

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

“PRODUCCIÓN DE ENZIMAS HIDROLASAS OBTENIDAS POR HONGO *PLEUROTUS OSTREATUS* EN FERMENTACIÓN SÓLIDA Y SU APLICACIÓN EN EL BAGAZO RESIDUAL DE LA INDUSTRIA DE PRODUCCIÓN DE SIDRA”

TESIS PRESENTADA

**COMO REQUISITO PARA OBTENER GRADO DE
MAESTRA EN INGENIERÍA QUÍMICA**

PRESENTA:

XIOMARA JARED MATUS MARTÍNEZ

ASESOR:

DR. MANUEL SÁNCHEZ CANTÚ

COASESOR:

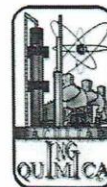
MARIA ELENA RAMOS CASSELLIS

BUAP

H. Puebla Z., DICIEMBRE 2018



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS DE POSGRADO
MAESTRÍA EN INGENIERÍA QUÍMICA



ACTA DE REVISIÓN, LIBERACIÓN E IMPRESIÓN DE TESIS

Nombre de la estudiante: Xiomara Jared Matus Martinez

Matrícula: 216470567

Nombre del director: DR. MANUEL SÁNCHEZ CANTÚ

Nombre del codirector: DRA. MARÍA ELENA RAMOS CASSELLIS

Título de la Tesis:

“PRODUCCIÓN DE ENZIMAS HIDROLASAS OBTENIDAS POR HONGO *PLEUROTUS OSTREATUS* EN FERMENTACIÓN SÓLIDA, Y SU APLICACIÓN EN EL BAGAZO RESIDUAL DE LA INDUSTRIA DE PRODUCCIÓN DE SIDRA”

Comisión Revisora:

Presidente: Dr. María del Carmen Guadalupe Avelino Flores Firma: _____

Secretario(a): Dr. Marco Antonio Marín Castro Firma: _____

Vocal (1): Dr. María Elena Ramos Cassellis Firma: _____

Vocal (2): Dr. Manuel Sánchez Cantú Firma: _____

Los integrantes de la Comisión Revisora expresamos que hemos leído y revisado el manuscrito de la tesis de maestría que presenta el (la) estudiante arriba indicado, por lo que estamos de acuerdo en que se proceda con la impresión definitiva de la tesis y que el (la) estudiante presente su defensa y examen de grado en la fecha, horario y lugar que se indican a continuación.

Fecha de examen: 13 de diciembre de 2018

Hora: 11:00 am

Día de la semana: Jueves

Lugar: FIQ 7 (301)

Revisa y Autoriza: Sello de la Secretaría de Investigación y Estudios de Posgrado. FIQ- BUAP



AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios por permitirme tener y disfrutar a mi familia, gracias a mi madre Fabiola Martínez López por ser mi ejemplo, mi motor para superarme y lograr todo lo que me proponga, gracias también a mi padre Roberto Matus por apoyarme en cada decisión y proyecto.

A todas las personas que nos han apoyado y han hecho que el trabajo se realice con éxito en especial a aquellos me abrieron las puertas y compartieron sus conocimientos.

Gracias de corazón y muy especialmente a mis tutores, los doctores Manuel Sánchez Cantú y María Elena Ramos Cassellis por su paciencia, criterio y aliento. Ha sido un privilegio poder contar con su guía y ayuda, me llevo lo mejor de ustedes y estén seguros que siempre los recordare con cariño y admiración, porque ustedes forman parte esencial de mi formación académica y personal, gracias infinitas.

Mi más profundo agradecimiento al doctor Marco Marín por su atención, amabilidad, por compartir sus conocimientos y su decisivo apoyo para este trabajo de investigación, a la doctora Carmen Avelino por sus gestos amables, apoyo y comprensión, gracias a ambos por la buena disposición que han mostrado.

Gracias a las personas que de alguna u otra manera han sido claves en esta etapa de mi vida, a mis colegas y amigos el trio "Gonzales", Oscar por atender mis llamados de auxilio cuando lo necesite, siempre atento, pendiente, dispuesto ayudarme, a Julio y Carolina por la paciencia y apoyo al despejar las dudas que me surgían en materias que se me dificultaron, por nunca dejarme sola, por las risas y por todos los momentos compartidos durante estos años, gracias a los tres y gracias a Dios por ponerlos en mi vida y permitirme conocerlos.

Gracias con especial amor y cariño a la persona que me empujo a esta gran aventura que fue la maestría, Javier David Vega Arroy, gracias amor por confiar en mí, la ayuda que me has brindado ha sido sumamente importante, estuviste a mi lado inclusive en los momentos y situaciones más difíciles, siempre ayudándome. No fue sencillo culminar con éxito este proyecto, sin embargo, siempre fuiste motivador.

No ha sido sencillo el camino hasta ahora, pero gracias a todos, por su aporte, a su amor y a su inmensa bondad y apoyo, lo complicado de lograr esta meta se ha notado menos, les agradezco y hago presente mi gran afecto hacia ustedes.

Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo recibido durante la maestría y a la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado por el apoyo otorgado para la conclusión de esta tesis, dentro del programa II. investigación y posgrado. Aseguramiento de la calidad en el posgrado. Indicador establecido en el plan de desarrollo institucional del 2017, porque sin sus recursos no me hubiera sido posible estudiar y culminar con éxito esta etapa.

Índice de contenido

Resumen.....	1
Introducción.....	2
OBJETIVOS.....	4
OBJETIVO GENERAL.....	4
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES.....	5
1.1 RESIDUOS AGROINDUSTRIALES.....	6
1.1.1 Bagazo de manzana proveniente de la industria sidrera.....	6
1.2 Componentes de los residuos lignocelulósicos.....	8
1.2.1 Celulosa.....	9
1.2.2 Hemicelulosa.....	10
1.2.3 Lignina.....	11
1.2.4 Pectina.....	13
1.3 Hongos de pudrición blanca.....	13
1.3.1 <i>Pleurotus ostreatus</i>	15
1.4 Enzimas extracelulares.....	17
1.5.1 Enzimas hidrolasas.....	18
1.5.1.1 Xilanasas.....	19
1.5.1.2 Celulasas.....	20
1.5.1.3 Pectinasas.....	21
1.6 Fermentación sólida.....	22
1.7 Pretratamiento.....	24
Bibliografía: capítulo 1.....	27

Capítulo 2: Metodología.....	36
2.1 Acondicionamiento y caracterización del bagazo de manzana.....	37
2.1.1 Acondicionamiento del bagazo de manzana.....	38
2.1.2 Análisis fisicoquímico	38
2.1.2.1 pH.....	38
2.1.2.2 Acidez titulable.....	38
2.1.2.3 Brix	39
2.1.3 Análisis composicional.....	39
2.1.3.1 Humedad.....	39
2.1.3.2 Cenizas.....	39
2.1.3.3 Carbohidratos totales.....	40
2.1.3.4 Proteínas.....	40
2.1.3.5 Extracto etéreo	41
2.1.3.6 Fibra cruda (FC)	41
2.1.3.7 Fibra detergente neutra (FDN).....	42
2.1.3.8 Fibra detergente ácida (FDA)	43
2.1.3.9 Lignina residual	43
2.1.3.10 Celulosa	44
2.1.3.11 Hemicelulosa.....	44
2.1.4 Análisis estructural	44
2.2 Fermentación del bagazo e Inoculación de <i>Pleurotus ostreatus</i>.....	46
2.2.1 Producción del micelio.....	47
2.2.2 Activación del micelio	47
2.2.3 Preparación y acondicionamiento del sustrato.....	47
2.2.4 Inoculación del hongo en los reactores.....	48
2.3 Obtención de extracto enzimático y determinación de actividad enzimática.....	48

2.3.1	Obtención y purificación del extracto.....	49
2.3.2	Determinación de actividad enzimática.....	49
2.3.3	Actividad enzimática específica.....	50
2.4	pretratamiento del bagazo de manzana.....	52
2.4.1	Selección de extractos enzimáticos.....	52
2.4.2	Acondicionamiento de extractos enzimáticos.....	53
2.4.3	Inoculación e incubación de enzimas en bagazo de manzana.....	53
2.4.4	Extracción de enzimas y bagazo de manzana pretratado.....	53
2.4.5	Hidrólisis enzimática.....	53
	Bibliografía: capítulo 2.....	54
	Capítulo III: RESULTADOS.....	56
3.1	Análisis Físicoquímico.....	57
3.2	Análisis composicional.....	58
3.3	Análisis estructural.....	63
3.4	Producción del micelio.....	68
3.5	Activación del micelio.....	69
3.6	Preparación y acondicionamiento del sustrato.....	70
3.7	Actividad enzimática.....	72
3.7.1	Actividad enzimática: celulasas.....	73
3.7.2	Actividad enzimática: xilanasas.....	74
3.7.3	Actividad enzimática pectinasas.....	75
3.8	Actividad enzimática específica.....	77
3.9	Pretratamiento enzimático.....	79
3.10.1	Cuantificación de celulosa durante el pretratamiento enzimático.....	80
3.10.2	Cuantificación de hemicelulosa durante el pretratamiento enzimático....	81
3.10.3	Cuantificación de lignina durante el pretratamiento.....	82

3.12 Actividad enzimática y azúcares durante el tratamiento.....	83
Bibliografía capítulo 3.....	87
CONCLUSIONES.....	92

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. 1 Estructura de la pared celular	9
Figura 1. 2 Estructura de la celulosa con puentes de hidrogeno.....	10
Figura 1. 3 Estructura de hemicelulosa	11
Figura 1. 4 Estructura parcial de la lignina.	12
Figura 1. 5 Estructura química de la pectina	13
Figura 1. 6 Ciclo de vida de <i>Pleurotus ostreatus</i>	16
Figura 1. 7 Efecto del pretratamiento	24
CAPITULO 2. Metodología	
Figura 2. 1 Metodología para la caracterización del residuo agroindustrial del bagazo de manzana.....	37
Figura 2. 2 Metodología de la fermentación del bagazo de manzana e inoculación de <i>Pleurotus</i>	46
Figura 2. 3 Diagrama de bloques de la metodología seguida en la etapa 3.....	49
Figura 2. 3 Metodología seguida en la etapa 4.	52
CAPITULO 3. Resultados	
Figura 3. 1 Patrones de rayos X en de bagazo de manzana.	64
Figura 3. 2 Ficha JCPDS de la celulosa nativa.	65
Figura 3. 3 Deconvolución de las señales de celulosa y hemicelulosa no cristalina.	66
Figura 3. 4 SEM del bagazo de manzana a) muestra fibrosa de celulosa a 50µm ...	67
Figura 3. 5 Micelio propagado en caja Petri de <i>Pleurotus Ostreatus</i>	69

Figura 3. 6 Micelio activado de <i>pleurotus ostretus</i> en trigo.	69
Figura 3. 7 Figura 3.7 Crecimiento micelar del hongo <i>Pleurotus ostreatus</i> : 1) día 3 y 2) día 7 de inoculación.	71
Figura 3. 8 Crecimiento del micelio durante 27 días del hongo <i>Pleurotus Ostreatus</i>	72
Figura 3. 9 Actividad enzimática de las enzimas celulasas.	74
Figura 3. 10 Actividad enzimática xilanasas.....	75
Figura 3. 11 Actividad enzimática pectinasas.....	76
Figura 3. 12 Comparación de las actividades enzimáticas de las enzimas extracelulares de <i>Pleurotus ostreatus</i>	77
Figura 3. 13 Actividad enzimática específica de las enzimas extracelulares de <i>Pleurotus ostreatus</i>	79
Figura 3. 14 Cuantificación de la celulosa durante el tratamiento enzimático.	80
Figura 3. 15 Cuantificación de hemicelulosa durante el tratamiento enzimático.	81
Figura 3. 16 Cuantificación de lignina durante el tratamiento enzimático.....	83
Figura 3. 17 Actividad de las enzimas celulasas y azúcares producidos durante el tratamiento enzimático.	84
Figura 3. 18 Actividad y azúcares producidos durante el tratamiento enzimático con enzimas xilanasas.	85
Figura 3. 19 Actividad y azúcares producidos durante el tratamiento enzimático con enzimas pectinasas.	85

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. 1 Comparación entre FES y FML para la producción de enzimas	23
Tabla 3. 1 análisis fisicoquímico.....	57
Tabla 3. 2 Composición química proximal del bagazo de manzana variedad <i>Pyrus malus</i>	59
Tabla 3. 3 Composición química del bagazo de manzana	62
Tabla 3. 4 Porcentaje en peso de los elementos presentes en el bagazo de manzana	68
Tabla 3. 5 Diseño experimental.....	70
Tabla 3. 6 Actividades específicas de las enzimas extracelulares de <i>pleurotus ostreatus</i> inoculado en bagazo de manzana.....	78

Resumen

En este proyecto de investigación, se recolectó bagazo de manzana proveniente de la industria sidrera, el cual se caracterizó fisicoquímica y composicionalmente con diferentes técnicas de la AOAC, la muestra también se analizó estructuralmente utilizando las técnicas de microscopía electrónica de barrido y difracción de rayos X.

Posteriormente se utilizó el bagazo de manzana como sustrato para el crecimiento del hongo *Pleurotus ostreatus*, donde se determinó que es capaz de crecer exitosamente en dicho sustrato ajustando el pH, sin ser necesaria la adición de ningún material de soporte. Después se procedió a extraer las enzimas extracelulares producidas por el hongo (xilanasas, celulasas y pectinasas) mediante buffers de citratos pH 5.3 y 4.8, y buffer de acetatos pH 4.8 respectivamente, cada tercer día, durante un mes.

Se encontró la mayor actividad de las tres enzimas a la mitad de fermentación siendo las celulasas las de mayor rendimiento, no obstante, estas fueron las que presentaron menor especificidad, puesto que las enzimas xilanasas fueron las de mayor actividad específica.

Para realizar el tratamiento enzimático se aplicaron los extractos de los días de mayor actividad de las enzimas extracelulares sobre el bagazo de manzana, durante este se observó que la lignina fue el componente con mayor degradación, seguido de la hemicelulosa, y la celulosa presentó una mayor degradación por las enzimas celulasas. Durante el tratamiento también se midió la actividad enzimática cada 5 días, así como los azúcares producidos y se comprobó que cuando las enzimas alcanzan la máxima velocidad de reacción, los azúcares se saturan y la actividad desciende.

