



## Evaluation of radial growth on amaranth forage from filamentous fungi isolated from coffee leaves

## Evaluación del crecimiento radial sobre forraje de amaranto de hongos filamentosos aislados de hojas de café

María Fernanda Méndez-Arango<sup>1</sup>, Daniel López-Sosa<sup>1</sup>, Oscar Núñez-Gaona<sup>1,2</sup>,  
María de Jesús García-Gómez<sup>1,2,3,\*</sup>

<sup>1</sup>División de estudios de postgrado, <sup>2</sup>Cuerpo Académico Biotecnología sustentable. UNPA-CA-15, <sup>3</sup>Red Temática 12.3 PDA México (CONACyT), Universidad del Papaloapan Campus Tuxtepec, Circuito Central No. 200, Parque Industrial, 68301 San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, Mexico.

\*Corresponding author

E-mail address: [bf07\\_06@hotmail.com](mailto:bf07_06@hotmail.com) (M.J. García-Gómez)

Article history:

Received: 14 December 2018 / Received in revised form: 20 March 2019 /  
Accepted: 22 March 2019 / Published online: 1 April 2019.

<https://doi.org/10.29267/mxjb.2019.4.2.47>

### ABSTRACT

Amaranth forage can be used to produce molecules with biotechnological application due to its chemical composition. Therefore, the use of this type of wastes can minimize environmental problems. Ability of some filamentous fungi genera to produce lignocellulolytic enzymes for depolymerization of plant biomass is well documented. In this work, a proximate composition of the amaranth forage flour (AFF) prepared with amaranth stems and leaves was determined. AFF was used as a substrate to evaluate the radial growth of fungal strains isolated from coffee leaves. The strains were molecularly characterized. Proximate composition values of AFF were (in %); 10.41, 0.87, 12.46, 7.26, 68.89 and 34.35 of protein, ether extract, ash, moisture, total carbohydrates and crude fiber, respectively. The phylogenetic analysis showed 2 main genera: *Aspergillus* (*oryzae* and *flavus*) and *Penicillium*. *A. oryzae* showed the highest radial growth in potato dextrose agar (control) and in AFF agar. The rest of the strains showed the lowest growth in both

media. These results suggest that *A. oryzae*, isolated from coffee leaves, could be useful for the production of lignocellulolytic enzymes and that AFF could be used as a substrate for microbial growth.

**Keywords:** filamentous fungi, molecular characterization, amaranth forage, proximate composition, radial growth.

## RESUMEN

El forraje de amaranto puede utilizarse para producir moléculas con aplicaciones biotecnológicas debido a su composición química; esto podría brindar un valor agregado a este residuo, además de reducir la contaminación ambiental. La capacidad de algunos géneros de hongos filamentosos para producir enzimas lignocelulolíticas para la despolimerización de la biomasa vegetal está bien documentada. En este trabajo, se determinó la composición proximal de la harina de forraje de amaranto (HFA) hecha de tallos y hojas; se utilizó como sustrato para evaluar el crecimiento radial de cepas de hongos aisladas de las hojas de café. Las cepas fueron caracterizadas molecularmente. Los valores de la composición proximal de la HAF fueron: 10.41, 0.87, 12.46, 7.26, 68.89 y 34.35% de proteína, extracto de éter, ceniza, humedad, carbohidratos totales y fibra cruda, respectivamente. El análisis filogenético mostró 2 géneros principales: *Aspergillus* (*oryzae* y *flavus*) y *Penicillium*. *A. oryzae* mostró el mayor crecimiento radial en agar papa dextrosa (control) y en agar HFA. El resto de las cepas mostraron el menor crecimiento en ambos medios. Estos resultados sugieren que *A. oryzae*, aislada de las hojas de café, podría ser útil para la producción de enzimas lignocelulolíticas y que se podría usar HFA como sustrato para el crecimiento microbiano.

**Palabras clave:** hongos filamentosos, caracterización molecular, forraje de amaranto, análisis químico proximal, crecimiento radial.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los hongos filamentosos han sido utilizados durante años con diversos propósitos, desde fermentaciones antiguas hasta actuales procesos industriales como la producción de enzimas, vitaminas, polisacáridos, pigmentos, lípidos entre otros (Vásquez, 2013). En este sentido, existe un considerable esfuerzo de investigación sobre la biodiversidad, la ecología y la importancia económica de los hongos tropicales. Esto incluye estudios sistemáticos y análisis de aislados de hongos productores de compuestos de importancia comercial; debido a que estos microorganismos crecen formando redes tridimensionales capaces de penetrar la matriz porosa de los sustratos y se destacan por secretar enzimas con diversas actividades. Los géneros *Aspergillus*, *Claviceps*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Sclerotium* entre otros son algunos de los más estudiados. Una gran variedad de hongos

