololo of Kenya, seed oil during frying. *Grasas y Aceites* **50**. doi:10.3989/gya.1999.v50.i1.634

Usha, K., Praveen, K. y Rajasekhar Reddy, B. (2014). Enhanced Production of Ligninolytic Enzymes by a Mushroom *Stereum ostrea*. *Biotechnology Research International* **2014** (ID 815495): 1-9. doi:10.1155/2014/815495

Valenzuela-Garza, R. (2000). "Las familias Polyporaceae *sensu stricto* y Albatrellaceae en México." Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, México, D.F.

Valenzuela, R., Huerta, C. y Fernández-Nava, R. (2002). Los poliporáceos de Mexico V Algunas especies del Norte del estado de Queretaro. *Polibotánica* **14** 85-122.

Valenzuela, R., Huerta, C. y Fernández-Nava, R. (2002). Los Poliporáceos de México V. Algunas Especies del Norte del Estado de Querétaro. *Polibotánica* **14** (14): 85-122.

Valenzuela, R., I. Alvarez, V. y Raymundo, T. (2016). Los hongos poliporoides de la huasteca potosina, San Luis Potosí, México. *Polibotánica*(41). doi:10.18387/polibotanica.41.2

Vardakou, M., Katapodis, P., Topakas, E., Kekos, D., Macris, B. J. y Christakopoulos, P. (2004). Synergy between enzymes involved in the degradation of insoluble wheat flour arabinoxylan. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **5** (1): 107-112. doi:10.1016/s1466-8564(03)00044-4

Vázquez, M. E. L., Castro, O. L. D., Maldonado, M. I. E., Luna, S. S. y Castro, M. C. (2019). Moringa straw as cellulase production inducer and cellulolytic fungi source. *Revista Argentina de microbiologia*. doi:10.1016/j.ram.2019.02.005

Veldkamp, T., van, D., Huis, A., Lakemond, C. M. M., Ottevanger, E., Bosch, G. y van, B. (2012). Insects as a sustainable feed ingredient in pig and poultry diets: a feasibility study. *Wageningen UR Livestock Research*40.

Viikari, L., Vehmaanperä, J. y Koivula, A. (2012). Lignocellulosic ethanol: From science to industry. *Biomass and Bioenergy* **46** 13-24. doi:10.1016/j.biombioe.2012.05.008

Vijaya, N. y Jatin, P. (2017). Study of Production of Lignin Degrading Enzymes by Fungal Cultures and their Ability to Decolorize Selected Dyes. *Iconic Research and Engineering Journals* **1** (2): 14-26.

Villena, G. K., Kitazono, A. A. y Hernández-Macedo, M. L. (2020). Bioengineering Fungi and Yeast for the Production of Enzymes, Metabolites, and Value-Added Compounds. *In* "Fungal Biotechnology and Bioengineering" (A. E.-L. Hesham, R. S. Upadhyay, G. D. Sharma, C. Manoharachary and V. K. Gupta, eds.). Springer, Switzerland.

Viswanath, B., Rajesh, B., Janardhan, A., Kumar, A. P. y Narasimha, G. (2014). Fungal laccases and their applications in bioremediation. *Enzyme Research* **2014** 163242-163242. doi:10.1155/2014/163242

Wagner, T. y Fischer, M. (2002). Proceedings Towards a Natural Classification of the Worldwide Taxa *Phellinus* s.l. and *Inonotus* s.l., and Phylogenetic Relationships of Allied Genera. *Mycologia* **94** 998-1016. doi:10.2307/3761866

Waleed, M., Faiza, A. A. y Nizar, I. (2015). Production optimization of pullulanase enzyme produced by *Bacillus cereus* isolated from Syrian sources. *International Food Research Journal* **22** 1824-1830.