Introducción

El bagazo de manzana es el principal subproducto agroindustrial de la producción de la industria de sidra y zumos. Actualmente las regiones de mayor potencial en México se ubican en los estados de Hidalgo, Puebla y Chihuahua. Particularmente en el Estado de Puebla existen un total de catorce empresas sin tomar en cuenta aquellas que no están registradas (Guía México, s. f.; Hernández, 2007). Tan solo las sidreras halladas en Zacatlán tienen un desecho que va de 240 a las 300 toneladas de residuo por año, este bagazo de manzana es tradicionalmente utilizado como abono o enviado a plantas que realizan compostaje a partir de materias vegetales. Otra gran parte es utilizado inadecuadamente en la alimentación animal y el resto, junto con buena parte de manzana residual se queda en la huerta sin ningún uso, lo que da origen a un problema de contaminación del medio ambiente por su alta velocidad de putrefacción (Bach *et al.*, 2004; UNIFRUT, 2007).

Este residuo debería considerarse subproducto de la industria con alto valor añadido, gracias a sus principales compuestos estructurales (celulosa, hemicelulosa y lignina), cuyas propiedades los hacen sustratos biotecnológicos (Howard *et al.*, 2003); pudiéndose utilizar para la producción de enzimas tales como las enzimas Hidrolasas ya que tienen uso potencial en diferentes industrias como la farmacéutica, ambiental, alimentaria, petroquímica, textil y papelera, estas enzimas permiten optimización del proceso, lo hacen más sencillo y obtienen un producto diferente o en mayor cantidad (Quintero *et al.*, 2006; Bommarius & Riebel, 2004).

En este contexto, está reportado que el hongo *Pleurotus ostratus*, posee la capacidad de degradar grandes polímeros que constituyen al sustrato vegetal, así como contaminantes ambientales mediante la secreción de complejos enzimáticos. La mayoría de las enzimas son producidas en medio líquido, pero en los últimos años se han desarrollado métodos no convencionales, como la fermentación en medio sólido esta tiene como ventajas: el uso de sustratos económicos, un rendimiento más alto, volúmenes de operación pequeños, baja demanda de agua y energía, y productividad volumétrica alta (Manjarres *et al.*, 2010; El-Bakry *et al.*, 2015).

Por tal motivo, en este trabajo de investigación se utilizó el bagazo de manzana que es una fuente lignocelulósica obtenido a partir del proceso de sidra, para la producción en estado sólido de enzimas hidrolasas extracelulares del hongo *Pleurotus ostratus*.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Producir enzimas hidrolasas por fermentación sólida del hongo *Pleurotus ostreatus* y el bagazo de manzana como sustrato.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar fisicoquímica, composicional y estructuralmente los residuos del bagazo de manzana.
- Inocular el hongo *Pleurotus ostreatus* en el bagazo de manzana para realizar la fermentación sólida, determinando las mejores condiciones de cultivo: pH, porcentaje de humedad, concentración de sustrato y tiempo de inoculación.
- Cuantificar la actividad enzimática y actividad específica de las enzimas hidrolasas producidas por la fermentación sólida.

CAPÍTULO 1.

ANTECEDENTES

1.1 RESIDUOS AGROINDUSTRIALES

Los residuos agroindustriales son materiales en estado sólido o líquido que se generan a partir del consumo directo de productos primarios o de su industrialización y no son de utilidad para el proceso que los generó, pero pueden ser aprovechados o transformados para generar otro producto con valor económico, de interés comercial y/o social. Se tiene registrado que en México se generan cerca de 76 millones de toneladas de residuos de frutas y vegetales al año (Valdéz-Vázquez *et al.*, 2010). Particularmente en el estado de Puebla la industria sidrera produce alrededor de 300 toneladas anuales de residuo de manzana (Bach *et al.*, 2004; Guevara, 2007).

Lamentablemente, cuando estos residuos no son reutilizados se convierten en un problema de contaminación ambiental, debido a que la mayor parte de éstos se elimina usualmente mediante la quema de biomasa lo que conlleva al desprendimiento de gases de efecto invernadero (El Hage, R *et al.*, 2010; Howard *et al.*, 2003).

Por lo que, en los últimos años se ha buscado aprovechar estos residuos, sin embargo, para esto es necesario la caracterización y conocer su composición, ya que esto determina la calidad de sus componentes y la cantidad que se genera, debido a que las características de estos es muy variada, además, dependerá de la materia prima y del proceso que los generó; no obstante, comparten una característica principal que es el contenido de materia orgánica, constituida principalmente por celulosa, lignina, hemicelulosa y pectina (El Hage, R *et al.*, 2010). Debido a lo anterior, dependiendo de su composición y caracterización se elegirán las tecnologías más apropiadas para su aprovechamiento y posterior tratamiento.

1.1.1 Bagazo de manzana proveniente de la industria sidrera

El termino de sidra se aplica generalmente a la bebida producida mediante la fermentación de jugo de manzana (*Malus pumila*) como materia prima. En Puebla existen varias regiones dedicadas a la producción de sidra de manzana, tales como:

Zacatlán, Chignahuapan, Huejotzingo y sus alrededores; siendo un total de catorce empresas, sin tomar en cuenta aquellas que no están registradas (Guía México, s. f.; Hernández, 2007).

El proceso de elaboración de sidra comienza con la recolección de las manzanas, realizado durante los meses de octubre y noviembre, la elección de los frutos se hace dependiendo del grado de maduración, para posteriormente, seleccionar y eliminar las manzanas demasiado maduras. Una vez que las manzanas han sido seleccionadas y lavadas entran a la trituradora donde se procede a reventar las células que contienen el jugo obteniendo el mosto de la pulpa de la manzana con el fin de facilitar su posterior prensado, el mosto pasa a un enfriamiento a 5°C aproximadamente con el objetivo de clarificarlo, esto permite que las partículas sólidas suspendidas en el líquido se agrupen y gracias a la gravedad sedimenten en el fondo del depósito, eliminando también partículas no deseadas, esta etapa suele durar entre 12 y 24 horas, consiguiendo de esta forma la limpieza y aclaramiento del zumo (Mangas, 1992).

El mosto previamente enfriado, se transporta por medio de bombas a los toneles en donde se lleva a cabo la fermentación, la cual está dividida en dos partes. La primera es la fermentación tumultuosa que dura entre 15 y 30 días en esta etapa la levadura de la manzana transforma el azúcar en alcohol para lo que es necesario el oxígeno. La segunda fermentación es la silenciosa y se realiza en condiciones anaerobias por lo que la barrica se cierra; en este periodo los restos se depositan en el fondo del barril. Pasados unos dos meses la sidra está dispuesta para ser bebida (Mangas, 1992; Bump, V, 1989)

Este proceso al igual que muchos otros, conlleva a la generación de residuos, como manzanas defectuosas o muy maduras (que no pasa por la prensa durante el proceso de selección), cáscara y pulpa que queda de la extracción del mosto de manzana, el sedimento de las lías de decantación del mosto y la de las lías de decantación de sidra, llamado bagazo de manzana (Berriak, 2017.).

Las sidreras ubicadas en Zacatlán fabrican alrededor de 400 mil unidades de sidra y emplean cerca de 1200 a 1600 toneladas de manzana anuales y se calcula que se obtienen 20 Kg de subproducto por cada 100 Kg de manzana que entra al proceso, esto equivaldría a un desecho que va de las 240 a las 300 toneladas de residuo anuales, sin contar lo originado por las otras sidreras (Guevara, 2007).

A pesar del creciente interés que existe en la utilización de los residuos orgánicos, específicamente, de aquellos que resultan durante la elaboración de la sidra de manzana, muchos de estos son desechados o en el mejor de los casos utilizado como pienso para animales, como abono o enviados a plantas que realizan compostaje a partir de materias vegetales; no obstante, esto no aporta un gran valor agregado, ya que los ganaderos solamente pueden contar con este alimento durante unas pocas semanas del año, aunado a que el resto del bagazo junto con buena parte de manzana residual se queda en la huerta sin ninguna utilización, lo que da origen a un problema de contaminación del medio ambiente por su alta velocidad de putrefacción debido a la gran cantidad de azúcares que contiene, continua con procesos de fermentación (Bach *et al.*, 2004; UNIFRUT, 2007).

Por otro lado, el bagazo de manzana tiene un alto contenido de humedad (70-80%), y se sabe que este bagazo junto con el de pera tienen el contenido de fibra dietética más alto de todas las frutas, además, la pectina, la celulosa y hemicelulosa constituyen la mayor parte de los polisacáridos del bagazo de manzana. Resultando en que, la composición química de este residuo es fibra (33 a 35.9%) constituida por pectina (3.7-6%), hemicelulosa (4 – 4.7%), celulosa (17%) y lignina (9 %) (Wang, & Thomas, 1998), por esta razón, puede ser empleado como sustrato biotecnológico en las fermentaciones.

1.2 Componentes de los residuos lignocelulósicos

Los residuos agroindustriales como el bagazo de manzana son residuos denominados lignocelulósicos o biomasa lignocelulósica, ya que es material orgánico proveniente de plantas o frutas, estos residuos están compuestos por una pared celular que rodea el protoplasto delimitado externamente por la membrana plasmática.

La pared celular es una estructura altamente organizada, brinda rigidez protegiendo el contenido de la célula, no es rígida, ya que soporta las fuerzas osmóticas y el crecimiento de la célula. Está formada por una red tridimensional de microfibrillas de celulosa contenida en una matriz constituida por polisacáridos (Azcón & Talón 2003).

Estos polisacáridos están constituidos principalmente por celulosa, hemicelulosa, lignina y pectina; y el porcentaje de éstos depende de las diferentes funciones que realice la célula así como el residuo (Cowling & Kirt, 1976), pero por lo general, la celulosa que es un polisacárido insoluble representa el componente mayoritario, seguido de la hemicelulosa que está compuesta por distintos azúcares que forman cadenas cortas, con ramificaciones y poros en toda la pared celular, la lignina que es el tercer componente en orden de importancia de la pared celular encargada de dar dureza y resistencia a la célula, la pectina es la encargada de unir a las células vegetales ya que sirve como pegamento entre ellas. (Sjöström, 1981). En la Figura 1.1 se pueden observar los componentes de la pared celular (Robledo *et al.*, 2012).

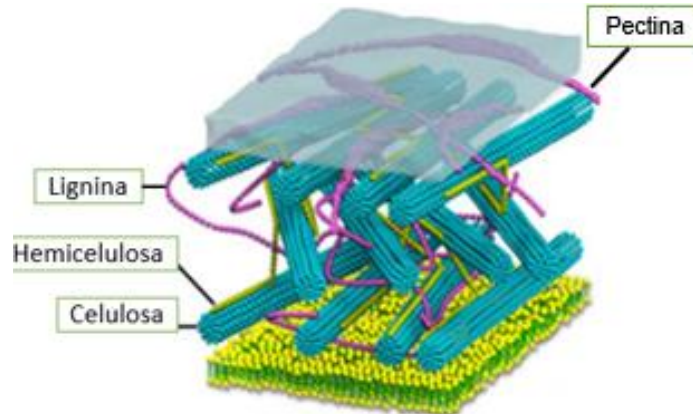


Figura 1. 1 Estructura de la pared celular

1.2.1 Celulosa

La celulosa $(C_6H_{10}O_5)_n$ es un biopolímero de la D-glucosa, es el material orgánico más abundante sobre la corteza terrestre (Gutiérrez-Rojas *et al.*, 2014) y la forma más común en la biomasa es el carbono (Romero *et al.*, 2009). Las plantas sintetizan la celulosa como material estructural para soportar su peso y ésta se encuentra como unidades submicroscópicas de forma alargada llamadas micelas que

están constituidas por unidades de β -glucosa, unidas entre sí por enlaces 1-4 (Figura 1.2.), donde la glucosa es un monosacárido de gran importancia durante la fermentación. Estas micelas se organizan en estructuras más grandes unidas por puentes de hidrógeno intermoleculares formando agregados llamados microfibrillas en su mayor parte cristalinos y otra amorfaos (Sánchez-Riaño *et al.*, 2010; Gutiérrez-Rojas *et al.*, 2014; Azcón, & Talón, 2003).

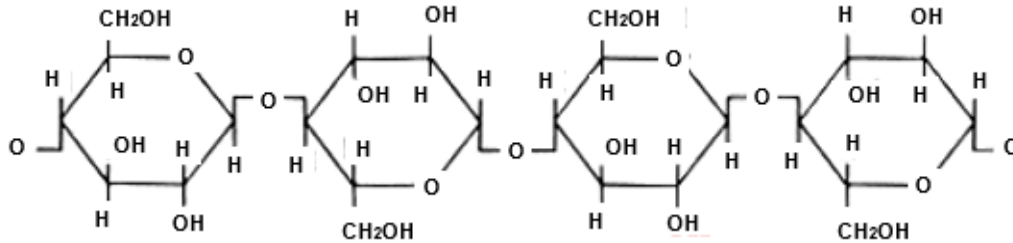


Figura 1. 2 Estructura de la celulosa con puentes de hidrogeno.

Entre las principales propiedades fisicoquímicas de la celulosa se encuentra el número de monómeros de azúcares del polímero, la cristalinidad y la porosidad (Sjöström, 1981; Fan *et al.*, 1982).

1.2.2 Hemicelulosa

Las hemicelulosas son estructuras aleatorias, amorfas de poca solidez, fácilmente hidrolizables en ácidos o bases diluidos. Son polisacáridos no celulósicos flexibles (xilanos, glucanos, galactanos, mananos, fructanos, xiloglucanos, glucomananos, arabinoxilanos, calosaglucanos), producidos por los dictiosomas que aparecen en las paredes celulares en forma amorfa. Las moléculas de hemicelulosa se unen a las superficies de las microfibrillas de celulosa, se entrelazan uniéndose y cristalizando para formar una compleja red estructural. Está constituido por un eje central de β (1 \rightarrow 4) glucano idéntico al de la celulosa, pero bastante más corto (Figura 1.3). A diferencia de ésta, gran parte de los restos de glucosa están unidos a restos de xilosa mediante un enlace glucosídico α (1 \rightarrow 6) (isomaltosa) (Sánchez-Riaño *et al.*, 2014; Azcón & Talón, 2003; Karp, 2009).