habita en las plantas, son conocidos como endofíticos. Los hongos filamentosos endófitos representan un importante recurso genético para la biotecnología. Actualmente hay un interés en la bioprospección de estos microorganismos debido a su potencial de producción de metabolitos secundarios para aplicaciones en la industria farmacéutica y alimentaria (Sette *et al.*, 2006). Muchos de estos hongos son capaces de degradar material lignocelulósico secretando enzimas lignocelulolíticas (Mora, 2015). La identificación de hongos aislados de plantas se puede realizar utilizando métodos genéticos con alta sensibilidad y especificidad; permitiendo clasificar a las cepas microbianas en niveles taxonómicos jerárquicos. La información contenida en los genes ribosomales 18S y 28S; el espaciador transcrito interno (ITS) y espaciador intergénico (IGS) ha sido ampliamente utilizada en estudios de caracterización molecular que involucran cepas fúngicas (Sette *et al.*, 2006). Sin embargo, las regiones ITS1 e ITS2 también han sido reportadas para la identificación molecular de hongos (Wang *et al.*, 2015).

Por otro lado, los residuos lignocelulósicos están adquiriendo cada vez mayor importancia debido a su uso en procesos fermentativos para producir sustancias con actividad biológica que tienen valor por su aplicación en la industria. Es por ello, que estos residuos están siendo ampliamente estudiados, debido a que constituyen fuentes renovables y son ricos en carbohidratos y compuestos fenólicos (Gómez *et al.*, 2001). El uso de residuos agroindustriales permite impulsar el abasto alimentario, la generación de ingresos adicionales a los productores y el cuidado del medio ambiente, al evitar la acumulación o quema de estos residuos en las comunidades donde se producen (Coello-Loor *et al.*, 2017), algunas de ellas dentro de la mancha urbana. Tal es el caso de la planta de amaranto, cuyas hojas y tallos poseen alto contenido de calcio, hierro, magnesio, fósforo, vitaminas A y C, hemicelulosa y hasta 24.75% de proteínas (Gómez-Gómez *et al.*, 2011). Debido a lo anterior, este residuo agrícola puede utilizarse como especie forrajera para ganado o como sustrato para el crecimiento de microorganismos, particularmente hongos filamentosos (García-Pereyra *et al.*, 2009). Sin embargo, debido a su baja digestibilidad no puede ser aprovechada en forma directa para la alimentación humana y animal.

Por otro lado, el crecimiento de hongos sobre este tipo de residuos representa una alternativa de bioconversión para el desarrollo de nuevas áreas de producción, con un impacto benéfico en el crecimiento económico debido a que favorece la reutilización de desechos ricos en lignocelulosa, material que representa cerca del 40% de la biomasa producida por la fotosíntesis. La capacidad de los hongos para adaptar rápidamente su metabolismo a diversas fuentes de carbono y nitrógeno, depende de la habilidad del hongo para la formación de micelio y que está directamente relacionada con su capacidad enzimática para aprovechar diferentes tipos de sustrato. La velocidad de crecimiento radial (VCR) es un método rápido que permite evaluar el efecto de diferentes sustratos sobre la capacidad enzimática, el crecimiento y el potencial uso de estos hongos (Coello-Loor *et al.*, 2017). Algunas investigaciones realizadas en este sentido incluyen a Torres-García *et al.* (2011) quienes evaluaron la VCR de hongos filamentosos, aislados de una industria productora de papel, en di (2-etilhexil) ftalato y que podrían ser

utilizados en procesos de biorremediación de ríos y suelos altamente contaminados con ftalatos y otros compuestos fenólicos. Por otro lado, Villa & Espín (2010) determinaron el crecimiento del hongo *Phanerochaete chrysosporium* en residuos lignocelulósicos (aserrín y tallos de morera) para determinar la actividad ligninoperoxidasa.

Considerando lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar la velocidad de crecimiento radial de hongos filamentosos aislados de hojas de café sobre harina de forraje de amaranto (HFA).

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1 Aislamiento y obtención de biomasa**

Los hongos fueron aislados de hojas sanas de café recolectadas en la localidad de Rancho Grande, Valle Nacional, Oaxaca, México. Estas se empacaron y almacenaron en frascos de plástico a 4 °C. Trozos de hojas (25 mm<sup>2</sup>) fueron sembrados en placas de agar dextrosa Sabouraud (SDA) e incubadas a 25 °C durante 5 días. Se realizaron resiembras hasta la obtención de aislados puros (Gandarilla-Pacheco *et al.*, 2013). Para la obtención de biomasa de las cepas puras se realizaron cultivos en caldo dextrosa Sabouraud (SDB) enriquecido al 0.05 % con extracto de levadura los cuales fueron incubados a 25 °C y 180 rpm durante 7 días.

