

ANÁLISIS DE SECUENCIAS GENÓMICAS DE ENZIMAS OXIDATIVAS DE LIGNOCELULOSA EN CONSORCIOS MICROBIANOS DEGRADADORES DE RESIDUOS DE MAÍZ Y TRIGO.

Angel Rafael Pool Cen¹, José Ramón Pacheco Arjona², Mónica Noel Sánchez González*¹

¹Facultad de Ingeniería Química, Universidad Autónoma de Yucatán, Periférico de Mérida Licenciado Manuel Berzunza 13615, Chuburná de Hidalgo Inn. Mérida, Yucatán, C.P. 97302.

²Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán, Carretera Mérida-Xmatkuil Km. 15.5 Apdo., Itzimmá, Mérida, Yucatán, C.P. 97100.

Fecha de recepción: 28 de octubre de 2021 - Fecha de aceptación: 26 de enero de 2022

Resumen

Los residuos lignocelulósicos son desechos de elevada disponibilidad, alto contenido de azúcares y potencial de biotransformación en productos de interés gracias a la acción de enzimas oxidativas con actividad auxiliar. Diversos estudios sugieren que un enfoque hacia la maquinaria enzimática podría contribuir a discernir los mecanismos y relaciones sinérgicas presentes en los consorcios degradadores de sustratos recalcitrantes, tales como los residuos lignocelulósicos. El objetivo del presente trabajo fue analizar los datos metagenómicos provenientes de consorcios degradadores de residuos lignocelulósicos. Para ello se analizaron los metagenomas de consorcios acondicionados para utilizar hoja de maíz, mazorca de maíz, pericarpio de maíz y salvado de trigo como fuente de carbono. Los resultados demostraron que el contenido de enzimas oxidativas del grupo actividad auxiliar fue superior en residuos de hoja y mazorca de maíz, mientras que para el pericarpio de maíz y salvado de trigo la cantidad de enzimas oxidativas auxiliares fue menor. Esto proporciona información acerca de la influencia del contenido de lignocelulosa y la morfología de la fibra en la maquinaria enzimática requerida para la degradación de los residuos.

Palabras clave: residuos lignocelulósicos, metagenómica, actividad auxiliar, consorcio microbiano, degradación de lignocelulosa.

ANALYSIS OF GENOMIC SEQUENCES OF LIGNOCELLULOSE OXIDATIVE ENZYMES IN DEGRADING MICROBIAL CONSORTIA OF CORN AND WHEAT RESIDUES.

Abstract

Lignocellulosic residues are highly available wastes, with high sugar content and potential to biotransform into value-added products thanks to the action of oxidative enzymes of the auxiliary activity group. Several studies suggest that an approach to the enzymatic machinery could help to discern the mechanisms and synergistic relationships present in the degrading consortia of recalcitrant substrates, such as lignocellulosic residues. The goal of this work, was to analyze metagenomic data of lignocellulose degrader consortia. The metagenomes of consortia stabilized on maize husk, and cob, nixtamalized maize pericarp and wheat bran were analyzed. Results showed that the content of oxidative enzymes auxiliary activities was higher in husk and maize cob; while for the pericarp and wheat bran, the amount of auxiliary oxidative enzymes was lower.

* monica.sanchez@correo.uady.mx

This study provides information about how the lignocellulose content and fiber morphology influence the enzymatic machinery required for degradation.

Keywords: Lignocellulosic residues, metagenomics, auxiliary activities, microbial consortium, lignocellulose degradation.

Introducción

Los residuos lignocelulósicos son materiales compuestos principalmente por celulosa, lignocelulosa y lignina, lo cual los vuelve estructuralmente resistentes a la degradación (Cai *et al.* 2017). En México se generan grandes cantidades de residuos lignocelulósicos, entre los que se encuentran la mazorca (M) y hoja de maíz (HM), pericarpio de maíznixtamalizado (PMN) y salvado de trigo (ST). Estos residuos poseen alto contenido de azúcares fermentables que pueden ser usados para la producción de biocombustibles o químicos de valor agregado; sin embargo, su naturaleza recalcitrante ocasiona que sea necesaria la aplicación de pretratamientos químicos para facilitar la acción microbiológica y/o enzimática. En este sentido, la aplicación de químicos genera la producción de furfural y metil furfural que pueden contaminar los productos obtenidos y limitar la acción de agentes biológicos (Córdoba *et al.*, 2013). En comunidad, los microorganismos degradan la lignocelulosa como parte del ciclo del carbono, de esta manera pueden producir arsenales enzimáticos, generando un proceso natural y efectivo. La diversidad en un consorcio microbiano es un factor que le permite desarrollar interacciones sinérgicas entre las poblaciones favoreciendo la degradación y aprovechamiento de sustratos disponibles en el entorno (Bernstein & Carlson, 2012; Díaz-García *et al.*, 2020).