Debido a su complejidad estructural, se requiere de varias hidrolasas para degradar al xilano completamente. La enzima clave para este proceso, es la endo- β -(1,4)-xilanasas [EC 3.2.1.8], la cual fracciona los enlaces internos β -(1,4) en la cadena principal a residuos no modificados, generando diferentes xiloligosacáridos que se sustituyen en la longitud de cadena (Assamoi *et al.*, 2008; Gupta & Kar, 2008)

Además, se sabe que las xilanasas son las enzimas implicadas en la degradación de hemicelulosa, al igual que las celulasas, las xilanasas pueden actuar sinérgicamente logrando la hidrólisis, las enzimas predominantes dentro de este sistema son endo- β -(1,4)-xilanasas que atacan al polisacárido (columna vertebral) y β -xilosidasas, que hidrolizan xiloligosacáridos cortos a xilosa (Papinutti & Forchiassin, 2007).

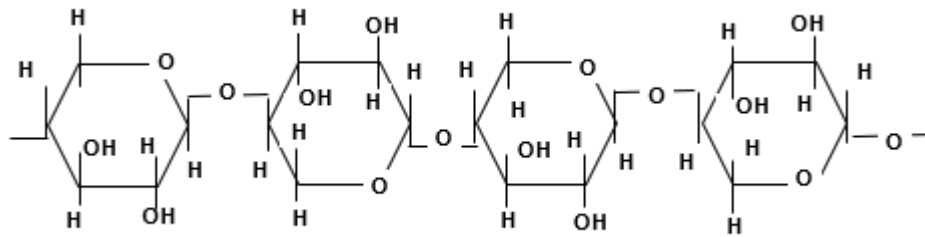


Figura 1. 3 Estructura de hemicelulosa

1.2.3 Lignina

La lignina, después de la celulosa, es el mayor componente de la biomasa lignocelulósica y la forma más abundante de material aromático en la biósfera. Es un compuesto insoluble en agua y amorfo, de alto peso molecular y tridimensional. Formada por unidades fenilpropano ligadas por diferentes tipos de enlaces alquil-aril-eter o carbono-carbono (Kellock, M *et al.*, 2017; Herruzo *et al.*, 1998). La estructura polimérica de la lignina no solo se entrelaza con las microfibrillas de celulosa, sino que también se une a las hemicelulosas y forma una red hidrófoba que rodea a los demás componentes de la pared, que le confiere mayor resistencia tanto física como química, además de una gran rigidez. Asimismo, protege a los carbohidratos fácilmente

degradables (celulosa y hemicelulosa) (Xu, *et al.*,2014; Azcón, & Talón, 2003). En la Figura 1.4 se puede observar la estructura parcial de la lignina (Flores-Herrera *et al.*, 2006).

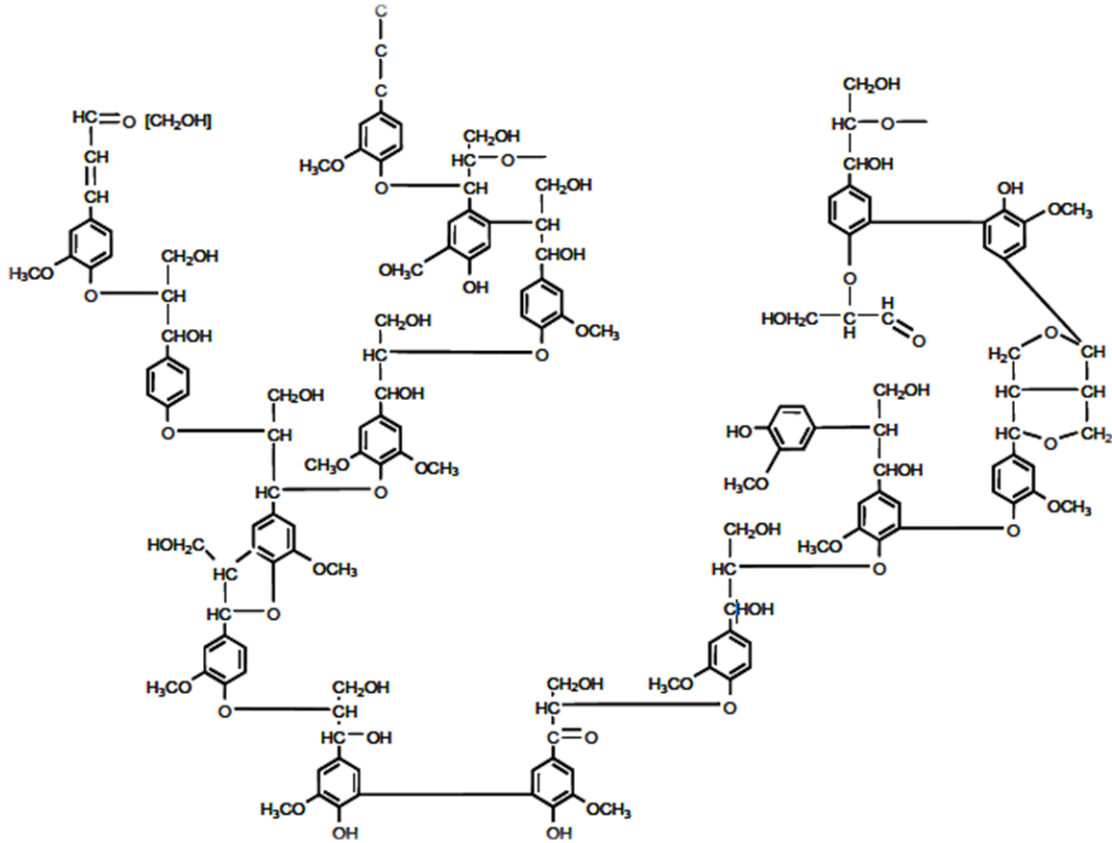


Figura 1. 4 Estructura parcial de la lignina.

De los tres componentes principales de la pared vegetal, la lignina es la más recalcitrante a la degradación y hasta el momento los únicos organismos capaces de mineralizarla eficientemente llevándola a CO₂ y H₂O como productos finales son los hongos de pudrición blanca, los cuales poseen un complejo de enzimas que catalizan durante las primeras reacciones, rompiendo uniones dentro de la molécula de lignina, generando moléculas más pequeñas, estos productos de degradación se incorporan a los ciclos metabólicos del organismo, originando como producto final CO₂ (Leonowicz *et al.*, 1999).

1.2.4 Pectina

La pectina es estructural y funcionalmente el polisacárido más complejo en las paredes celulares primarias de todas las plantas terrestres y abarca una gama de polisacáridos ricos en ácido galacturónico. Se cree que tres de los principales polisacáridos pécticos (homogalacturonano, ramnogalacturonano-I y ramnogalacturonano-II) (Willats, W. G et al., 2001).

La pectina interviene en las funciones de crecimiento, morfología, desarrollo y defensa de plantas; a su vez también sirve como un polímero gelificante y estabilizador en diversos alimentos y productos, tiene efectos positivos en la salud humana y múltiples usos biomédicos (Mohnen, 2008; Willats, et al., 2001). Las enzimas denominadas pectinasas, son las encargadas de degradar este polisacárido (Biz, A, 2016). La pectina está compuesta por una cadena lineal de restos de ácido α -(1,4)-D-galacturónico cuyos grupos carboxílicos se encuentran parcialmente metoxilados (Figura 1.5) (Bourgeois, S *et al.*, 2006)

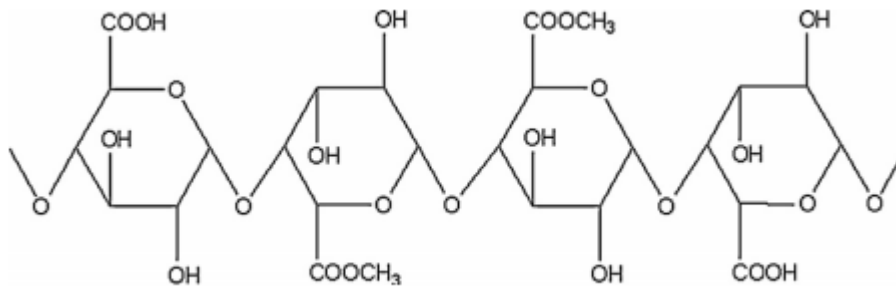


Figura 1. 5 Estructura química de la pectina

1.3 Hongos de pudrición blanca

Hongos de podredumbre blanca, denominados también hongos ligninolíticos, usan como sustrato a la lignina y lo transforma con un tono blanquecino; es decir, del color de la celulosa. Estos hongos incluyen varios cientos de especies de basidiomicetos (aproximadamente un 30% de este grupo) y unos pocos ascomicetos.

Este grupo de organismos ha sido muy estudiado debido a sus aplicaciones biotecnológicas (Kirk, 1987; Hatakka, 1994).

Se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, pueden vivir tanto en ambientes húmedos como secos, su temperatura óptima de crecimiento oscila entre 20 y 30°C. Tienen una función importante en la naturaleza ya que ayudan a la descomposición de la materia orgánica mediante la hidrólisis de sustratos por medio de su sistema enzimático, para posteriormente absorberlos a través de su fina pared celular (Archibald *et al.*, 1997). A diferencia de las levaduras y bacterias que requieren de una alta actividad de agua, los hongos no, ya que a bajos niveles pueden llevar a cabo su germinación; esta forma de crecimiento y su tolerancia a bajas actividades de agua hace que estos hongos sean el microbiota natural más adecuada para la fermentación en estado sólido.

Los hongos de la pudrición blanca se caracterizan por producir esporas de origen sexual sobre estructuras, llamadas basidios (Wilson *et al.*, 2004). El crecimiento de estos hongos es apical y la generación de nuevas hifas de ramificación se lleva a cabo de manera exponencial y como resultado se logra una alta velocidad de crecimiento, una gran capacidad de cubrir la superficie de cultivo y penetrar en el interior de la matriz sólida. A través de las puntas de las hifas las enzimas hidrolíticas son excretadas sin que se diluyan, como en el caso de la fermentación líquida, esto hace que la acción de estas enzimas sea más eficiente y permita entrar en los sustratos sólidos, esto a su vez aumenta la disponibilidad de nutrientes en su interior (Raimbault, 1998).

Dentro de los hongos de podredumbre blanca existen dos grupos, los que degradan simultáneamente la lignina y la celulosa, encontrando al *Phanerochaete chrysosporium* y los que preferentemente degradan la lignina (Kirk, 1971) donde podemos encontrar a los hongos de los géneros *Ganoderma* y *Pleurotus*. Este último presenta unas características más interesantes respecto a sus posibles aplicaciones biotecnológicas, ya que algunas de éstas requieren una deslignificación que no afecte de modo significativo a la celulosa, como por ejemplo en la obtención de fibras para la fabricación de papel y tejidos y la mejora de forraje para animales (Zadrazil, 1987; Ríos

& Eyzaguirre, 1992). Además, los hongos del género *Pleurotus* se pueden cultivar artificialmente y ocupan la tercera posición en la producción de Hongos comestibles (Bonatti, 2004).

1.3.1 *Pleurotus ostreatus*

Los hongos del género *Pleurotus* son basidiomicetos de pudrición blanca que pertenece a la subclase de microorganismos ligninolíticos (Darwish, et al.,2012). Dentro del género *Pleurotus* existen varias especies que frecuentemente son cultivadas en laboratorio, comercialmente y utilizadas en la investigación científica como son *P. ostreatus*, *P. djamor*, *P. abalonus*, *P. levis*, *P. citrinopileatus*, *P. cystidiosus*, *P. cornucopiaje*, *P. sacorcaju*. entre otras (Gaitán-Hernández et al., 2009).

Se ha reportado que el hongo *Pleurotus ostreatus* degrada lignina junto con la celulosa, permitiendo su cultivo sobre residuos agroindustriales con fines alimenticios, convirtiéndose en el tercer hongo cultivado más importante para propósitos alimentarios, ya que también es rico en proteínas, fibra, hidratos de carbono, vitaminas y minerales (Cohen & Hadar, 2002; Gaitán-Hernández et al., 2009). Se ha observado que el crecimiento de estos organismos es más fácil en los materiales solubles que en los intra e intercelulares de los tejidos vegetales, por lo que, la biomasa fúngica degrada primero a la celulosa y polímeros de lignina.

Estas especies tienen un rápido crecimiento de micelio, fructificación y un bajo costo de cultivo, que requieren una supervisión mínima del medio de cultivo debido a una fácil adaptación y mantenimiento (Bonatti, 2004; Ramos et al., 2011; Pokhrel et al., 2013), siendo posible su crecimiento en sustratos, tales como: avena, salvado, arroz, peras, pulpas de manzana y remolachas, etc.

El ciclo de vida de *Pleurotus ostreatus* inicia cuando las basidiosporas son liberadas, éstas germinan y dan origen a un micelio haploide, que al encontrarse con otro micelio compatible ocurre la plasmogamia o fusión de dos micelios monocariones

compatibles, para dar origen a un micelio dicarion o secundario, con dos núcleos haploides sexualmente compatibles. Bajo condiciones ambientales óptimas, el dicarion produce el primordio; posteriormente, se desarrolla el cuerpo fructífero para formar el píleo, el estípite y el himenio el cual está formado por múltiples láminas. En el himenio se lleva a cabo la cariogamia y la meiosis para la formación de los basidios y las basidiosporas y cuando las basidiosporas son liberadas y encuentran las condiciones adecuadas para su germinación, el ciclo de vida se reinicia (Raper, 1978), en la Figura 1.6 se puede observar el ciclo de vida de *Pleurotus ostreatus*.