Wan, C. y Li, Y. (2012). Fungal pretreatment of lignocellulosic biomass. *Biotechnology advances* **30** 1447-57. doi:10.1016/j.biotechadv.2012.03.003

Wang, H., Zhong, S., Ma, H., Zhang, J. y Qi, W. (2012). Screening and characterization of a novel alkaline lipase from *Acinetobacter calcoaceticus* 1-7 isolated from Bohai Bay in China for detergent formulation. *Brazilian Journal of Microbiology* **43** 148-56. doi:10.1590/S1517-838220120001000016

Wang, X. C., Xi, R. J., Li, Y., Wang, D. M. y Yao, Y. J. (2012). The species identity of the widely cultivated *Ganoderma*, '*G. lucidum*' (Ling-zhi), in China. *PLoS One* **7**.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S. y Taylor, T. W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In* "PCR protocol: a guide to methods and application" (M. A. Innis, Gelfald DH, Sninsky JJ and W. T. J., eds.), pp. 315-322. Academic Press, Inc., New York, USA.

Wirawan, F., Cheng, C.-L., Kao, W.-C., Lee, D.-J. y Chang, J.-S. (2012). Cellulosic ethanol production performance with SSF and SHF processes using immobilized *Zymomonas mobilis*. *Applied Energy* **100** 19–26. doi:10.1016/j.apenergy.2012.04.032

Xiao, A., Huang, Y., Ni, H., Cai, H. y Yang, Q. (2015). Statistical optimization for tannase production by *Aspergillus tubingensis* in solid-state fermentation using tea stalks. *Electronic Journal of Biotechnology* **162**. doi:10.1016/j.ejbt.2015.02.001

Xiao, Z., Storms, R. y Tsang, A. (2004). Microplate-based assay to measure total cellulase activity. *Biotechnology and bioengineering* **88** 832-7. doi:10.1002/bit.20286

Xie, G. y Peng, L. (2011). Genetic engineering of energy crops: a strategy for biofuel production in China. *Journal of integrative plant biology* **53** (2): 143-50. doi:10.1111/j.1744-7909.2010.01022.x

Xu, G.-C., Ding, J.-C., Han, R.-Z., Dong, J.-J. y Ni, Y. (2015). Enhancing cellulose accessibility of corn stover by deep eutectic solvent pretreatment for butanol fermentation. *Bioresource technology* **203**. doi:10.1016/j.biortech.2015.11.002

Yanase, S., Hasunuma, T., Yamada, R., Tanaka, T., Ogino, C., Fukuda, H. y Kondo, A. (2010). Direct ethanol production from cellulosic materials at high temperature using the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* displaying cellulolytic enzymes. *Applied microbiology and biotechnology* **88** 381-388. doi:10.1007/s00253-010-2784-z

Yang, B. y Wyman, C. (2008). Pretreatment: The key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. *Ltd | Biofuels Bioprod. Bioref* **2** 26-4026. doi:10.1002/bbb.49

Yáñez-S, M., Rojas, J., Castro, J., Ragauskas, A., Baeza, J. y Freer, J. (2013). Fuel ethanol production from *Eucalyptus globulus* wood by autocatalized organosolv pretreatment ethanol-water and SSF. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **88** 39-48. doi:10.1002/jctb.3895

Yasmeen, Q., Asgher, M., Sheikh, M. A. y Nawaz, H. (2013). Optimization of Ligninolytic Enzymes Production through Response Surface Methodology. *BioResources* **8** (1): 26.

Yu, G., Yano, S., Inoue, H., Inoue, S., Endo, T. y Sawayama, S. (2009). Pretreatment of Rice Straw by a Hot-Compressed Water Process for Enzymatic Hydrolysis. *Applied biochemistry and biotechnology* **160** 539-51. doi:10.1007/s12010-008-8420-z

Yusuf, A. y Inambao, F. (2019). Bioethanol Production Techniques from Lignocellulosic Biomass as Alternative Fuel: A Review. **10** 34-71.

Zerva, A., Savvides, A. L., Katsifas, E. A., Karagouni, A. D. y Hatzinikolaou, D. G. (2014). Evaluation of *Paecilomyces variotii* potential in bioethanol production from lignocellulose through consolidated bioprocessing. *Bioresource technology* **162** 294-9. doi:10.1016/j.biortech.2014.03.137

Zervakis, G., Venturella, G., Fryssouli, V., Inglese, P., Polemis, E. y Gargano, M. (2018). *Pleurotus opuntiae* revisited – An insight to the phylogeny of dimitic *Pleurotus* species with emphasis on the *P. djamor* complex. *Fungal Biology* **123** 188-199. doi:10.1016/j.funbio.2018.12.005