### **2.2 Obtención de material genético**

La biomasa, previamente liofilizada, se utilizó para la extracción de ADN, empleando un kit comercial (Ultra Clean ® Microbial DNA Isolation Kit, Mo Bio Laboratories, Inc.) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

### **2.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Se realizó una amplificación de las regiones ITS1 e ITS2 (Wang *et al.*, 2015) el amplicon obtenido tuvo un promedio de 900 pb. Los oligos empleados fueron: ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') / ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990).

### **2.4 Secuenciación y análisis**

La secuenciación se realizó mediante dos técnicas para confirmar el resultado; se utilizó el MinION y el Miseq 2x250 de illumina. A las lecturas obtenidas se les realizó el control de calidad (Qc), y solo las que tuvieron un Qc > 15 fueron utilizadas para la identificación de los hongos.

## 2.5 Identificación bioinformática

Las secuencias obtenidas fueron comparadas con secuencias control de hongos del género *Aspergillus* y *Penicillium* a través de un árbol filogenético empleando el software bioinformático Mega X (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) utilizando el algoritmo Neighbor-Joining (Gallou *et al.*, 2015).

## 2.6 Recolección del forraje de amaranto

El forraje de amaranto (FA) se recolectó en parcelas ubicadas en el municipio de Santa Apolonia Teacalco (19°13'48.7N°98°18'12.8"W) en el estado de Tlaxcala, México. Las hojas y el tallo de la planta se colectaron después del proceso del trillado y se secaron al sol. Posteriormente el material se molió en un molino agrícola No. 20 (Marca Swissmex turbo), se tamizó con una malla del No.40 y la harina de forraje de amaranto (HFA) se depositó en bolsas negras de plástico.

## 2.7 Análisis químico proximal de la harina de forraje de amaranto

El análisis químico proximal, se realizó según la metodología de la NORMA OFICIAL MEXICANA: la humedad por el método de gasa o arena (NMX-116-SSA1-1994); las cenizas por calcinación lenta, incrementando la temperatura hasta 550°C, donde se mantuvo por 6 horas (NMX-F-607-NORMEX-2013); la proteína cruda por el método de Kjeldahl usando el factor de conversión de 6.25 (NOM-155-SCFI-2012); el extracto etéreo por el método de Soxhlet con éter de petróleo (NOM-086-SSAI-1994); la determinación de fibra cruda siguiendo la metodología NOM-F-90-S-1978 y los carbohidratos totales se determinaron por diferencia.