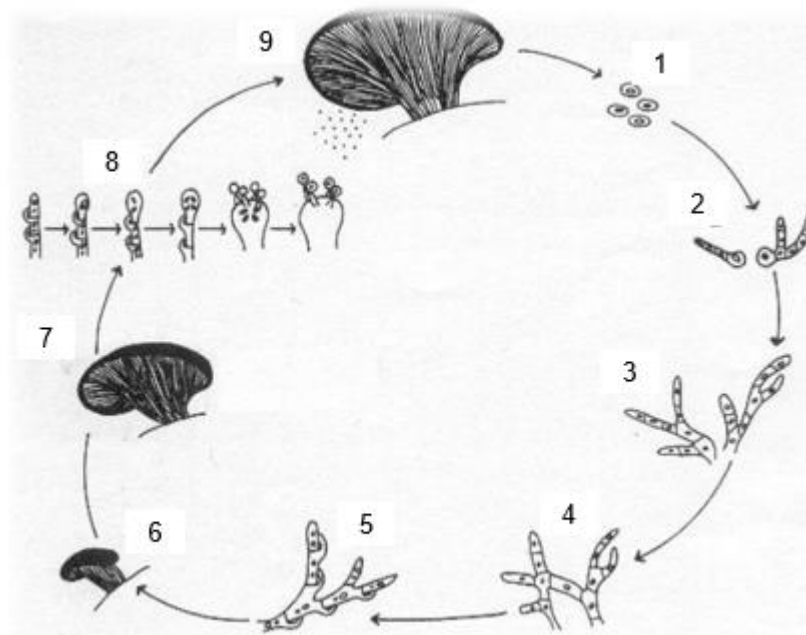


Figura 1. 6 Ciclo de vida de *Pleurotus ostreatus*.

1. Basidiosporas, 2. Germinación de basidiosporas, 3. Micelio monocarion, 4. Plasmogamia, 5. Dicarion, 6-7. Cuerpo fructífero. 8. Cariogamia y meiosis y 9. Liberación de basidiosporas.

Existen diversos factores que afectan el crecimiento del hongo y para cada uno de éstos existe un intervalo que delimita el punto máximo y mínimo bajo los cuales no habrá crecimiento. Los principales son: temperatura (25 y 33°C) para tener un óptimo crecimiento miceliar y su fructificación a 28°C. Humedad, este factor específicamente para *Pleurotus ostreatus* se ha observado que es mejor entre el 80-85% de humedad relativa para un crecimiento máximo del micelio. El pH adecuado para el crecimiento miceliar de *Pleurotus* oscila entre 6.0-7.0 y fructifica entre 6.5 y 7.0 (Pérez, B., 2006).

Como se mencionó anteriormente este hongo es un buen degradador de la materia de la pared vegetal, gracias a su capacidad de producir enzimas lignocelulolíticas extracelulares, oxidativas e hidrolíticas como son las lacasas, celulasas, xilanasas y pectinasas (Stajic *et al.*, 2006). El sistema de secreción de enzimas en los hongos filamentosos se encuentra principalmente en el ápice de las hifas (Bánfi *et al.*, 2015).

1.4 Enzimas extracelulares.

Las enzimas son proteínas cuya acción consiste en la catálisis de las reacciones químicas que tienen lugar en la célula. Son muy eficaces como catalizadores ya que son capaces de aumentar la velocidad de las reacciones químicas mucho más que cualquier catalizador artificial conocido, y además son altamente específicos ya que cada uno de ellos induce la transformación de un sólo tipo de sustancia (Wiseman & Sevillano, 1991; Krap, 1991).

La función principal de una enzima es rebajar el nivel de energía de activación para que tenga lugar una reacción química. La energía de activación es la cantidad de energía necesaria para inducir en una sustancia un estado de actividad. La enzima se combina con la sustancia llamada sustrato, induciéndole una situación transitoria que requiere una menor energía de activación, para que tenga lugar la reacción (Pelczar, 1984).

Las enzimas pueden ser: Enzimas extracelulares o exoenzimas (funcionan fuera de la célula) o enzimas intracelulares o endoenzimas (funcionan dentro de la

célula). Una ventaja de las enzimas extracelulares es que su recuperación es sencilla. Sin embargo, cuando las enzimas son producidas intracelularmente y es preciso romper las células para su extracción

Los residuos agroindustriales como el bagazo de manzana proveniente de la industria sidrera son excelentes sustratos para la producción de enzimas lignolíticas extracelulares tales como lacasa, manganeso peroxidasas, celulasas, xilanasas, pectinasas, lignina peroxidasa entre otras (Pandey *et al.*, 1999). Estas enzimas son generadas a partir del metabolismo de hongos filamentosos, los cuales tienen la capacidad de producirlas: por ejemplo, los hongos como *Pleurotus ostreatus* realiza una degradación externa de los nutrientes, ya que posee varios sistemas de enzimas lignocelulósicas las cuales secreta al medio extracelular a través de sus hifas transformando el sustrato en moléculas fácilmente degradables (Tien *et al.*, 1984; Moore-Landecker, 1996).

1.5.1 Enzimas hidrolasas

La degradación de los residuos lignocelulósicos se lleva a cabo en dos partes, la degradación de los polisacáridos y la de la lignina (aunque están relacionadas y la presencia de uno de los polímeros interfiere en la degradación del otro). Las vías de degradación de los polisacáridos son bastante bien conocidas desde hace tiempo y se llevan a cabo por enzimas hidrolasas (Leonowicz *et al.*, 1999).

Las enzimas hidrolasas son llamadas así porque catalizan la hidrólisis del enlace glucosídico entre 2 o más hidratos de carbono o entre éstos y una fracción que no sea un hidrato de carbono, es decir, estas enzimas catalizan la escisión de enlaces mediante la adición de agua, como: $A-B + H_2O \rightarrow A-OH + B-H$

Generalmente son producidas por hongos, bacterias, protozoos, plantas y animales (Gutiérrez-rojas *et al.*, 2014), así también la demanda creciente de estas enzimas ha impulsado la investigación de diferentes microorganismos lignocelulolíticos entre los cuales se encuentran los hongos del género *Pleurotus* que son una fuente principal de hidrolasas e incluyen a las celulasas, xilanasas y

pectinasas, estas enzimas degradan polisacáridos de la pared celular vegetal, como celulosas, hemicelulosas y pectinas. Las hidrolasas tienen una gran aplicación en la industria textil, en la de producción de zumos y extractos de frutas, de la pulpa y el papel y en la alimentaria (Álvarez-Cervantes *et al.*, 2016)

1.5.1.1 Xilanasas

La xilanasas (endo-1, 4- β -xilanasas) es una enzima importante a nivel industrial, ya que hidroliza xilano principal tipo de hemicelulosa, un polímero lineal de unidades β -D-xilopiranosilo unido por (1-4) enlaces glicosídicos, así las xilanasas son usadas para la bioconversión de sustratos lignocelulósicos que contienen xilano en azúcares mono y xiloligosacáridos (Anthony *et al.*, 2016). Estas enzimas son preferidas para la hidrólisis de xilano ya que presenta ciertas ventajas como ser altamente específicas, requieren una reacción leve y baja pérdida de sustrato (Tesfaw & Assefa, 2014). Se ha encontrado que muchas bacterias, actinomicetos, hongos filamentosos y levaduras producen xilanasas (Bajaj *et al.*, 2012). Las xilanasas fúngicas son las más importantes desde el punto de vista industrial debido a que sus actividades extracelulares son mucho mayores que las provenientes de levaduras y bacterias. Algunos de los productores de xilanasas más importantes incluyen *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Streptomyces*, *Phanerochaetes*, *Chytridiomycetes*, *Ruminococcus*, *Clostridia*, *Bacillus* y *Pleurotus* *Pleurotus ostreatus* el cual produce enzimas extracelulares, como xilanasas, celulasas y lacasas (Stajic *et al.*, 2006; Ahamed & Vermette, 2008; Anthony *et al.*, 2016).

. El interés en las enzimas ha aumentado en los últimos años debido a su potencial aplicación en biotecnología, se han estudiado por su importancia en varios procesos industriales, como la bioconversión de materiales lignocelulósicos en productos de fermentación, mejora de la digestibilidad de la materia prima animal, clarificación de los jugos, la extracción de café, aceites vegetales y almidón. La aplicación más efectiva de xilanasas es en la preblanqueo de la pulpa kraft para minimizar uso de productos químicos agresivos en el tratamiento de papel (Polizeli *et al.*, 2005; Beg *et al.*, 2001)

1.5.1.2 Celulasas

Las celulasas son enzimas que hidrolizan enlaces β -1,4 en las cadenas de celulosa y producen como producto primario glucosa. Los módulos de celulasas se han clasificado según sus secuencias de aminoácidos y cristales, Estos módulos que contienen las celulasas tienen enlace de carbohidratos no catalíticos y/u otros módulos funcionalmente conocidos o desconocidos, que se pueden situar en el extremo N o C del módulo catalizado. La hidrólisis de la celulosa es compleja, es medida por una combinación de los tres tipos principales de celulasas: endoglucanasas (EC 3.2.1.4), exoglucanasas, Incluyendo celobiohidrolasas (EC 3.2.1.91), y β -glucosidasa (EC 3.2.1.21) (Zhang & Zhang., 2013).

Los hongos son los principales productores de enzimas celulolíticas, por ejemplo, el *Aspergillus Nigerha* sido explotado en la industria para producir celulasas; sin embargo, para un alto rendimiento, la producción de celulasa requiere una sustancia inductora, que en la actualidad depende principalmente de sustratos insolubles resultado de la degradación de la lignocelulosa (Zhang *et al.*, 2017). En este concepto los hongos de pudrición blanca como se mencionó anteriormente tienen la capacidad de producir enzimas celulasas lignolíticas, mayormente producidas en fermentación sólida, utilizando como sustratos materiales lignocelulósicos, es muy interesante ya que su obtención a partir de celulosa pura es muy costosa, además se sabe que la actividad de las enzimas puede variar dependiendo el microorganismo y de la cepa utilizada, así como del sustrato, las condiciones de cultivo y el tiempo empleado para su producción (Nsereko *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2002)

Las celulasas son enzimas importantes ya que se pueden aplicar durante el procesamiento de alimentos (Ma & Mu, 2016). Además, su uso ha incrementado para una gran variedad de industrias, como la industria textil para obtener superficies modificadas y mejorar el aspecto de tejidos, también como aditivo en detergentes, en la industria del papel para el tratamiento de los desechos, mejorar la extracción y clarificación de jugos de frutas y vegetales, y mejorar la digestibilidad de los alimentos, además las celulasas al ser utilizadas con las xilanasas, son muy efectivas para las

xilanasas puede ser usadas para hidrolizar la biomasa lignocelulósica en la producción de bioetanol (Zhang & Zhang, 2013; Gutiérrez-rojas *et al.*, 2014; Beg *et al.*, 2001)

1.5.1.3 Pectinasas

Las pectinasas son un complejo enzimático cuyo sustrato son las sustancias pépticas, y son las encargadas de degradar a la pectina hasta sus compuestos monoméricos elementales. Las actividades enzimáticas que actúan sobre la cadena principal de la pectina comprenden a las hidrolasas, que actúan sobre los enlaces α -1,4-glicosídicos. Dado su modo de acción estas pueden ser del tipo endo, si actúan de manera aleatoria a lo largo de la cadena principal, o exo, si actúan sobre los finales no reductores de los poligalacturónidos. (Biz *et al.*, 2016).

Las pectinasas pueden tener distintas funciones, dependiendo del organismo que las produzca, estas enzimas son importantes para proveer al microorganismo los nutrientes a partir de los materiales de su medio ambiente (Martínez-Trujillo *et al.*, 2012).

Las enzimas pépticas se utilizan en la industria de alimentos, ya que la degradación de la pectina disminuye la viscosidad de los jugos, facilitando así procesos como clarificación, filtración y concentración de los extractos de frutas y vegetales. Así como en el tratamiento enzimático sobre la filtración del vino, la hidrólisis de pectina generalmente da como resultado de 2 a 5 veces mayor cantidad de vino filtrado durante un ciclo de filtración. Estas enzimas generalmente son producidas por plantas y microorganismos como los hongos, levaduras y bacteria, numerosas compañías producen comercialmente enzimas pépticas mediante fermentación en medio líquido (FML) o fermentación en estado sólido (FES), se sabe que la fermentación en estado sólido tiene el potencial de producir Pectinasas de bajo costo para biorrefinerías, pero es difícil controlar el proceso a grandes escalas (Lozano & López, 1975; Rodríguez-Fernández *et al.*, 2011).

1.6 Fermentación sólida

La fermentación en estado sólido (FES) se define como un proceso de fermentación en el que los microorganismos crecen en materiales sólidos sin la presencia de líquido, es decir, el sustrato debe tener ausencia o una presencia muy baja de ésta (Krishna, 2005). La FES, al ser una tecnología de bajo costo es ampliamente utilizada, su uso se ha extendido actualmente a la producción de compuestos de alto valor añadido como enzimas, ácidos orgánicos, biopesticidas, biocombustibles y saborizantes. Además, en los últimos años también se han desarrollado nuevas aplicaciones en el control medioambiental como la biorremediación y la biodegradación de compuestos peligrosos, en la detoxificación de residuos agroindustriales, entre otros (Pérez-Guerra *et al.*, 2003).

Las enzimas han generado gran demanda ya que tienen uso potencial en diferentes industrias, la mayoría de estas enzimas son mayormente producidas por medio líquido (FML) que presenta el beneficio de homogeneidad de los medios de cultivo utilizados y posibilidad de controlar los parámetros como temperatura y pH; Sin embargo, la FES presenta ciertas ventajas sobre la FML ya que permite la producción de enzimas con mayor actividad y estabilidad con menores demandas de agua y energía (Subramaniyam & Vimala, 2012; El-Bakri *et al.*, 2015). En la Tabla 1.1 se puede observar una comparación entre la FML y FES por factores que le afectan (El-Bakri, *et al.*, 2015).

Tabla 1. 1 Comparación entre FES y FML para la producción de enzimas

FACTOR	FES	FML
SUSTRATO	material sin costo(residuos)	Medios muy costosos
INOCULO	no es necesario	Esencial
CONDICIONES ASÉPTICAS	innecesario	Esencial
HUMEDAD	Ausencia de agua	se requieren medios líquidos
AGITACIÓN	muy difícil	Fácil
CONTROL DEL PROCESO(T,PH)	Difícil	Fácil
CONTAMINACIÓN	Poco riesgo	Alto riesgo
RENDIMIENTO ENZIMATICO	Muy alto	Bajo
RESIDUOS LIQUIDOS	No producido	Cantidades elevadas
VOLUMEN Y COSTOS DE EQUIPOS	Pequeños reactores, bajo costo	Reactores a gran escala, costos muy altos

A diferencia de otros microorganismos, los hongos normalmente crecen en la naturaleza sobre sustratos sólidos tales como trozos de madera, semillas, tallos, raíces y partes secas de animales, como piel, huesos y materia fecal (Bhargav *et al.*, 2008). Los residuos agroindustriales se pueden utilizar como sustratos ideales para la fermentación, debido a su rico contenido de componentes orgánicos, se consideran fuentes esenciales de carbono, nitrógeno y muchos micronutrientes que son importantes para la producción de metabolitos (El-Bakry *et al.*,2015).