Las enzimas activas sobre carbohidratos (CAZy, por sus siglas en inglés) desempeñan un papel crucial en el metabolismo de carbohidratos. Las CAZy incluyen grupos como glicosil hidrolasas (GH), glicosil

transferasas (GT), polisacárido liasas (PL), carboxil esterasas (CE) y actividades auxiliares (AA). Antiguamente se consideraba que la hidrólisis por GH era el único mecanismo utilizado para la degradación de polisacáridos lignocelulósicos. Actualmente se conoce que, en el proceso de degradación de polisacáridos altamente cristalinos y recalcitrantes, participan enzimas oxidativas de carbohidratos pertenecientes a las AA. Este grupo además incluye familias relacionadas con degradación de lignina, un polímero fenólico que confiere resistencia a la degradación. Entre las enzimas identificadas como AA podemos destacar a la monooxigenasa lítica de polisacáridos (LPMO, por sus siglas en inglés), activa sobre celulosa cristalina y cadenas de hemicelulosa (Bissaro *et al.*, 2018); celobiosa deshidrogenasa (CDH), que oxida celobiosa y celobiooligosacáridos generando H₂O₂ en el proceso (Tan *et al.*, 2015); finalmente peroxidasa y lacasa, enfocadas en la oxidación de la lignina (Falade *et al.*, 2017; Janusz *et al.*, 2020).

La metagenómica estudia el material genético (ADN) de un conjunto de poblaciones microbianas que caracterizan un entorno determinado (Hugenholtz & Tyson, 2008). En conjunto con tecnologías de secuenciación, la metagenómica ayuda a identificar los microorganismos presentes en la comunidad y predecir su potencial para generar metabolitos de interés (Franzosa *et al.*, 2015), tales como las AA. Las tecnologías de secuenciación existentes se diferencian principalmente por la cantidad y longitud de segmentos que son capaces de analizar, así como por el rendimiento y exactitud de los resultados los cuales es posible analizar *in silico* (Pacheco-Arjona & Sandoval-Castro, 2018).

En un proyecto previo, Serrano-Gamboa *et al.* (2019) obtuvo el consorcio PM-06 al enriquecer el microbioma nativo del PMN, con capacidad para degradar el ~85% del residuo. Posteriormente, Chacón-Pérez (2020) realizó un proyecto en el que enriqueció el consorcio PM-06 con diferentes residuos lignocelulósicos (HM, M y ST) y extrajo las secuencias metagenómicas correspondientes a cada una de las comunidades resultantes.

El objetivo de este trabajo fue analizar las secuencias metagenómicas obtenidas de los consorcios microbianos enriquecidos en PMN, ST, HM y M, con la hipótesis de que existe una relación directa entre la abundancia de AA y el grado de recalcitrancia de los residuos lignocelulósicos a degradar.

Metodología

Toma de muestra, extracción de ADN, secuenciación y anotación de metagenomas

Las secuencias metagenómicas fueron obtenidas en un estudio previo realizado por Chacón-Pérez (2020) en el cual, una vez estabilizados los consorcios en los sustratos de interés, se tomaron muestras de estos a las 168 h de cultivo para cuantificar la degradación y extraer ADN metagenómico (ADNm_g). Las muestras de ADN_{m_g} se enviaron a un servicio de secuenciación (Admera Health LLC) en donde se construyeron bibliotecas tipo Nextera XT con lecturas de tipo “paired end” (PE) de un largo de 150 pb y la secuenciación se llevó a cabo en un equipo NextSeq 2000 de Illumina. Los archivos recibidos en formato fastq, fueron ensamblados y anotados en un trabajo relacionado (Serrano-Gamboa *et al.*, 2019). Estos datos fueron utilizados como material de partida del presente trabajo.