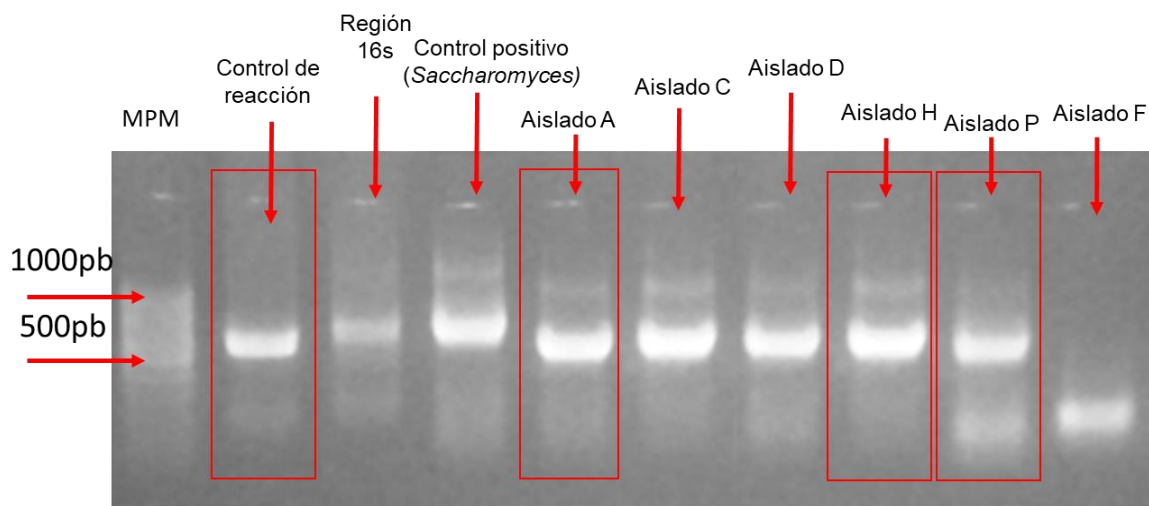
## 2.8 Evaluación de crecimiento radial

La determinación de la velocidad de crecimiento radial se realizó con las cepas fúngicas, caracterizadas molecularmente como *Aspergillus* y *Penicillium*, aisladas de hojas de café. Se utilizaron placas de agar HFA al 2% (AHFA; medio de cultivo desarrollado en este trabajo) y agar papa dextrosa (APD) (BD Difco™, EUA), utilizado como control. En condiciones estériles se pusieron en el centro de la caja círculos de papel filtro (5 mm de diámetro) con una concentración de  $1.13 \times 10^6$  esporas/mL, las cajas se incubaron a  $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  por 8 días. La velocidad de crecimiento radial (VCR) fue evaluada mediante la utilización de la ecuación lineal. Donde la VCR corresponde a la pendiente de la fase exponencial de la curva de crecimiento de un organismo (Torres-García *et al.*, 2011).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

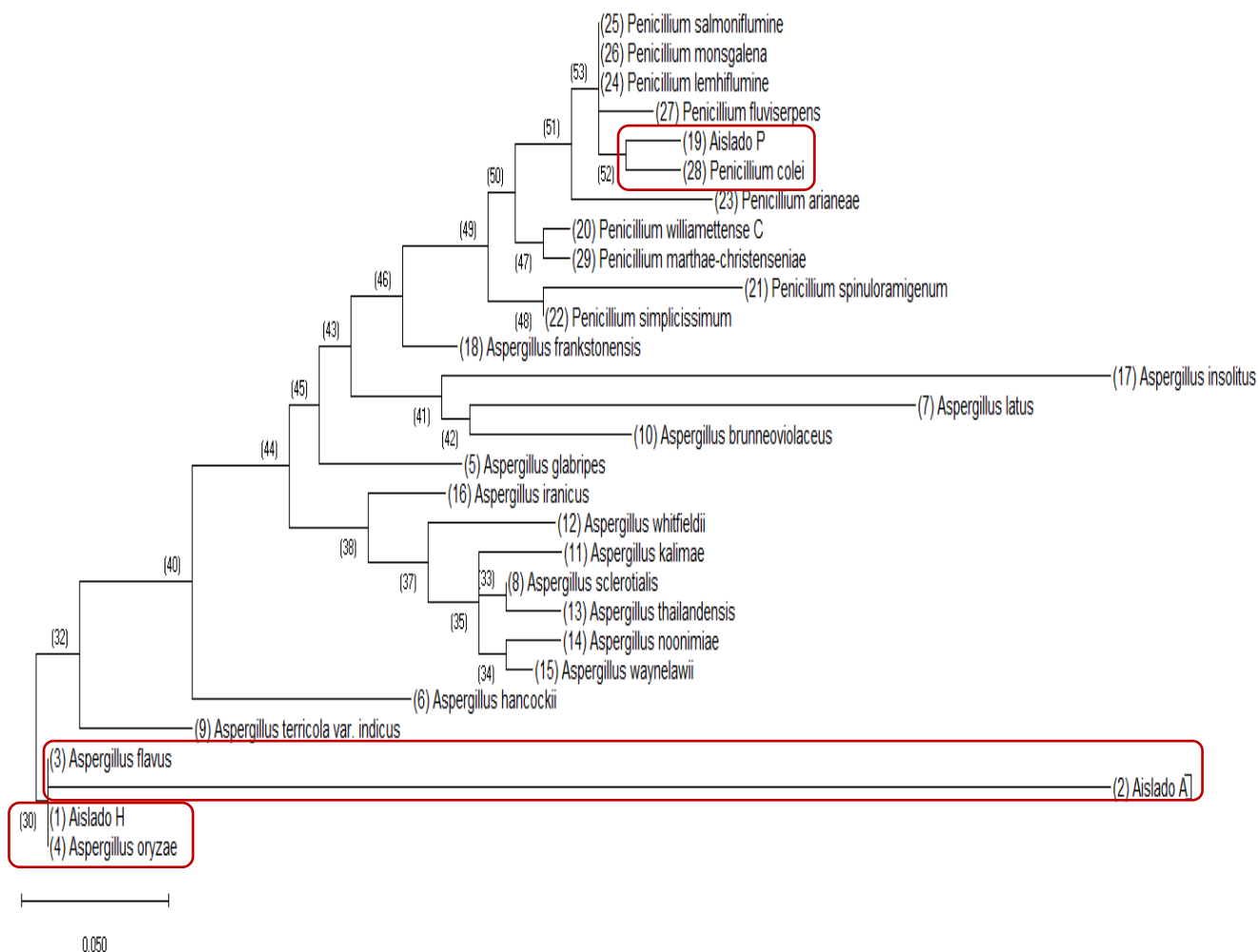
En la Fig. 1 se observan los amplicones de las regiones ITS de los aislados A, C, D, H, P y F; además el control positivo (*Saccharomyces*).