Por estas razones, para la obtención de enzimas por hongos es más conveniente utilizar la FES ya que el bajo nivel de actividad de agua favorece la germinación y el crecimiento micelar de los hongos; además, esta forma de crecimiento, su tolerancia a bajas actividades de agua y condiciones de baja

osmolaridad hacen que estos microorganismos sean los más adecuados para este tipo de fermentación (Vazquez-Venegas., 2013).

1.7 Pretratamiento

El objetivo del tratamiento previo a los residuos agroindustriales es descomponer la estructura de la lignina, mejorando la digestibilidad de la celulosa durante la etapa de hidrólisis, paso esencial para obtener azúcares fermentables (Mosier *et al.*, 2005; Alvira *et al.*, 2010). En la Figura 1.7 se puede observar el efecto del pretratamiento en el material lignocelulósico (Mosier *et al.*, 2005).



Figura 1. 7 Efecto del pretratamiento

Existen tres tipos de pretratamientos: físicos, químicos y biológicos, donde cada pretratamiento tiene un efecto específico sobre la celulosa, la hemicelulosa y la fracción de lignina; por lo tanto, se deben elegir diferentes métodos y condiciones de pretratamiento de acuerdo a lo que se requiera (Alvira *et al.*, 2010; Shaoni *et al.*, 2016)

- Pretratamiento Físico: pretende disminuir el tamaño de partícula y cristalinidad del residuo lignocelulósico con el fin de aumentar el área

específica y reduce el grado de polimerización con métodos como la trituración, procesos hidrotérmicos, exposición de vapor, etc.

Este tipo de pretratamiento incrementa el área específica y disminuye el tiempo de digestión, sin embargo, este proceso no es económicamente factible ya que requiere grandes cantidades de energía, lo que aumenta el costo, y no disipa completamente la energía (Kumar *et al.*, 2009; Shaoni *et al.*, 2016).

- Pretratamiento químico: se utilizan para eliminar el contenido de lignina de los residuos agroindustriales mediante la hidrólisis alcalina, acida o mediante solventes orgánicos, este pretratamiento presenta una gran eliminación de lignina y altos rendimientos de hidrólisis; sin embargo, presenta altos costos para maquinaria resistente a la corrosión, así como los lavados requeridos para eliminar las sustancias químicas, la recuperación y manejo de las mismas (Kumar *et al.*, 2009; nee'Nigam *et al.*, 2009).
- Pretratamiento biológico: se emplean microorganismos o enzimas para pretratar residuos agroindustriales, capaces de degradar lignina, celulosa y hemicelulosa. Los microorganismos como el moho marrón, blanco y de pudrición blanda tienen a ser utilizados para esta degradación selectiva de lignina y hemicelulosa. El pretratamiento biológico tiene muchas ventajas, tales como menos consumo de energía, no hay manejo de químicos y condiciones templadas del mismo, no obstante, para llevarse a cabo se requiere de un tiempo mayor al de los pretramientos físicos y químicos (nee'Nigam *et al.*, 2009; Shaoni *et al.*, 2016)

Dentro de los microorganismos ampliamente utilizados se encuentran los hongos de pudredumbre blanca como *Phanerochaete cryso sporium*, *Ceriporia lacerata*, *Cyathus stercoletus*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Pycnoporus cinnabarinus* y *Pleurotus ostreatus* se han utilizado para pretratar diferentes materiales

lignocelulósicos que a través de sus enzimas modifican tanto la celulosa como la lignina por lo que son más eficientes para la degradación. Hatakka *et al.*, (1983), realizaron un pretratamiento biológico en la paja de arroz utilizando 19 especies de hongos de pudrición blanca y encontraron que en la paja de arroz pretratada con *Pleurotus ostreatus* presentó una degradación de 41% de la lignina, el 17% de la celulosa y 48% de hemicelulosas encontrando que el 35% de la paja se convirtió en azúcares reductores en 5 semanas (Kumar *et al.*, 2009; nee'Nigam *et al.*, 2009).

Bibliografía: capítulo 1

- Ahamed, A., & Vermette, P. (2008). Culture-based strategies to enhance cellulase enzyme production from *Trichoderma reesei* RUT-C30 in bioreactor culture conditions. *Biochemical Engineering Journal*, 40(3), 399-407
- Álvarez-Cervantes, J., Sánchez, C., Díaz, R., & Díaz-Godínez, G. (2016). Characterization of production of laccases, cellulases and xylanases of *Pleurotus ostreatus* grown on solid-state fermentation using an inert support. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 15(2)
- Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M. J., & Negro, M. J. (2010). Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. *Bioresource technology*, 101(13), 4851-4861.
- Amorim, G. M., Oliveira, A. C., Gutarra, M. L., Godoy, M. G., & Freire, D. M. (2017). Solid-state fermentation as a tool for methylxanthine reduction and simultaneous xylanase production in cocoa meal. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 11, 34-41
- Anthony, P., Harish, B. S., Jampala, P., Ramanujam, S., & Uppuluri, K. B. (2016). Statistical optimization, purification and applications of xylanase produced from mixed bacteria in a solid liquid fermentation using *Prosopis juliflora*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 8, 213-220
- Archibald, F. S., Bourbonnais, R., Jurasek, L., Paice, M. G., & Reid, I. D. (1997). Kraft pulp bleaching and delignification by *trametes versicolor*. *Journal of Biotechnology*, 53(2), 215-236.
- Assamoi, A. A., Destain, J., Delvigne, F., Lognay, G., & Thonart, P. (2007). Solid-state Fermentation of Xylanase from *Penicillium canescens* 10-10c in a Multi-layer-packed Bed Reactor. In *Biotechnology for Fuels and Chemicals* (pp. 87-98). Humana Press

- Azcón-Bieto, J., & Talón, M. (2003). *Fundamentos de fisiología vegetal*. McGrawHill (2nd ed.) 522.
- Bach, A., Calsamiglia, S. & Ferret, A. (2004). *Pulpa de manzana, Silo*. Recuperado el 4 de marzo de 2017, del sitio Web de Fundación Española para el DesarrolloNutricional Animla (FEDNA): http://www.fundacionfedna.org/subproductos_fibrosos_humedos/pulpa-de-manzana-silo
- Bajaj, B. K., Khajuria, Y. P., & Singh, V. P. (2012). Agricultural residues as potential substrates for production of xylanase from alkali-thermotolerant bacterial isolate. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 1(4), 314-320
- Beg, Q. K., Kapoor, M., Mahajan, L., & Hoondal, G. S. (2001). Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56(3–4), 326–338.
- Berriak, R. J. Azti investiga la forma de dar valor a los residuos procedentes de la elaboración de la sidra. Berriak noticias. Recuperado el 1 de Junio de 2017 de: http://www.nasdap.ejgv.euskadi.net/r50-7393/es/contenidos/boletin_revista/sustrai_76/es_agripes/adjuntos/76_28_29_c.pdf
- Bhargav, S., Panda, B. P., Ali, M., & Javed, S. (2008). Solid-state fermentation systems-an overview. *Critical Reviews in Biotechnology*, 25(1–2), 1–30.
- Bhargav, S., Panda, B. P., Ali, M., & Javed, S. (2008). Solid-state fermentation systems-an overview. *Critical Reviews in Biotechnology*, 25(1–2), 1–30.
- Biz, A., Finkler, A. T. J., Pitol, L. O., Medina, B. S., Krieger, N., & Mitchell, D. A. (2016). Production of pectinases by solid-state fermentation of a mixture of citrus waste and sugarcane bagasse in a pilot-scale packed-bed bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, 111, 54-62.
- Bourgeois, S., Gernet, M., Pradeau, D., Andremont, A., & Fattal, E. (2006). Evaluation of critical formulation parameters influencing the bioactivity of β -lactamases

- entrapped in pectin beads. *International journal of pharmaceutics*, 324(1), 2-9.
- Bump V. (1989). Apple pressing and juice extraction. En: processed apple products. Downing D.L.(Ed) van Nostrand reinhold, NY, 53-80.
- Carnicero, A., Trojanowski, J., Falcón, M. A., De la Fuente, G., Kharazipour, A., & Hüttermann, A. (1992). Lignin degrading capacities of several Fungi Imperfecti isolated from soils tested by the radiorespirometric method. *Microbios*, 72(290), 17-25.
- Cohen, R., Persky, L., & Hadar, Y. (2002). Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Applied microbiology and biotechnology*, 58(5), 582-594.
- Conn E., Stumpf P., Bruening G., Doi R. Bioquímica Fundamental. Mexico: Limus, 2001.
- Cowling, E. B., & Kirk, T. K. (1976). Properties of cellulose and lignocellulosic materials as substrates for enzymatic conversion processes. In *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 6, 95-123.
- Darwish, G. A., Bakr, A. A., & Abdallah, M. M. F. (2012). Nutritional value upgrading of maize stalk by using *Pleurotus ostreatus* and *Saccharomyces cerevisiae* in solid state fermentation. *Annals of Agricultural Sciences*, 57(1), 47-51.
- El Hage, R., Chrusciel, L., Desharnais, L., & Brosse, N. (2010). Effect of autohydrolysis of *Miscanthus x giganteus* on lignin structure and organosolv delignification. *Bioresource technology*, 101(23), 9321-9329.
- El-Bakry M., Abraham J., Cerda A., Barrena R., Ponsá S., Gea T. & Sánchez A. (2015). From wastes to high value added products: novel aspects of ssf in the production of enzymes. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 45(18), 1999-2042

- Fan, L. T., Lee, Y. H., & Gharpuray, M. M. (1982). The nature of lignocellulosics and their pretreatments for enzymatic hydrolysis. In *Microbial reactions* (pp. 157-187). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Flores Herrera, O., Rendón Huerta, E., & Velázquez López, I. (2006). Enzimas ligninolíticas fúngicas para fines ambientales. *Mensaje Bioquímico*, 30.
- Gaitán-Hernández, R., Salmones, D., Pérez Merlo, R., & Mata, G. (2009). Evaluación de la eficiencia biológica de cepas de *Pleurotus pulmonarius* en paja de cebada fermentada. *Revista mexicana de micología*, 30, 63-71
- Guevara, C. (2007). *La industria sidrera en Puebla*. Recuperado el 12 de Mayo de 2017, del sitio Web de El Sol de Puebla: línea <http://www.oem.com.mx/esto/notas/n533597.htm>
- Guía México (s. f.). *Elaboración de sidra en Puebla*. Recuperado el 12 de Mayo de 2017, de <http://guia-puebla.guiamexico.com.mx/elaboracion-de-sidra/puebla/empresas-guia.html>
- Gutiérrez-rojas, I., Moreno-sarmiento, N., & Montoya, D. (2014). Mecanismos y regulación de la hidrólisis enzimática de celulosa en hongos filamentosos: casos clásicos y nuevos modelos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 32(1), 1-12.
- Hatakka, A. (1994). Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role from in lignin degradation. *FEMS microbiology reviews*, 13(2-3), 125-135.
- Hernández, E. (2007). *Mucha sidra... Sólo Zacatlán producirá 400 mil botellas*. Recuperado el 12 de Mayo de 2014, del sitio Web de El Sol de Puebla: <http://www.oem.com.mx/esto/notas/n533547.htm>
- Herruzo, F. G., Jiménez, F. M., & Jiménez, J. R. (1984). Posibilidades de aprovechamiento de la lignina en la industria química. *Ingeniería química*, (187), 249-254.
- Howard, R. L., Abotsi, E., Van Rensburg, E. J., & Howard, S. (2003). Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *African Journal*

of Biotechnology, 2(12), 602-619.

- Karp, G. (2011). *Biología celular y molecular: conceptos y experimentos (6a)*. McGraw Hill Mexico.
- Kellock, M., Rahikainen, J., Marjamaa, K., & Kruus, K. (2017). Lignin-derived inhibition of monocomponent cellulases and a xylanase in the hydrolysis of lignocellulosics. *Bioresource Technology*, 232, 183-191.
- Kirk, T. K., & Farrell, R. L. (1987). Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. *Annual Reviews in Microbiology*, 41(1), 465-501.
- Kirk, T.K. (1987). Lignin-degrading enzymes. *Phil. Trans. Roy. Soc.* 321: 461-474.
- Krishna, C. (1999). Production of bacterial cellulases by solid state bioprocessing of banana wastes. *Bioresource Technology*, 69(3), 231–239.
- Krishna, C. (2005). Solid-State fermentation systems an overview. *critical Reviews in Biotechnology*, 25(1), 1–30.
- Kumar, P., Barrett, D. M., Delwiche, M. J., & Stroeve, P. (2009). Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Industrial & engineering chemistry research*, 48(8), 3713-3729.
- Leonowicz, A., Matuszewska, A., Luterek, J., Ziegenhagen, D., Wojtaś-Wasilewska, M., Cho, N. S., ... & Rogalski, J. (1999). Biodegradation of lignin by white rot fungi. *Fungal genetics and biology*, 27(2-3), 175-185.
- Ma, M., & Mu, T. (2016). Modification of deoiled cumin dietary fiber with laccase and cellulase under high hydrostatic pressure. *Carbohydrate polymers*, 136, 87-94.
- Mangas J.J. (1992) Maduración de la Manzana y tecnología de elaboración de zumos y sidras. Tesis Doctoral, Departamento de Química-Física y analítica. Universidad de Oviedo.
- Martínez-Trujillo, A., Aranda, J. S., & Aguilar-Osorio, G. (2012). Producción de Pectinasas por *Aspergillus flavipes* FP-500 en cultivo alimentado. *BioTecnología*, 16(2), 47–66.