Anotación CAZy

La anotación de enzimas CAZy se realizó en el metaservidor web dbCAN2 (<https://bcb.unl.edu/dbCAN2/blast.php>). Para lo anterior, se cargaron al metaservidor los

archivos correspondientes a cada muestra metagenómica, específicamente los archivos anotados de proteínas en formato fasta. El programa automatiza el proceso de anotación funcional al comparar los datos de los archivos de entrada contra diferentes bases de datos de enzimas que de manera experimental se ha comprobado que posean actividad sobre carbohidrato. Los resultados se entregan en un archivo en formato tabulador bajo el nombre “Overview”.

Revisión de literatura

La búsqueda de literatura acerca de la composición química de los residuos lignocelulósicos de interés se realizó mediante el motor de búsqueda “Google Académico” (www.scholar.google.com), el cual se caracteriza por el contenido proveniente de revistas de investigación. Los términos utilizados en la búsqueda fueron los nombres de cada residuo, su variante en inglés o en conjunto con la expresión “chemical composition” agregada después del nombre del residuo. El criterio de selección aplicado para los reportes encontrados fue el desglose de compuestos complejos (celulosa, hemicelulosa y lignina) que conforman el residuo lignocelulósico de interés y que dicho residuo sea del mismo género y especie que el del PMN utilizado para aislar el consorcio original (PM-06).

Análisis de abundancia

Este análisis se realizó con el programa Microsoft Excel de la paquetería Office 365. Los resultados “Overview” se ejecutaron bajo la interfaz del programa Excel como un documento de datos delimitados. Posteriormente, se utilizó la función de filtros para ordenar los datos según el número de programas que tengan coincidencias en la anotación de mayor a menor (HMMER, DIAMOND y Hotpep). Finalmente, se extrajeron las anotaciones correspondientes a actividades auxiliares marcadas en el

“Overview” como “AA”, recuperando las filas con identificadores de interés (“Gene ID” de AA) y se cuantificaron, con el fin de generar gráficos con información de la abundancia de cada enzima por residuo lignocelulósico.

Identificación taxonómica, diversidad y riqueza microbiana

Con los “Gene ID” recuperados del archivo de Excel (Overview) se realizó una búsqueda manual en los archivos de anotaciones proteicas y se extrajeron las secuencias correspondientes a cada “Gene ID”. Con estas secuencias se llevó a cabo un BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp>), con el fin de confirmar la asignación y función de cada una.

La diversidad microbiana fue calculada para cada consorcio enriquecido a través del índice

de Shannon-Wiener (Shannon, 1949) utilizando la siguiente fórmula:

$$H' = - \sum_{i=1}^S p_i \log_2 p_i$$

Donde H' corresponde al índice de Shannon; S, corresponde al número de total de géneros (riqueza, N) con secuencias de AA; p_i, proporción de un género (n_i) respecto a N (p_i=n_i/N)

Resultados

Análisis de los componentes de los residuos

La cantidad de celulosa, hemicelulosa y lignina presente en los residuos degradados fue investigada en la literatura. Los resultados se presentan en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Composición química porcentual de los residuos lignocelulósicos.

	Hoja de maíz	Mazorca de maíz	PMN	Salvado de trigo
Celulosa	27%	45-50%	19%	6.5-10%
Hemicelulosa	25%	34%	42%	21-33%
Lignina	15%	15%	5%	4-8%
Referencia	Rabemanolontsoa & Saka, 2013.	Córdoba <i>et al.</i> , 2013.	Rostro <i>et al.</i> , 2014.	Chaquilla-Quilca <i>et al.</i> , 2018.

Como se puede observar en el Cuadro 1, la suma de los porcentajes de celulosa, hemicelulosa y lignina no se corresponde al 100%, esto se debe a que los estudios citados también mencionan una fracción de contenido proteico y/o cenizas en las muestras, sin embargo, esta fracción no se toma en cuenta porque el presente trabajo tiene un enfoque en genes codificantes para enzimas activas en carbohidratos.

Análisis taxonómico

La diversidad se reporta en el Cuadro 2 como índice de Shannon-Wiener (H') y la riqueza (N) corresponde al número de géneros microbianos con secuencias de AA en cada consorcio. El consorcio HM fue el que presentó mayor diversidad y riqueza microbiana, seguido por M, mientras que ST y PM-06 presentaron valores de diversidad similares, aunque la riqueza fue mayor en ST respecto a PM-06.