**Fig. 1** Amplicones de la región ITS de los hongos aislados de hojas de café.

#### 3.2 Identificación bioinformática

Las secuencias de los aislados con un valor de Qc <15 (cepas A, H y P) fueron analizadas mediante una herramienta básica de búsqueda de alineación local (BLAST; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>); obteniéndose altos porcentajes de similitud con los géneros *Aspergillus* (cepas A y H) y *Penicillium* (cepa P). El análisis filogenético determinó que los aislados A y H están relacionados evolutivamente con las especies *A. flavus* y *A. oryzae*; sin embargo, el asilado A se encontró más alejado a estas especies que el asilado H. Por su parte, el aislado P, correspondiente al género *Penicillium*, se encontró relacionado con la especie *Penicillium coleii* (Fig. 2).



**Fig. 2.** Árbol filogenético basado en secuencias de la región ITS del ADN genómico de hongos aislados de hojas de café. Generando mediante el software bioinformático MEGA X.

### 3.3 Análisis químico proximal

En la Tabla 1 se muestra la composición química de la harina de forraje de amaranto de la especie *Amaranthus hypochondriacus*.

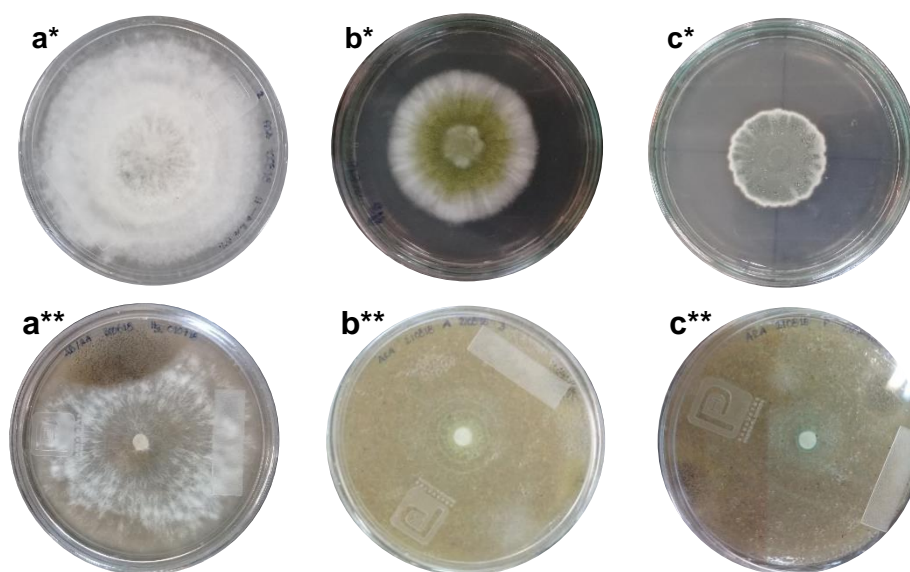
**Tabla 1.** Análisis químico proximal de la harina de forraje de amaranto (tallos y hojas) obtenida después de la cosecha del grano.

% Proteína	% Humedad	% Extracto etéreo	% Cenizas	% Carbohidratos totales	% Fibra cruda
<b>10.41</b> <b>(0.09)</b>	7.26 (0.05)	0.97 (0.01)	12.46 (0.00)	68.89 %	34.35 (0.38)

Números en paréntesis corresponden a la desviación estándar de tres replicas por experimento.

### 3.3 Evaluación de crecimiento radial

El crecimiento de micelio a las 192 h en AHFA y en APD (Fig. 3) fue de 8 cm y 8.1 cm para *A. oryzae*, 4.8 cm y 6.7 cm para *A. flavus*, y de 3.5 cm y 3.9 cm para *Penicillium colei*, este comportamiento mostró que *A. oryzae* tuvo mayor habilidad para adaptarse rápidamente al medio de cultivo desarrollado en este trabajo (AHFA).



**Fig. 3.** Crecimiento radial de hongos filamentosos; **a)** *A. oryzae*, **b)** *A. flavus*, **c)** *Penicillium colei* en \*medio APD y \*\*medio AHFA.