- Mohnen, D. (2008). Pectin structure and biosynthesis. *Current opinion in plant biology*, 11(3), 266-277.
- Moore-Landecker, E. (1996). *Fundamentals of the fungi*. 4th ed. Prentice-Hall, Inc. New Jersey.
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y. Y., Holtzapple, M., & Ladisch, M. (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource technology*, 96(6), 673-686.
- nee'Nigam, P. S., Gupta, N., & Anthwal, A. (2009). Pre-treatment of agro-industrial residues. In *Biotechnology for agro-industrial residues utilisation* (pp. 13-33). Springer, Dordrecht.
- Pandey, A., Selvakumar, P., Soccol, C. R., & Nigam, P. (1999). Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current science*, 149-162.
- Papinutti, V. L., & Forchiassin, F. (2007). Lignocellulolytic enzymes from *Fomes sclerodermeus* growing in solid-state fermentation. *Journal of Food Engineering*, 81(1), 54-59.
- Pelczar, J. (1984). Elementos de microbiologia. Editorial Mc Graw Hill, Enzimas (pp. 235-273). México.
- Perez, B. (2006) descripción de las características macroscópicas del cultivo invitro de cepas de *Pleurotus* aisladas en Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de ciencias químicas y farmacia, 11-14.
- Pérez-Guerra, N., Torrado-Agrasar, A., López-Macias, C., & Pastrana, L. (2003). Main characteristics and applications of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 2(3).
- Pokhrel, C. P., Kalyan, N., Budathoki, U., & Yadav, R. K. P. (2013). Cultivation of *Pleurotus sajor-caju* using different agricultural residues. *International Journal of Agricultural Policy and Research*, 1, 19–23.
- Polizeli, M. L. T. M., Rizzatti, A. C. S., Monti, R., Terenzi, H. F., Jorge, J. A., & Amorim, D. S. (2005). Xylanases from fungi: Properties and industrial applications.

Applied Microbiology and Biotechnology, 67(5), 577–591.

Quintero, D., Juan, C., Feijoo, C., Lema, R., & Juan, M. (2006). Producción de enzimas ligninolíticas con hongos basidiomicetos cultivados sobre materiales lignocelulósicos. *Vitae (Medellín)*, 13(2), 61-67

Raimbault, M. (1998). General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*, 1(3), 26-27.

Raper, C. 1978. Sexuality and Breeding. In: The biology and cultivation of edible mushrooms. (Chang, S.T. y Hayes, W.A. Eds.) Academic, Press. Nueva York. pp. 83-117.

Ríos, S., & Eyzaguirre, J. (1992). Conditions for selective degradation of lignin by the fungus *Ganoderma australis*. *Applied microbiology and biotechnology*, 37(5), 667-669.

Rodríguez-Fernández, D. E., Rodríguez-León, J. A., De Carvalho, J. C., Sturm, W., & Soccol, C. R. (2011). The behavior of kinetic parameters in production of pectinase and xylanase by solid-state fermentation. *Bioresource technology*, 102(22), 10657-10662.

Sánchez Riaño, A. M., Rivera Barrero, C. A., & Murillo Perea E. (2010). Perspectivas de uso de subproductos agroindustriales para la producción de bioetanol. *Revista Tumbaga* 17(46)

Saval, S. (2012). Aprovechamiento de Residuos Agroindustriales: Pasado, Presente y Futuro. *BioTecnología*, 16(2), 14–46.

Shaoni S, Shaolong S, Xuefei C, & Runcang Sun. (2016). The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. *Bioresource technology*, 199, 49-58.

Sjöström, E(1981) Wood Chemistry. Fundamentals and Applications. Academic Press. London 15-50.

Stajic, M., Persky, L., Friesem, D., Hadar, Y., Wasser, SP., Nevo, E. and Vukojevic, J.

- (2006). Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected *Pleurotus* species. *Enzyme and Microbiology Technology* 38, 65-73
- Tesfaw, A., & Assefa, F. (2014). Co-culture: A great promising method in single cell protein production. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, 9(2), 12-20.
- Tien, M., & Kirk, T. K. (1984). Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(8), 2280-2284.
- Valdez-Vazquez, I., Acevedo-Benítez, J. A., & Hernández-Santiago, C. (2010). Distribution and potential of bioenergy resources from agricultural activities in Mexico. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(7), 2147–2153
- Vásquez Vanegas, A. M. (2013). *Producción de xilanasas por aspergillus sp: en fermentación sumergida y fermentación en medio sólido* (Master's thesis, Universidad Iberoamericana Ciudad de México. Departamento de Ingeniería y Ciencias Químicas).
- Wang, H. J., & Thomas, R. L. (1989). Direct use of apple pomace in bakery products. *Journal of Food Science*, 54(3), 618-620.
- Willats, W. G., McCartney, L., Mackie, W., & Knox, J. P. (2001). Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant molecular biology*, 47(1-2), 9-27
- Wilson, U., Arias, M., Restrepo, D. P., & Cardona, F. (2004). Utilización de los hongos de la pudrición blanca en la biodegradación de contaminantes orgánicos. *BioTecnología*, 9(1), 8–17.
- Wiseman, A., & Sevillano Calvo, E. (1991). *Manual de Biotecnología de los Enzimas* (No. 577.2. 08). Acribia.
- Xu, C., Arneil, R., Arancon, D., Labidi, J., & Luque, R. (2014). Lignin depolymerisation strategies: towards valuable chemicals and fuels. *Chem. Soc. Rev. Chem. Soc. Rev*, 43(43), 7485–7500.

- Zadržil, F., Grinbergs, J., & González, A. (1982). "Palo Podrido" decomposed wood used as feed. *European journal of applied microbiology and biotechnology*, 15(3), 167-171
- Zhang, J. G., Li, Q. M., Thakur, K., Faisal, S., & Wei, Z. J. (2017). A possible water-soluble inducer for synthesis of cellulase in *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, 226, 262-266.
- Zhang, X., & Zhang, Y. P. (2013). Cellulases: Characteristics, Sources, Production , and Applications. *Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers*, 1, 131–146.

Capítulo 2: Metodología

Las siguientes secciones están divididas en tres partes; acondicionamiento y caracterización del bagazo de manzana, fermentación en estado sólido del bagazo e inoculación de *Pleurotus ostreatus* y obtención de extracto enzimático evaluando la actividad enzimática y el pretratamiento biológico del bagazo de manzana.

2.1 Acondicionamiento y caracterización del bagazo de manzana.

En la Figura 2.1 se muestra el diagrama empleado para la etapa 1, que conlleva acondicionamiento y caracterización del bagazo de manzana.

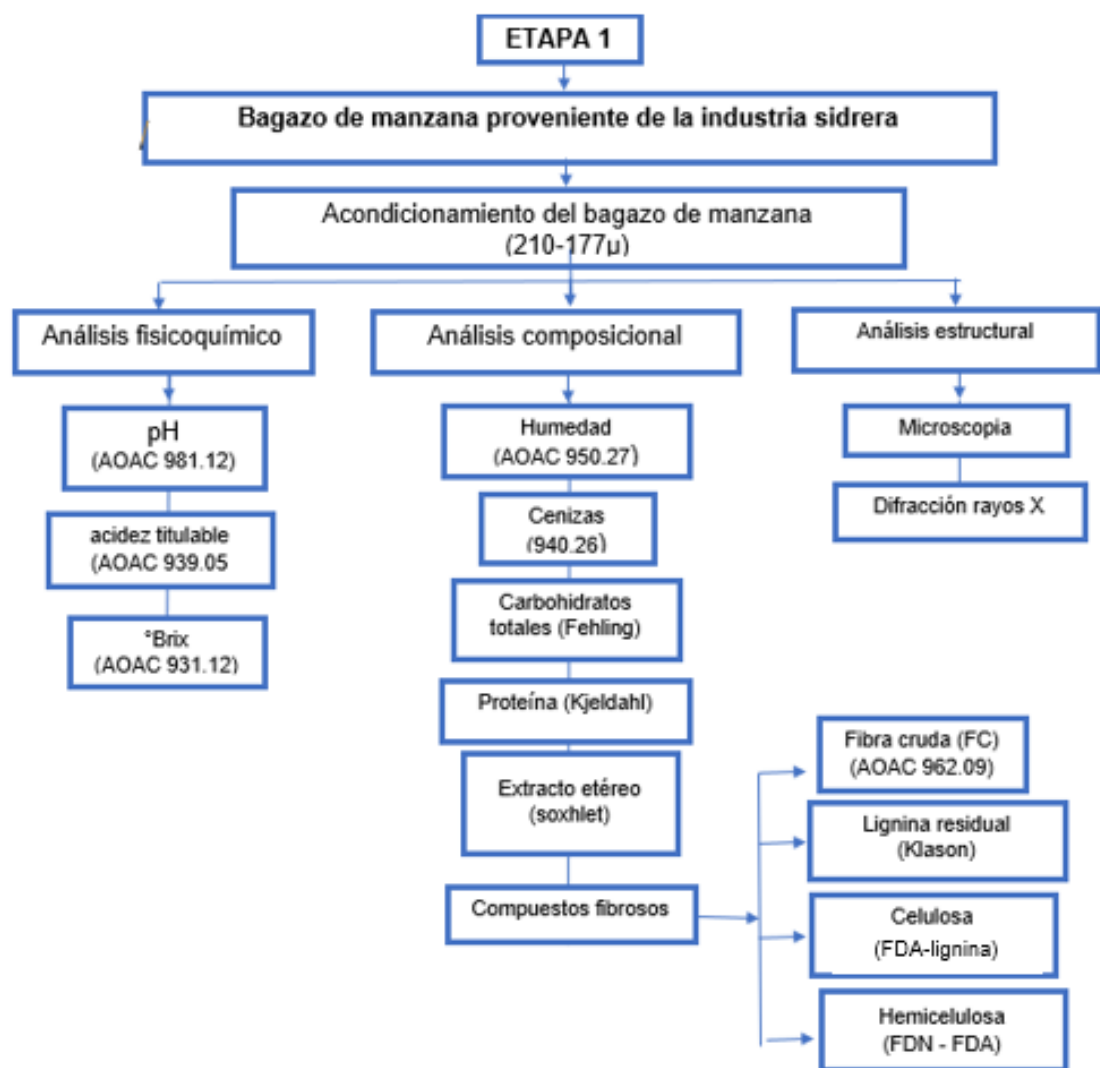


Figura 2. 1 Metodología para la caracterización del residuo agroindustrial del bagazo de manzana.

2.1.1 Acondicionamiento del bagazo de manzana

. Se recolectó 15 kg de bagazo de manzana de la de la industria sidrera Soamy ubicada en Calle Carlos B. Zetina Núm. 410 en la región de Huejotzingo del Estado de Puebla el 1 de septiembre del 2017 en condiciones inocuas. La muestra fue almacenada 5°C en condiciones de inocuidad, para ser lavados mediante una inmersión en agua potable y después fueron desinfectados a una concentración de 1 ppm de cloro; para un posterior escaldado a 60 °C durante 5 minutos.

A continuación, se sometió un proceso de secado 70°C, durante 18 horas hasta obtener la humedad del 22% en un horno digital marca *BINDER*, seguido de un proceso de molienda en un molino marca *KRUPS GX4100* para reducir el tamaño del residuo y facilitar el tamizado.

Posteriormente, el bagazo de manzana seco y molido se pasó por una serie de tamices Tyler hasta llegar a la malla 80, para obtener el tamaño de partícula de entre 210-177µ como lo indica la Norma del Codex 152-1985.

2.1.2 Análisis fisicoquímico

2.1.2.1 pH

Para esta medición se empleó el procedimiento propuesto por AOAC 981.12 (2005), mediante el uso de un potenciómetro digital marca *DENVER* modelo 710, previamente calibrado con buffers de pH 4 y 7, preparando una solución 1:4 con respecto al peso de la muestra, usando agua destilada como diluyente.

2.1.2.2 Acidez titulable

Se determinó la acidez titulable mediante la técnica AOAC (2000) 939.05. Pesando 1.0 g al cual se adicionaron 40 mL de agua destilada, se realizó una filtración y el filtrado se colocó en un matraz Erlenmeyer y se le adicionaron dos gotas de fenolftaleína. La muestra se tituló con NaOH al 0.01 N hasta lograr un vire ligeramente rosado por 30 segundos, el resultado se expresó en concentración de ácido málico. En la ecuación 1 muestra cómo se calculó la acidez de la muestra.

$$\% \text{ acidez} = \frac{V_b \times N \times \text{Milieq} \times 100}{V_a} \quad \text{EC. 1}$$

Donde:

Vb: volumen en ml, gastado por la base.

N: normalidad de la base.

Milieq: miliequivalentes del ácido predominante en la muestra acida (ácido málico 0.067)

Va: volumen del ácido

2.1.2.3 Brix

Se utilizó el método refractométrico según AOAC 931.12 (2005). Pesando 1.0 g de muestra con 10 mL de agua destilada. Se empleó un refractómetro marca ATAGO modelo *PAL1* (Rango 0-75° Brix).

2.1.3 Análisis composicional.

2.1.3.1 Humedad

Se determinó el contenido de humedad como lo indica la AOAC 950.27 (2005); se pesó 1.5 g de muestra y se colocó durante 3 horas en una estufa marca *RIOSSA* modelo *E51* a una temperatura de 130 °C; posteriormente, se sacó de la estufa, se dejó enfriar en un desecador y se pesó en una balanza analítica. La ecuación 2 fue empleada para determinación de humedad.

$$\% \text{ Humedad} = \frac{g \text{ de muestra} - g \text{ de muestra seca}}{g \text{ de muestra}} \times 100 \quad \text{Ec. 2}$$

2.1.3.2 Cenizas

Se empleó la técnica de la AOAC 940.26 (2005). Para ello se pesaron 3.0g de muestra y se calcinaron a una temperatura de 550 °C durante 2 horas en una mufla marca TERLAB modelo F48055 Posteriormente se registró el peso remanente. La ecuación 3 se utilizó para la determinación de cenizas.

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{g \text{ de crisol con cenizas} - g \text{ de crisol}}{g \text{ de muestra}} \times 100 \quad \text{Ec. 3}$$

2.1.3.3 Carbohidratos totales

El contenido de carbohidratos totales fue determinado con el método de Fehling (Jones & Stoodley, 1965) Pesando la muestra 1.5g con 100mL de agua, realizando una hidrólisis acida con 5mL de HCl concentrado por 30 min; posteriormente, se añaden 5 mL de NaOH 1 N durante 30 min más. La disolución obtenida se aforo hasta 100 mL con agua destilada y se filtró. Tomando 20mL del filtrado y se coloca en una bureta.