Cuadro 2. Riqueza y diversidad de los consorcios que contienen secuencias de AA.

Consortio	H'	N
HM	2.99	29
M	2.83	18
ST	2.38	15
PM-06	2.41	9

HM es el consorcio de la hoja de maíz; M es el consorcio de la mazorca; ST es el consorcio del salvado de trigo y, PM-06 es el consorcio obtenido del PMN.

Los microorganismos identificados con secuencias de AA pertenecen a los filos Firmicutes y Actinobacteria (Figura 1). En el consorcio HM, el género *Nonomuraea* presentó el mayor número de secuencias de AA. En los consorcios M y ST,

Cellulosimicrobium y *Leifsonia* se identificaron con el mayor contenido de estos genes. Por su parte, en el consorcio PM-06 *Microbacterium* representó la tercera parte de los microorganismos con secuencias de AA. Los géneros que incluyeron un mayor número de AA pertenecen al filo Actinobacteria.

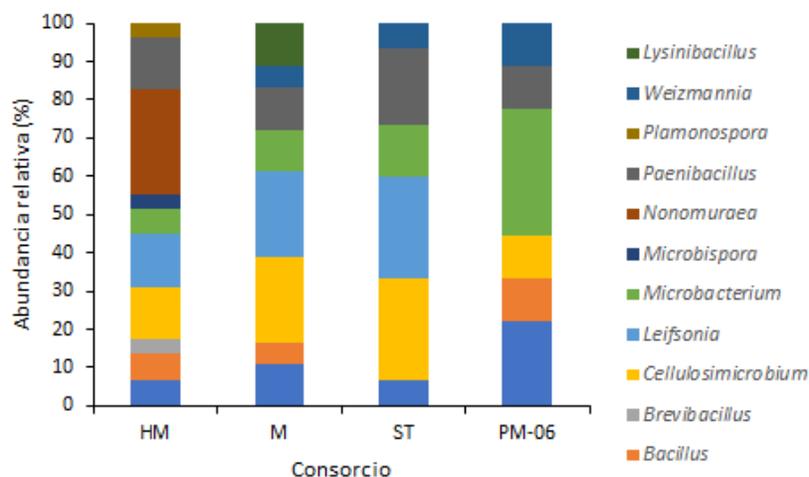


Figura 1. Abundancia relativa de los géneros microbianos con secuencias de AA.

Abundancia relativa de los genes codificantes para enzimas de actividades auxiliares

Se analizó la abundancia relativa de lacasas (AA1), peroxidasas (AA2), celobiosa deshidrogenasa (AA3) y monooxigenasa lítica de polisacáridos (AA10) en los metagenomas de los consorcios HM, M, PM-06 y ST degradadores de hoja y mazorca de maíz, PMN

y salvado de trigo, respectivamente. Como se puede apreciar en la Figura 2, estas cuatro enzimas estuvieron presentes en el metagenoma del consorcio HM, mientras que en los demás AA2 no fue detectada. Por otro lado, en el metagenoma de los consorcios HM, M y ST, AA3 fue mayoritaria, mientras que en PMN AA1 fue la familia CAZy más abundante.

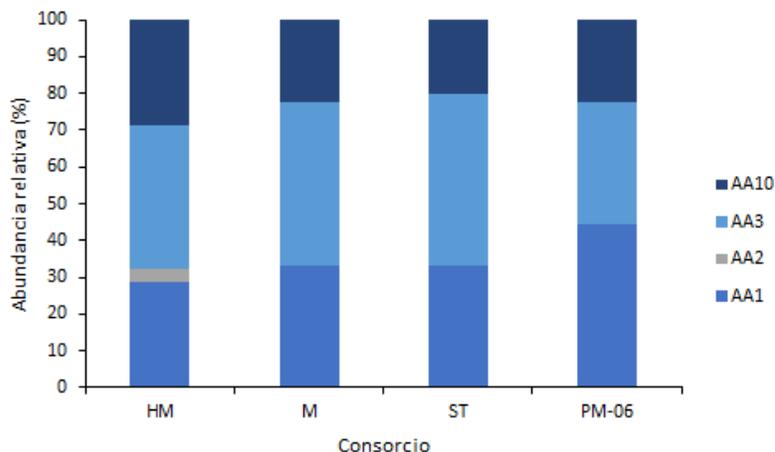


Figura 2. Abundancia relativa de AA1, AA2, AA3 y AA10 en los consorcios HM, M, ST y PM-06.