Las 3 cepas de hongos filamentosos crecieron en ambos medios de cultivo, AHFA y APD. Sin embargo, la cepa de *A. oryzae* mostró la mayor velocidad de crecimiento radial en ambos medios; seguida en orden descendente por *A. flavus* y *Penicillium colei* (Tabla 2).



**Tabla 2.** Velocidad de crecimiento radial de cepas fúngicas, aisladas de hojas sanas de café, en diferentes medios de cultivo.

Cepa	Medio de cultivo	
	AHFA (cm/día)	APD (cm/día)
<i>Aspergillus oryzae</i>	0.959 <sup>a</sup> (0.005)	0.920 <sup>a</sup> (0.011)
<i>Aspergillus flavus</i>	0.539 <sup>b</sup> (0.001)	0.795 <sup>b</sup> (0.010)
<i>Penicillium colei</i>	0.394 <sup>b</sup> (0.000)	0.369 <sup>b</sup> (0.004)

Se reporta la media y entre paréntesis la desviación estándar de tres replicas por experimento. Valores seguidos por la misma letra no presentan diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

## 4. DISCUSIONES

### 4.2 Aislamiento e identificación molecular

En este trabajo se realizó el aislamiento y la identificación de hongos asociados a las hojas de cultivos de café, mediante la identificación molecular se observaron cepas de los géneros: *Aspergillus oryzae* (aislado H), *Aspergillus flavus* (aislado A) y *Penicillium colei* (aislado P) todos ellos hongos filamentosos. La técnica de identificación empleada fue eficaz para determinar a nivel género dichos aislados. En cuanto a los hongos identificados del género *Aspergillus*, se ha descrito que distintas especies de este género se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza (Abarca, 2000) pudiéndose aislar de una gran variedad de sustratos, ya que su capacidad de dispersión de conidios y su alta resistencia les permite permanecer en suspensión en el ambiente durante un largo periodo de tiempo. Específicamente, aislados de plantas de café con actividad antimicrobiana han sido caracterizados molecularmente a través del análisis filogenético de la región ITS correspondiendo a los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* (Sette *et al.*, 2006). La identificación de los aislados fúngicos a nivel de especie es cada vez más importante, ya que algunas especies de hongos filamentosos pueden presentar mayor importancia en diferentes procesos biotecnológicos; por lo que es necesario el empleo de marcadores moleculares más robustos como la secuenciación de los genes ribosomales 18S y 28S (Sette *et al.*, 2006). Adicionalmente, la secuenciación de otros genes como actina,  $\beta$ -Tubulina y/o factor de elongación de la traducción 1 $\alpha$  puede ofrecer un mayor nivel de resolución en determinados grupos de microorganismos (DIRECTORIO, U. V.; DE SERVICIOS, Carta. Identificación de hongos filamentosos y levaduras).

## 4.2 Análisis químico proximal

La composición proximal de la HFA (*Amaranthus hypochondriacus*) mostró valores similares a los reportados por García-Pereyra *et al.*, (2009) quienes reportaron porcentajes de 12-15 % de proteína, 63-71 % de carbohidratos, 1-5 % de lípidos y 18-23 % de cenizas cuando utilizaron tallo y hoja de la planta de amaranto de diferentes especies. En otro estudio, Gómez-Gómez *et al.*, (2011) utilizaron la misma especie de planta cultivada en Loma Bonita, Oaxaca, México en los meses de febrero a mayo (temperatura promedio de 28 °C y 66 % de humedad), obteniendo 24.75 % de proteína, 4.24 % de extracto etéreo y 15.33 % de cenizas; todos estos valores mayores a los obtenidos en este estudio; pero menores en cuanto a humedad (2.26 %), fibra cruda (7.7 %) y carbohidratos totales (45.69 %). Morales-Guerrero *et al.* (2009) y Soriano *et al.* (2004) obtuvieron una composición de: 14.18 % de proteína, 2.64 % de extracto etéreo, 9.27 % de cenizas, 10.14 % de humedad y 15.44 % de fibra cruda de hojas de amaranto (hojas). Por su parte, Rastogi & Shukla (2013) reportaron que la concentración de cenizas en toda la planta de amaranto, sin incluir el grano, fue de 14.5% este último resultado es similar al obtenido en este estudio (12.46 %). La variación en los porcentajes de los componentes de los residuos de amaranto en los estudios presentados puede deberse a múltiples factores que incluyen la especie de la planta, las condiciones ambientales y fisiográficas de las localidades donde se siembran los cultivos (García-Pereyra *et al.*, 2009). Sin embargo, se debe destacar que el forraje de amaranto presenta componentes que hacen atractivo su uso para otras aplicaciones.