La titulación se realizó colocando en un matraz de 200 mL de agua destilada, 5 ml de solución de Fehling A y 5 mL de solución de Fehling B, añadiendo 2 o 3 gotas de solución de azul de metileno. Llevar a ebullición la solución con perlas de ebullición y lentamente agregar la solución hidrolizada sin dejar de calentar, hasta que desaparezca la coloración azul (oxidación del azul de metileno). Mantener la ebullición durante la titulación. En la ecuación 4 se muestra el cálculo para obtener carbohidratos totales.

$$CT = \frac{F-V}{G*M} * 100 \quad \text{Ec. 4}$$

CT=Carbohidratos totales

F= 0.05

M= Masa muestra

V= Volumen de aforo

G= Volumen de filtrado empleado en la titulación

2.1.3.4 Proteínas

Para la determinación de proteína bruta se siguió el procedimiento de micro Kjeldahl descrito por la AOAC 984.13 (1980). Donde a 30 mg de muestra se le midió el contenido de nitrógeno total, después de ser digerido con ácido sulfúrico en presencia de un catalizador. Empleando el sistema de micro Kjeldahl (marca LABCONCO mod 2308000), utilizando una unidad de digestión y una de destilación Kjeldahl. Se utilizó la ecuación 5 para la determinación de nitrógeno y el factor de

conversión de miliequivalente de nitrógeno 0.014. El por ciento de proteínas se obtiene multiplicando el porcentaje de nitrógeno obtenido por el factor correspondiente.

$$\% \text{ de Nitrogeno} = (V \times N \times 0.014 \times 100) / m \quad \text{Ec. 5}$$

Donde:

V= volumen de aforo.

N= Normalidad de HCL.

m= masa de la muestra.

2.1.3.5 Extracto etéreo

Se siguió la metodología propuesta por la AOAC 920.39 (2000), se tomaron 3g de muestra y se colocaron en el Soxhlet por 4 horas a 50°C el cual trabaja con un sistema de extracción cíclica de los componentes solubles en éter que se encuentran en el alimento, la grasa extraída es evaluada como porcentaje del peso después de la evaporación del éter en el alimento. En la ecuación 6 muestra la fórmula utilizada para la determinación de grasa

$$\%EE = \frac{B-A}{M} \times 100 \quad \text{Ec. 6}$$

Donde:

%EE = Porcentaje de extractoetéreo

A = Matraz a peso constante (g)

B = Matraz con extracto etéreo (g).

M = Peso de la muestra (g)

2.1.3.6 Fibra cruda (FC)

Se empleó el método propuesto por la AOAC, 962.09 (1985). Donde se pesaron en un vaso de precipitado 3.0g de muestra con 100 mL de H₂SO₄ al 1.25% y se le

adicionaron perlas de ebullición, se adaptó como cubierta otro vaso de precipitado con hielo, y se acomodaron en una parrilla Thermo modelo SP131325 hasta lograr la ebullición manteniendo durante 30 minutos. Al retirar del calor se filtró y enjuago con 150 mL de agua caliente. Se colocó la muestra en un vaso de precipitado con 100 mL de NAOH al 1.25% y se adaptó la cubierta, posteriormente se llevó a ebullición por 30 minutos más, de igual manera se realizó un filtrado y enjuague con 150 mL de agua caliente. Enseguida se realizó un lavado con 50 mL de etanol. A continuación, se llevó la muestra a una estufa marca *RIOSSA* modelo *E51* a una temperatura de 80 °C durante un día. A la muestra final obtenida se realizó una determinación de cenizas. El cálculo se realizó como lo indica la ecuación 7.

$$\% FC = \frac{\text{peso de residuo seco-cenizas}}{\text{peso muestra}} * 100 \quad \text{Ec. 7}$$

2.1.3.7 Fibra detergente neutra (FDN)

Se empleó el método propuesto por la AOAC, 920.04 (2002). Pesando 0.5 g de muestra por triplicado y se depositaron dentro de bolsas filtro ANKOM (a peso constante) y después se sellaron con calor. Se colocaron dentro de un vaso de precipitado y se adicionaron 200 mL de solución detergente neutra y 2.0 g de metabisulfito, se adaptó como cubierta otro vaso de precipitado con hielo. Se colocaron sobre una parrilla y se llevó a ebullición durante 60 minutos. Se retiró la solución caliente y se adicionaron 200 mL de agua purificada, se mantuvo en ebullición por 15 minutos, se retiró el líquido caliente y se repitió nuevamente éste último paso. El líquido drenado se añadió a la solución detergente para neutralizarla y desecharla.

A continuación, se colocaron las de bolsas filtro ANKOM en tubos falcon y se les quitó el exceso de agua por medio de una centrifuga marca Electroquim modelo HERMLE Z200A durante 10 minutos. Finalmente, se llevaron a una estufa marca *RIOSSA* modelo *E51* a una temperatura de 90°C durante 12 horas. La ecuación 8 muestra el cálculo del porcentaje de FDN.

$$\%FDN = \frac{\text{peso muestra} - \text{peso de residuo}}{\text{peso muestra}} * 100 \quad \text{Ec. 8}$$

2.1.3.8 Fibra detergente ácida (FDA)

Se determinó mediante la técnica propuesta por la AOAC, 973.18 (2002). Las bolsas filtro ANKOM secas con las muestras obtenidas de la determinación de FDN, se colocaron dentro de un vaso de precipitado y se adicionaron 200 mL de solución detergente acida, se adaptó como cubierta otro vaso de precipitado con hielo. Se colocaron sobre una parrilla y se llevó a ebullición durante 60 minutos. Se retiró la solución caliente y se adicionaron 200 mL de agua purificada y se dejó en ebullición por 15 minutos, se retiró el líquido caliente, y se repitió nuevamente éste último paso. El líquido drenado se añadió a la solución detergente ácida para neutralizarla y desecharla.

A continuación, se colocaron las bolsas en tubos falcon durante 10 minutos para remover el exceso de agua por medio de una centrifugadora marca Electroquim modelo HERMLE Z200A. Finalmente se llevaron a una estufa marca *RIOSSA* modelo *E51* a una temperatura de 90 °C durante 12 horas. En la ecuación 9 se puede observar cómo se calculó el porcentaje de FDA

$$\%FDN = \frac{\text{peso muestra} - \text{peso de residuo}}{\text{peso muestra}} * 100 \quad \text{Ec. 9}$$

2.1.3.9 Lignina residual

La determinación de lignina residual se realizó de acuerdo con el método de lignina de Klason utilizado por Schwanninger y Hiterstoisser, (2002). Se pesaron 250 mg de muestra y se adicionó 1 mL de H₂SO₄ al 72% por cada 100 mg de ésta. En seguida se colocó a baño maría a 40 °C durante 1 hora con agitación, a la muestra hidrolizada se le agregaron 28 mL de agua destilada por cada 1 mL de H₂SO₄ utilizado.

Se efectuó una segunda hidrólisis en autoclave a 15 lb_r por 1 hora. Posteriormente la muestra se filtró utilizando crisol y papel filtro con ayuda de una bomba de vacío, al mismo tiempo que se le realizó un lavado con 100 mL de agua destilada aplicando vacío, para lograr obtener un pH de 7. En seguida se colocó la muestra en una estufa de vacío durante 4 horas. En la ecuación 10 se muestra el cálculo del porcentaje de lignina.

$$\% \text{ LIGNINA} = \frac{\text{peso final de la muestra}}{\text{peso inicial de la muestra}} * 100 \quad \text{Ec. 10}$$

2.1.3.10 Celulosa

La determinación de celulosa se realizó por balance la cual se puede observar en la ecuación 11. Esto tomando en cuenta que la fibra detergente acida está compuesta por celulosa y lignina, de acuerdo con lo estipulado por FAO (1999).

$$\% \text{ Celulosa} = \text{FDA} - \text{lignina} \quad \text{Ec. 11}$$

2.1.3.11 Hemicelulosa

El cálculo de hemicelulosa se realizó con la ecuación 12. Se determinó de acuerdo a lo estipulado por FAO (1999). Que es a través de la relación de fibra de la muestra. En la Ecuación 12 se puede observar la fórmula como se calculó la Hemicelulosa.

$$\% \text{ Hemicelulosa} = \text{FDN} - \text{FDA} \quad \text{Ec. 12}$$

2.1.4 Análisis estructural

2.1.4.1 Difracción de rayos X

Los patrones de rayos X en polvo se obtuvieron en un D8 Bruker Discover Series 2, difractor con radiación Cu K α . La intensidad de difracción se midió entre 5 y 70°, con un paso de 2 θ de 0.04 ° y un tiempo de conteo de 0.6 s por punto. Las fases cristalinas fueron identificadas por medio de la base de datos del JCPDS (Comité Conjunto de Normas de Difracción de Polvo).

El índice de cristalinidad de la celulosa (IC) se determinó mediante difracción de rayos X. método de deconvolución (ajuste de la curva) (Terinte *et al.*, 2011) Se calculó a partir de las integrales de pico I (hkl), de acuerdo con la ecuación:

$$CI = \left[\frac{I_{101} + I_{10.1} + I_{002}}{I_{101} + I_{10.1} + I_{002} + I_{Nc}} \right] * 100 \quad \text{EC. 13}$$

donde: I (101), I (10.1) y I (002) representan el área bajo el plano cristalino y I_{Nc} representa el área no cristalina.

2.1.4.2 Microscopia electrónica de barrido (SEM).

El análisis de microscopía electrónica de barrido se realizó sobre el bagazo de manzana sin tratamiento. Por otro lado, se determinó la composición elemental por espectroscopía de dispersión de energía.

El análisis SEM se llevó a cabo en un JEOL JSM-6610 LV con un voltaje de aceleración de 20 keV equipado con un espectrómetro de rayos X de dispersión de energía (INCA x-act Penta F6T precisión de los instrumentos de Oxford). Antes del análisis, la muestra se cubrió con oro y montado sobre una película de carbono. La composición elemental promedio fue obtenida por analizando 3 zonas distintas.

2.2 Fermentación del bagazo e Inoculación de *Pleurotus ostreatus*

Para la etapa 2 se procedió a la producción del micelio *Pleurotus ostreatus*, seguido de su activación y posteriormente se acondicionó el bagazo de manzana, para usar como sustrato en la inoculación del hongo *Pleurotus ostreatus*. En la Figura 2 se muestra la metodología que se siguió (Sánchez-Cantú *et al.*, 2018)

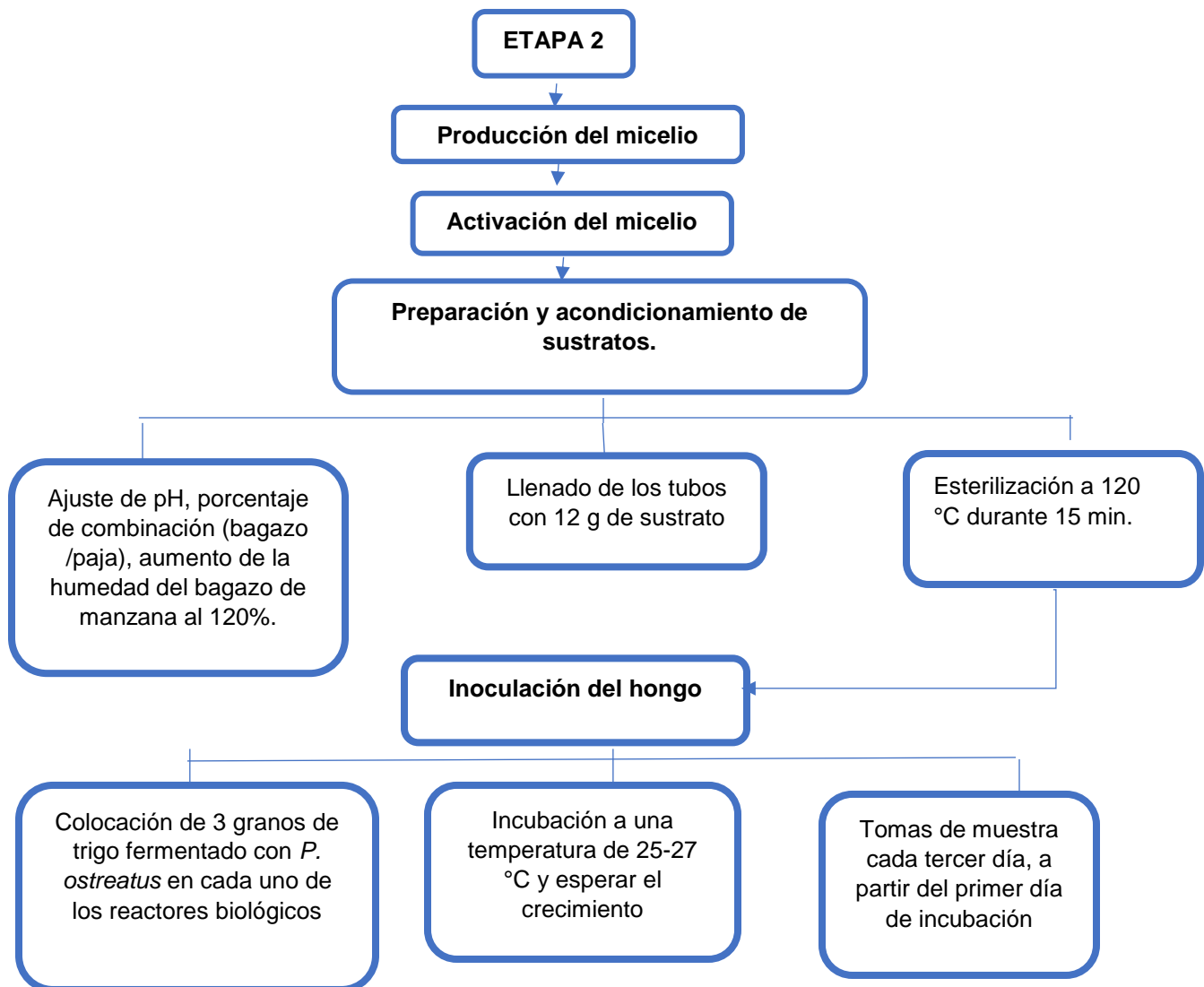


Figura 2. 2 Metodología de la fermentación del bagazo de manzana e inoculación de *Pleurotus*

2.2.1 Producción del micelio

Se utilizó una cepa de *P. ostreatus* (G) del Departamento de Investigación en Ciencias Agrícolas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (DICA-BUAP) cultivada a 28°C. Esta cepa fue multiplicada en batería de micelio, para esto se requirió elaborar agar de papa dextrosa, con una composición aproximada por litro de 4g de almidón de papa, 20g de dextrosa y 15 de agar, se esterilizó a 120°C y 15 psi de presión durante 15 minutos. Se dejó enfriar y se vertió en cajas Petri dentro de una campana de flujo laminar marca Alder. Después se cultivó el micelio en las cajas Petri mediante la técnica de Pitt y Hoking, tomando un trozo de agar con micelio y agregándolo a las cajas Petri nuevas (Carrillo, 2003). Se introdujeron en una incubadora microbiológica marca Rios Rocha a 28°C durante 5 días

2.2.2 Activación del micelio

Para la obtención del micelio activado se utilizó semilla de trigo, las cuales se colocaron en bolsas de polipropileno y se les agregó agua purificada, un poco menos del volumen de las semillas, las bolsas fueron cerradas parcialmente y esterilizadas a 120°C y 15 psi de presión durante 15 minutos. Las bolsas con los granos de trigo se dejaron enfriar dentro de una campana de flujo laminar marca Alder, y se procedió a la inoculación del micelio activado con el micelio de *Plurotus ostreatus* de la caja Petri previamente purificada, y se sellaron. Por último, se introdujeron las bolsas inoculadas, en una incubadora microbiológica marca Rios Rocha a 28°C.