Análisis de abundancia diferencial de genes codificantes para enzimas de actividades auxiliares

La abundancia diferencial de secuencias genómicas de AA1, AA2, AA3 y AA10 se presenta en el gráfico de calor de la Figura 3.

Como se puede apreciar, el metagenoma del consorcio HM fue el que presentó una mayor abundancia y diversidad de AA, mientras que en el metagenoma de M la diversidad y abundancia fueron menores, seguido de los metagenomas de ST y PM-06.

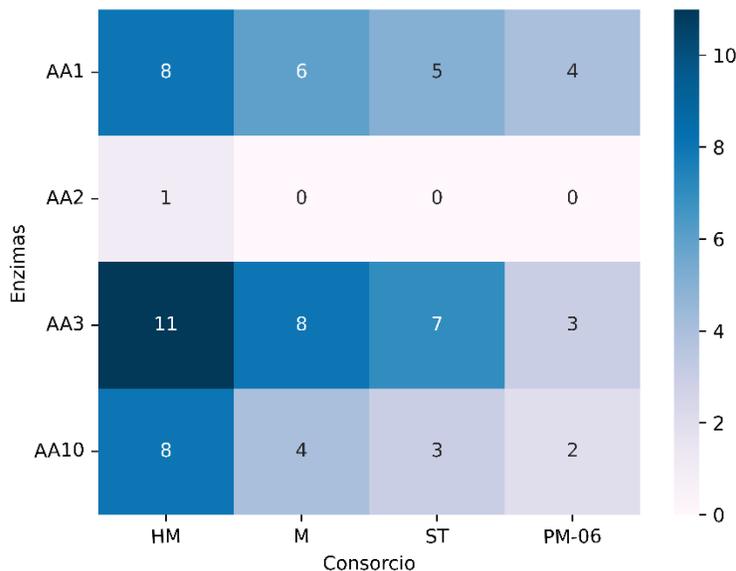


Figura 3. Abundancia diferencial de secuencias de AA en los metagenomas de HM, M, ST y PM-06.

Discusión

Los consorcios analizados provienen del mismo origen y se adaptaron para una óptima utilización de la fuente de carbono. De acuerdo con la composición, HM y M contienen el mayor porcentaje de lignina por lo que podrían considerarse como más recalcitrantes que ST y PMN. La mayor diversidad y riqueza microbiana la presentó el consorcio HM, esta comunidad logró degradar 23% del residuo (Chacón-Pérez, 2020). Diferentes géneros microbianos presentaron secuencias de AA por lo que el consorcio HM tiene capacidad potencial para degradar residuos más recalcitrantes. Estos datos sugieren que los microorganismos del consorcio HM podrían estar interactuando sinérgicamente para degradar el residuo. Además de la sinergia entre microorganismos, en el consorcio HM es posible la sinergia entre enzimas debido a la presencia de AA3. Esta enzima oxida azúcares generando H_2O_2 que es co-sustrato de AA10 y AA2. Secuencias de esta enzima no fueron detectadas en otros consorcios. Por lo que respecta a M, el consorcio solo logró la degradación del 15% de este residuo (Chacón-Pérez, 2020). A pesar de que la cantidad de lignina es similar a la de HM, la concentración de celulosa (27%) es mayor lo que pudiera aumentar la recalcitrancia. Los microorganismos que se lograron enriquecer en el consorcio M presentaron menor número de AA y menor diversidad y riqueza taxonómica que HM, sugiriendo que las interacciones microbianas fueron menores y por lo tanto se obtuvo una menor degradación. ST y PMN contienen menor concentración de lignina y fueron degradados en mayor proporción (39 y 83%, respectivamente). A pesar de que el número de AA y riqueza microbiana fue menor para PM-06, fue el consorcio que logró la mayor degradación. El origen de los microorganismos es importante ya que fueron aislados de PMN y es posible que el consorcio sea más especializado.