## 4.3 Evaluación de crecimiento radial

Con base en el hecho de que la velocidad de crecimiento radial es una forma de evaluar la capacidad de adaptación metabólica de los hongos a diversas fuentes de carbono y nitrógeno e invadir un sustrato (Coello-Loor *et al.*, 2017) se puede decir que la cepa de *A. oryzae* fue la que se adaptó mejor al medio de cultivo desarrollado en este trabajo (AHFA); mientras que los otros hongos tardaron más en utilizar dicho medio, ya que crecieron lentamente con respecto a *A. oryzae*. De acuerdo con Toscano *et al.* (2015), ello estaría relacionado directamente con la producción de enzimas, ya que el género *Aspergillus* tiene la capacidad de degradar celulosa y hemicelulosa produciendo enzimas con actividad celulolítica. Por otro lado, Costa *et al.* (2010), afirmaron que no todos los hongos filamentosos crecen bien en un mismo medio, ya que algunos géneros requieren un medio más rico en nutrientes o de fácil asimilación para que su crecimiento sea óptimo. Para tal efecto, el pretratamiento químico, físico o biológico y/o combinaciones de éstos sobre la HFA podría liberar carbohidratos más simples para su uso como fuente de carbono (Chen *et al.*, 2007).

Los resultados presentados en este trabajo sugieren que la HFA puede ser utilizada como único sustrato para el crecimiento microbiano; particularmente de cepas productoras de enzimas lignocelulolíticas (e.g. *A. oryzae*) aisladas de hojas de café.

## AGRADECIMIENTOS

Cuerpo Académico Biotecnología sustentable (UNPA-CA-15) y a la Red Temática 12.3 PDA México (CONACyT). Al CONACYT por financiar la beca de Maestría en Biotecnología a María Fernanda Méndez Arango (No. de becario 637202).

## CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

## REFERENCIAS

Abarca M. 2000. Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. *Revista Iberoamericana de Micología*. 17: 79-84.

Chen Y., Jiang S., Yuan H., Zhou Q. & Gu, G. 2007. Hydrolysis and acidification of waste activated sludge at different pHs. *Water Research* 41(3):683-689.

Coello-Loor C. D., Avellaneda-Cevallos J. H., Barrera-Álvarez A. E., Peña-Galeas M. M., Yépez P. F. & Racines-Macías E. R. 2017. Evaluación del crecimiento y producción de biomasa de dos cepas del género *Pleurotus* spp., cultivadas en un medio agar con diferentes sustratos. *Ciencia y tecnología*. 10(2): 33-39.

Costa M., Torres M., Magariños H. & Reyes A. 2010. Producción y purificación parcial de enzimas hidrolíticas de *Aspergillus ficuum* en fermentación sólida sobre residuos agroindustriales. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 12(2): 163-175.

DIRECTORIO, U. V.; DE SERVICIOS, Carta. Identificación de hongos filamentosos y levaduras. URL. <https://www.uv.es/uvweb/coleccion-espanola-cultivos-tipo/es/servicios/identificacion-caracterizacion/identificacion-eucariotas/identificacion-hongos-filamentosos-levaduras-1285978906617.html> (consultado Marzo 15, 2019)

Gallou A., Suaste-Dzul A. P., Domínguez-Serna M. G. & Andrade G. 2015. Manual de prácticas del laboratorio de Biología Molecular. Servicio Nacional de Sanidad, inocuidad y calidad agroalimentaria. pp 2.

Gandarilla-Pacheco F. L., Galán-Wong L. J., Arévalo-Niño K., Elías-Santos M. & Quintero-Zapata I. 2013. Evaluación de aislados nativos mexicanos de *Beauveria bassiana* (*bals. Vuill. hypocreales: cordycipitaceae*) provenientes de zonas citrícolas para su producción masiva en cultivo sumergido y bifásico. *Agrociencia* 47: 255-266.

García-Pereyra J., Valdés-Lozano C., Olivares-Saenz E., Alvarado-Gómez O., Alejandro-Iturbide G., Salazar-Sosa E. & Medrano-Roldán H. 2009. Rendimiento de grano y calidad del forraje de amaranto (*Amaranthus* spp.) cultivado a

diferentes densidades en el noreste de México. Revista internacional de botánica experimental. 78: 53-60.

Gómez J. L., García A., Laucerica J. L., Yll M., Luis-Orozco J. & Martín C. 2001. Aprovechamiento de los desechos lignocelulósicos industriales. Universidad de Matanzas, Cuba. pp 3.

Gómez- Gómez A. L. 2014. Obtención de peptidos con actividad inhibitoria de la enzima convertidora de la angiotensina I a partir de hidrolizados proteínicos de la fracción vegetal del amaranto (*Amaranthus hypocondriacus L.*). Universidad del Papaloapan Oaxaca, México. pp 49.