Zhang, B. B., Guan, Y.-Y., Hu, P.-F., Chen, L., Xu, G.-R., Liu, L. y Cheung, P. (2019). Production of bioactive metabolites by submerged fermentation of the medicinal mushroom *Antrodia cinnamomea*: recent advances and future development. *Critical reviews in biotechnology* **39** 1-14. doi:10.1080/07388551.2019.1577798

Zhang, T., Si, B., Tu, Y., Cui, K., Zhou, C. y Diao, Q. (2019). Effect of including different levels of moringa (*Moringa oleifera*) leaf meal in the diet of finishing pigs: Performance, pork quality, fatty acid composition, and amino acid profile. *Czech Journal of Animal Science* **64** 141-149. doi:10.17221/204/2018-CJAS

Zheng, Y., Lin, H. M. y Tsao, G. T. (1998). Pretreatment for Cellulose Hydrolysis by Carbon Dioxide Explosion. *Biotechnology progress* **14** 890-6. doi:10.1021/bp980087g

Abreviaturas

ABTS	Ácido 2,2'–azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANDEVA	Análisis de varianza
°C	grado(s) centígrado(s)
CG	Cromatografía de gases
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	Cloruro de calcio dihidratado
CBP	Bioproceso consolidado [por sus siglas en inglés: Consolidated Bioprocess]
CO_2	Dióxido de carbono
CuSO4·5H2O	Sulfato de cobre pentahidratado
DNS	Ácido 3,5 dinitrosalicílico
$Fe_2(SO_4)_3$	Sulfato férrico
FES	Fermentación en estado sólido
g	gramo(s)
h	hora(s)
ha	hectárea(s)
H_2O_2	Peróxido de hidrógeno
H_2SO_4	Ácido sulfúrico
HCl	Ácido clorhídrico
HHMO	Harina hidrolizada de *M. oleifera*
HMHF	Harina de hoja de *M. oleifera* hidrolizada y fermentada
HMNT	Harina de hoja de *M. oleifera* no tratada
kg	kilogramo(s)
KH_2PO_4	Fosfato monobásico de potasio
L	litro(s)
mg	miligramo(s)
MgSO4·7H2O	Sulfato de magnesio heptahidratado
min	minuto(s)
mL	mililitro(s)
mm	milímetro(s)

mM	Milimolar
$MnSO_4.H_2O$	Sulfato de manganeso monohidratado
MO	*Moringa oleifera*
NaOH	Hidróxido de sodio
$(NH_4)\ SO_4$	Sulfato de amonio
nm	nanómetro(s)
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
rpm	revoluciones por minuto
SHF	Hidrólisis y fermentación separadas (Por sus siglas en inglés: Separate Hydrolysis and Fermentation)
SMOD	Semilla de *M. oleifera* desgrasada
SMOD	Harina de semilla de *M. oleifera* desgrasada
SSCF	Sacarificación y cofermentación simultáneas (Por sus siglas en inglés: Simultaneous Saccharification and Co-fermentation)
SSF	Sacarificación y fermentación simultáneas (Por sus siglas en inglés: Simultaneous Saccharification and Fermentation)
TEST	Tratamiento testigo o control
µL	microlitro(s)

Anexos

Anexo 1. Artículo científico publicado.

Pérez Ángel, R.; Pérez-Tamayo, N. M.; Castro-Martínez, C. y Contreras-Andrade, Ignacio. (2020). Rendimientos y composición química de biomasa, semilla y aceite de ecotipos de *Moringa oleifera* Lamarck introducidos en Sinaloa, México. *Agro productividad* 13 (7): 21-28. doi:10.32854/agrop.vi.1643.

Anexo 2. Artículo científico aprobado (en prensa).

Pérez-Ángel, R.; Portillo-Loera, J. J., Castro-Tamayo, C. B.; Soto-Beltrán, J. M.; Urías-Ramos, K.A.; Contreras-Andrade, I. (2021). Uso potencial de subproductos biorrefinados de *Moringa oleifera* en la alimentación de codornices japonesas. *Agricultura, Sociedad y Desarrollo* 18 (2). x