La composición puede ser un indicio de la recalcitrancia de un residuo lignocelulósico; sin embargo, la estructura e integridad son factores importantes para considerar. Prado-Martínez *et al.* (2012) realizaron una caracterización morfológica de la hoja de maíz y refieren que las fibras que lo componen pueden clasificarse como “moderadamente largas”, esto aunado a otras propiedades, confiere una mayor rigidez a la estructura de la HM, lo cual podría explicar la cantidad tan elevada de enzimas de AA que se requieren para su degradación. A nivel de morfología, las fibras que conforman la mazorca presentan una estructura irregular (Córdoba *et al.*, 2013), esto facilitaría la acción de las enzimas oxidativas requiriendo una cantidad ligeramente menor de éstas para obtener el nivel de degradación ya mencionado. Sin embargo, es probable que la escasa diversidad e interacción enzimáticas no hayan sido óptimas para la degradación de la mazorca.

A pesar de que el contenido de lignina es similar entre ST y PMN, este último fue degradado con una eficiencia superior al 80%, mientras que el ST fue consumida en un 39% (Chacón-Pérez, 2020). Este comportamiento puede deberse a que el PMN es producto de un proceso de nixtamalización que afecta su estructura volviéndola más susceptible a la degradación, por lo que se requeriría una menor producción de enzimas para su consumo.

Los resultados del análisis taxonómico refuerzan lo señalado por el análisis de composición y abundancia enzimática, ya que el consorcio HM que mostró la mayor diversidad y abundancia de enzimas AA, también fue el que presentó un valor para el índice de Shannon-Wiener superior a los demás consorcios. Cabe destacar que este fue el único consorcio en el que se detectó el género *Nonomuraea*, así como la presencia de AA2, lo que concuerda con lo reportado por Hamdi *et al.* (2019) en un artículo de revisión en el que refiere que se ha asociado al género

Nonomuraea con la secreción de la enzima AA2. Los índices de Shannon-Wiener de los demás consorcios siguen el patrón en cuanto a abundancia enzimática y diversidad, ya que el valor de este índice decrece en la misma medida que disminuye la abundancia y diversidad de enzimas señalados para cada residuo. Este comportamiento concuerda con lo reportado por Chernov *et al.* (2015) al estudiar comunidades aisladas de muestras de suelo, ya que en estas comunidades complejas el índice de Shannon identifica la riqueza sin depender en gran medida de la cantidad de secuencias usadas para el cálculo. Por consiguiente, la diversidad de enzimas observada en este trabajo se debe efectivamente a diferencias entre las poblaciones.

Referencias

- Bernstein, H. C., & Carlson, R. P. (2012). Microbial consortia engineering for cellular factories: In vitro to in silico systems. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 3(4), e201210017. <https://doi.org/10.5936/csbj.20>
- Bissaro, B., Várnai, A., Rohr, A., & Eijsink, V. (2018). crossm Oxidoreductases and Reactive Oxygen Species in Conversion of Lignocellulosic Biomass. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 82(4), 1–51. <https://doi.org/doi.org/10.1128/MMBR.00029-18>
- Cai, J., He, Y., Yu, X., Banks, S. W., Yang, Y., Zhang, X., Yu, Y., Liu, R., & Bridgwater, A. V. (2017). Review of physicochemical properties and analytical characterization of lignocellulosic biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 76(October 2016), 309–322. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.03.072>
- Chacón-Pérez, L. (2020). *Efecto de la Concentración de la Fuente de Nitrógeno y la Naturaleza de la Fuente de Carbono Sobre la Capacidad de Degradación de la Lignocelulosa del Consorcio PM-06*. Proyecto integrador de ingeniería en biotecnología. FIQ-UADY, Mérida.
- Chaquilla-Quilca, G., Balandrán-Quintana, R. R., Mendoza-Wilson, A. M. & Mercado-Ruiz, J. N. (2018). Propiedades y posibles aplicaciones de las proteínas de salvado de trigo. *CienciaUAT*, 12(2), 137-147.
- Córdoba, J., Salcedo, E., Rodríguez, R., Zamora, J. F., Manríquez, R., Contreras, H., Robledo, J., & Delgado, E. (2013). *Caracterización y Valoración Química del Olote: Degradación Hidrotérmica Bajo Condiciones Subcríticas*. 044(33), 171–184.
- Chernov, T. I., Tkhakakhova, A. K., & Kutovaya, O. V. (2015). Assessment of diversity indices for the characterization of the soil prokaryotic community by metagenomic analysis. *Eurasian Soil Science*, 48(4), 410–415. <https://doi.org/10.1134/S1064229315040031>

Conclusiones

En este trabajo se determinó que el contenido de AA fue proporcional a la recalcitrancia de los residuos lignocelulósicos. El residuo más recalcitrante fue la hoja de maíz y el consorcio enriquecido en este residuo presentó mayor contenido de secuencias de AA, mientras que el menos recalcitrante fue PMN y presentó el menor contenido de secuencias.