Gómez-Gómez A. L., Soriano-Santos J. & García-Gómez M. J. 2011. Composición química proximal de harina elaborada a partir de la fracción vegetal de amaranto (*Amaranthus Hypocondriacus L.*). In: XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Guadalajara, Jalisco, México.

Mora V. E. 2015. Evaluación de dos hongos filamentosos para la biosíntesis de celulasas a partir de residuos agroindustriales de mora (*Rubus adenotrichos*) mediante fermentación en medio sólido. Universidad de Costa Rica Facultad de Ciencias. pp 8.

Morales-Guerrero J. C., Vázquez-Mata N. & Bressani-Castignoli R. 2009. El amaranto, características físicas, químicas toxicológicas y funcionales y aporte nutricional. Instituto nacional de ciencias médicas y nutrición Salvador Zubirán, México D.F. pp 269.

NMX-F-607-NORMEX-2013. 2013. Determinación de cenizas en alimentos. Normas mexicanas. pp 2.

NOM-086-SSA1-1994. 2006. Determinación de extracto etéreo (método soxhlet) en alimentos. Normas mexicanas dirección general de normas. pp 2.

NOM-155-SCFI-2012. 2012. Análisis de agua - medición de nitrógeno total kjeldahl en aguas naturales, residuales y residuales tratadas. Norma mexicana. pp 12.

NOM-116-SSA1-1994. 2006. Determinación de humedad en productos alimenticios. Normas mexicanas dirección general de normas. pp 2.

NOM-F-90-S-1978. 1979. Determinación de fibra cruda en alimentos. Norma Oficial Mexicana. pp 2.

Ramírez-Isidro O. 2017. Actividad de biopéptidos obtenidos por hidrólisis enzimática de las proteínas de la fracción vegetal del amaranto (*Amaranthus hypocondriacus L.*). Universidad del Papaloapan Oaxaca, México. pp 39.

Rastogi A. & Shukla S. 2013. Amaranth: A new millennium crop of nutraceutical values. *Food science and nutrition*. 53(2): 109-121.

Ríos M. D., Hoyos J. L. & Mosquera S. A. 2010. Evaluación de los parámetros productivos de la semilla de *Pleurotus ostreatus* propagada en diferentes medios de cultivo. *Facultad de ciencias agropecuarias*. 8(2): 86-94.

Sette, L. D., Passarini, M. R. Z., Delarmelina, C., Salati, F., & Duarte, M. C. T. 2006. Molecular characterization and antimicrobial activity of endophytic fungi from coffee plants. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(11), 1185-1195.

Soriano-Santos J., Malpica-Sánchez F. P., Ramírez-Romero M. A. G & Escamilla-Hurtado M. L. 2004. Análisis granulométrico de la harina de hoja de amaranto deshidratada, para la elaboración de una bebida de fibra dietética. *Tecnología de alimentos*. 39(1); 7-12.

Suarez C. & Holguín M. 2011. Evaluación de medios de cultivo sintéticos y cereales para la producción de semilla de setas comestibles. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*. 5(1): 130-140.

Torres-García J., Madrid-Ramírez A. & Díaz-Godínez G. 2011. Evaluación de la velocidad de crecimiento radial y biomasa de hongos filamentosos desarrollados en di (2-etilhexil) ftalato aislado de una industria productora de papel. In: XIV Congreso nacional de biotecnología y bioingeniería, Querétaro, México.

Toscano L., Pérez D., Cervantes L., Barrera F. I., González J., Muñoz J. & Sandoval E. 2015. Producción de enzimas celulolíticas a partir de hongos filamentosos usando paja de trigo como sustrato. In: XVIII Congreso Internacional de Ciencias Agrícolas, Mexicali, Baja California, México.

Vásquez A. M. 2013. Producción de xilanasas por *Aspergillus sp.* en fermentación sumergida y fermentación en medio sólido. *Universidad Iberoamericana*. pp 1.

Villa Y. & Espín N. 2010. Determinación de la cinética de crecimiento del hongo *Phanerochaete chrysosporium* en residuos lignocelulósicos y determinación de la actividad ligninoperoxidásica. *Revista politécnica*. 31(1): 70-74.

Wang X. C., Liu C., Huang L., Bengtsson-Palme J., Chen H., Zhang J. H., Cai D. & Li J. Q. 2015. ITS1: a DNA barcode better than ITS2 in eukaryotes?. *Molecular Ecology Resources*. 15(3): 573-86.

White T. J., Bruns T., Lee S. & Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. 38: 315-321.