Reconocimientos

Proyecto CONACyT CB 242952 y Facultad de Ingeniería Química.

- Díaz-García, L., Bugg, T. D. H., & Jiménez, D. J. (2020). Exploring the Lignin Catabolism Potential of Soil-Derived Lignocellulolytic Microbial Consortia by a Gene-Centric Metagenomic Approach. *Microbial Ecology*, 80(4), 885–896. <https://doi.org/10.1007/s00248-020-01546-1>
- Falade, A. O., Nwodo, U. U., Iweriebor, B. C., Green, E., Mabinya, L. V., & Okoh, A. I. (2017). Lignin peroxidase functionalities and prospective applications. *MicrobiologyOpen*, 6(1), 1–14. <https://doi.org/10.1002/mbo3.394>
- Franzosa, E. A., Hsu, T., Sirota-Madi, A., Shafquat, A., Abu-Ali, G., Morgan, X. C., & Huttenhower, C. (2015). Sequencing and beyond: Integrating molecular “omics” for microbial community profiling. *Nature Reviews Microbiology*, 13(6), 360–372. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3451>
- Hamdi, C., Arous, F., & Jaouani, A. (2019). Actinobacteria: A Promising Source of Enzymes Involved in Lignocellulosic Biomass Conversion. *Adv Biotech & Micro*, 13(5): 555874. DOI: 10.19080/AIBM.2019.13.5558584
- Hugenholtz, P., & Tyson, G. W. (2008). Microbiology: Metagenomics. *Nature*, 455(7212), 481–483. <https://doi.org/10.1038/455481a>
- Janusz, G., Pawlik, A., Świdorska-Burek, U., Polak, J., Sulej, J., Jarosz-Wilkolazka, A., & Paszczyński, A. (2020). Laccase properties, physiological functions, and evolution. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3). <https://doi.org/10.3390/ijms21030966>
- Pacheco Arjona, J. R., & Sandoval-Castro, C. A. (2018). Tecnologías de Secuenciación del Metagenoma del Rumen. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 21, 587–598.
- Prado-Martínez, Maribel, Anzaldo-Hernández, José, Becerra-Aguilar, Bruno, Palacios-Juárez, Hilda, Vargas-Radillo, José de Jesús, & Rentería-Urquiza, Maite. (2012). Caracterización de hojas de mazorca de maíz y de bagazo de caña para la elaboración de una pulpa celulósica mixta. *Madera y bosques*, 18(3), 37-51.
- Rabemanolontsoa, H. & Saka, S. (2013). Comparative study on chemical composition of various biomass species. *RSC Advances*, 3, 3946–3956. <https://doi.org/10.1039/c3ra22958k>
- Rostro, M., Sánchez-González, M., Rivas, S., Moure, A., Domínguez, H., & Parajó, J. C. (2014). Non-isothermal autohydrolysis of nixtamalized maize pericarp: Production of nutraceutical extracts. *LWT - Food Science and Technology*, 58(2), 550–556. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.03.043>
- Saval, S., Ingeniería, I. De, & Universitaria, C. (2012). Aprovechamiento de Residuos Agroindustriales : Pasado , Presente y Futuro. *BioTecnología*, 16(2), 14–46.
- Serrano-Gamboa, J. G., Rojas-Herrera, R. A., González-Burgos, A., Folch-Mallol, J. L., Jiménez, D. J., & Sánchez-González, M. N. (2019). Degradation profile of nixtamalized maize pericarp by the action of the microbial consortium PM-06. *AMB Express*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0812-7>
- Shannon CE. (1949). A mathematical theory of communication. *Bell System Technical Journal*. 1948;27:379–423. doi: 10.1002/j.1538-7305.1948.tb01338.x.

Tan, T., Kracher, D., Gandini, R., Sygmund, C., Kittl, R., Haltrich, D., Hällberg, B. M., Ludwig, R., & Divne, C. (2015). Structural basis for cellobiose dehydrogenase action during oxidative cellulose degradation. *Nature Communications*, 6(1), 7542. <https://doi.org/10.1038/ncomms8542>