2.2.3 Preparación y acondicionamiento del sustrato.

Se aumentó la humedad del bagazo de manzana al 80%, 90% y hasta un 120% aproximadamente. Posteriormente, se hicieron pruebas con diferentes combinaciones de paja de trigo en una proporción de 70 y 80% (p/p), respectivamente; y con el 100% de bagazo para obtener las mejores condiciones de crecimiento. Así también se

realizaron pruebas ajustando el pH del sustrato entre 5-7 para obtener una mayor velocidad de crecimiento del micelio.

Se llenaron 60 reactores biológicos con 12 g de bagazo de manzana, obteniendo 60 muestras de extracto enzimático, ya que se las pruebas se realizaron por duplicado para cada enzima. Todos los tubos se esterilizaron en una autoclave vertical ALWORTH a una temperatura de 120 °C durante 15 min, y se almacenaron para su inoculación.

2.2.4 Inoculación del hongo en los reactores.

Cada uno de los reactores se inoculó con tres granos de trigo fermentado con *P. ostreatus* colocado en la parte media del reactor, para que la propagación de éste fuera de manera radial y uniforme. Inoculados los tubos, se incubaron en condiciones aerobias, manteniendo el flujo de aire a una temperatura de 25°C, durante 30 días. A partir del día 3 se observó el crecimiento del hongo y se procedió a la extracción de enzimas, tomando muestras por duplicado cada tercer día durante un mes (Miles & Chang, 2004).

2.3 Obtención de extracto enzimático y determinación de actividad enzimática.

La etapa 3 conlleva la extracción del extracto enzimático cada tercer día durante un mes de inoculación del hongo *Pleurotus ostretus* en bagazo de manzana como sustrato. A su vez, se realizó la determinación de la actividad enzimática. En la Figura 2.5 se puede observar el diagrama de diagrama de bloques de la metodología seguida en la etapa 3.

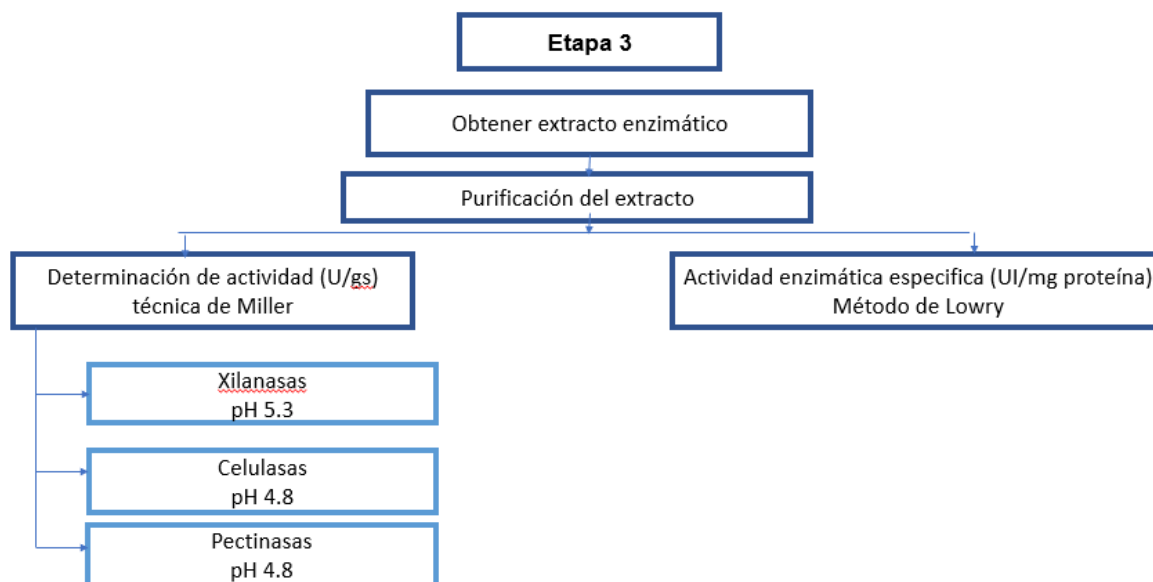


Figura 2. 3 Diagrama de bloques de la metodología seguida en la etapa 3.

2.3.1 Obtención y purificación del extracto

Para la obtención del extracto enzimático y la determinación de la actividad enzimática se utilizaron buffers de citrato 50 mM a pH de 5.3 y de 4.8 para xilanasas y celulasas, respectivamente; y buffer de acetato a pH 4.8 para pectinasas. El extracto se obtuvo de la siguiente manera: se vació el material fermentado de los tubos falcón y homogenizó, se pesaron 12 g de la muestra para extraer el extracto enzimático, posteriormente se agregaron 12 mL, se agitó manualmente por 30 min y sometió a prensado la mezcla con el buffer y recuperó el extracto líquido. Para purificar el extracto se sometió a una centrifugación a 3500 rpm a 4°C por 15 min (Peláez-Acero *et al.*, 2011).

2.3.2 Determinación de actividad enzimática.

La determinación de enzimas se realizó usando la técnica de Miller o DNS (1959), reactivo que tiene la capacidad de oxidar a los azúcares reductores dando resultados colorimétricos que se pueden medir con una longitud de onda de 540 nm para xilanasas y celulasas, y 530nm para pectinasas

Para las xilanasas se preparó una solución de xilano al 1 % (p/v) (SIGMA)[®] como sustrato, una solución de carboximetilcelulosa (CMC) al 1 % (MEYER)[®] como sustrato para celulasas y para pectinasas una solución de PGA (Ácido poligalacturónico): (MEYER)[®] como sustrato (Domínguez., 2010).

Se utilizó un blanco general para ajustar a cero el espectrofotómetro, un blanco individual para corregir la absorción aportada por la muestra en la reacción y la muestra problema. Una vez que se obtuvo la absorbancia de la muestra, se calculó la actividad enzimática para xilanasas, celulasas y pectinasas mediante la fórmula de la pendiente que se obtuvo de la curva de calibración de xilosa, glucosa y D-galacturónico respectivamente. La actividad es expresada en U/gss que equivale a unidades internacionales por gramo de sustrato sólido en buffer de citratos a 4.8 y 5.3 para xilanasas y celulasas, y buffer de acetatos a pH 4.8 para pectinasas.

2.3.2.1 Preparación de la muestra problema

Se colocó en un tubo 0.9 ml de la solución correspondiente. Posteriormente se agregó 0.1 mL del extracto enzimático. Después se incubó a 50°C durante 5 min. Al término de este tiempo se añadió 1.5mL de DNS. Después se puso a hervir las muestras por 5 min, luego se colocaron en un baño de hielo por 1 min. Al concluir el procedimiento se procedió a leer en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm. para xilanasas y celulasas y a 530nm para pectinasas.

2.3.3 Actividad enzimática específica

La actividad enzimática específica se realizó usando el método de Lowry (1951) es un método colorimétrico de valoración cuantitativa de las proteínas. A la muestra se añade un reactivo que forma un complejo coloreado con las proteínas, siendo la intensidad de color proporcional a la concentración de proteínas, y se puede medir con una longitud de onda de a 700nm.

2.3.3.1 Preparación de la muestra

Se tomo una alícuota de 100 μ L de muestra, 0.1 mL del extracto enzimático, de reactivo de Lowry, se mezcló con ayuda de un vortex y dejo 10 minutos a temperatura ambiente. Por último, se procedió a leer la reacción enzimática en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 500 nm.

2.3.6 Curvas de calibración

Las curvas de calibración se realizaron mediante la técnica reportada por Almeida *et al.* (2002) así mediante esta curva se obtuvo la fórmula de la pendiente.

La curva de calibración para medir actividad de celulasas utilizó CMC con glucosa 0-1 mg/mL a 540nm.

Para la curva de calibración de Xilanasas se utilizó xilosa de 0 - 0.45 mg/ mL a 540nm

La actividad de las enzimas pectinasas se utilizó D- galacturónico de 0 – 0.25 mg/ mL a 530nm.

2.4 Pretratamiento del bagazo de manzana.

A continuación, se presenta en la figura 2.6 el diagrama con la metodología seguida durante la etapa 4 que el pretratamiento del bagazo de manzana.

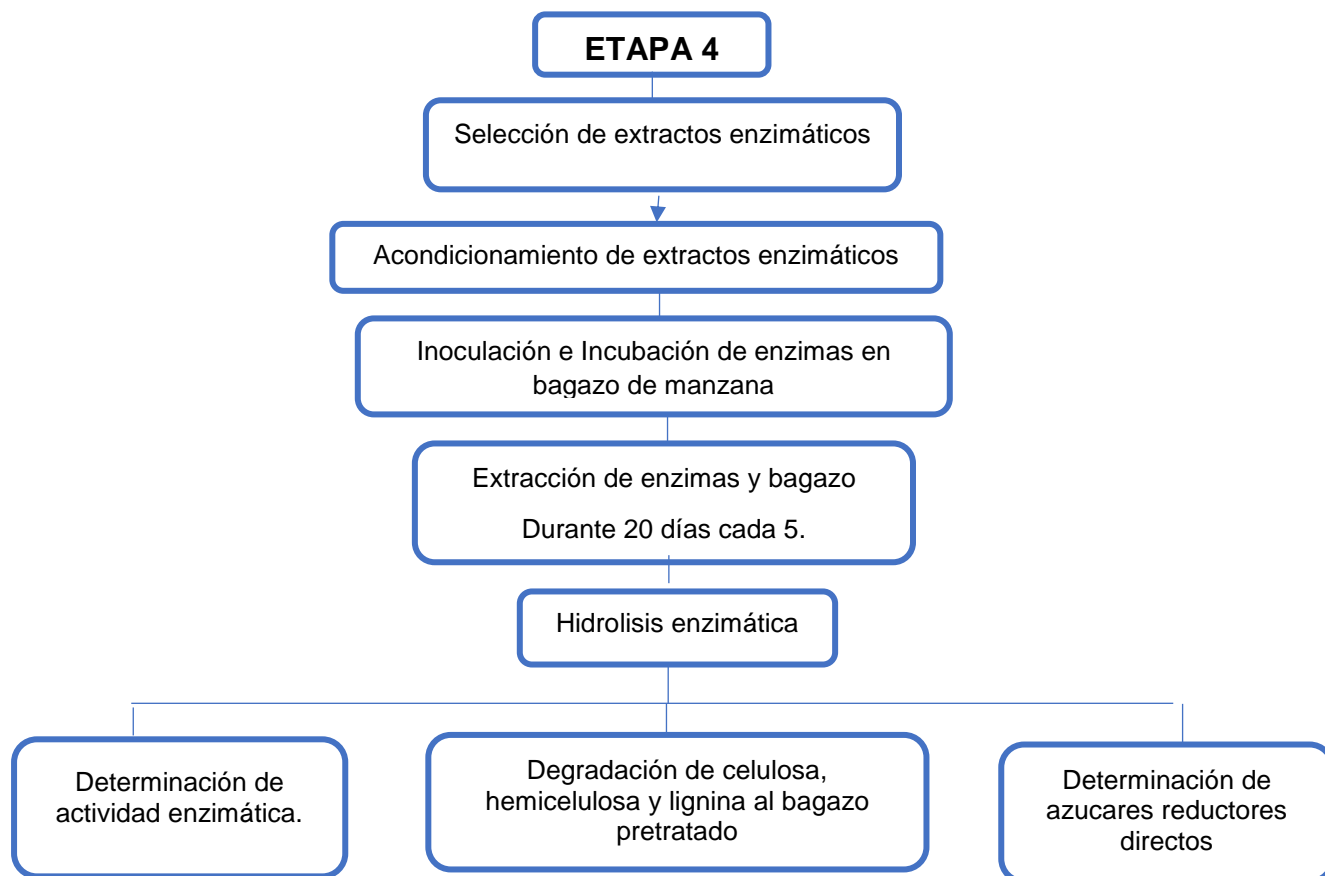


Figura 2. 4 Metodología seguida en la etapa 4.

2.4.1 Selección de extractos enzimáticos

Para llevar a cabo el pretratamiento biológico se emplearon las enzimas extracelulares generadas por el hongo *Pleurotus ostreatus* en los días de mayor actividad de acuerdo con el apartado 2.3.2, para las xilanasas se encontró la máxima actividad en el día 15, las celulasas día 18 y pectinasas día 15.

2.4.2 Acondicionamiento de extractos enzimáticos

Los extractos enzimáticos de los días de actividad máxima de las enzimas fueron acondicionados para poder utilizarlos en el pretratamiento biológico, se diluyeron con buffer de citratos pH 4.8 y 5.3 para xilanasas y celulasas, buffer de acetatos a pH 4.8 para pectinasas en una proporción 1:1 y se homogenizo.

2.4.3 Inoculación e incubación de enzimas en bagazo de manzana

El extracto enzimático acondicionado fue incubado con base al método descrito por Sánchez-Cantú *et al.* (2018) agregando 5 mL de solución enzimática a 5g de bagazo de manzana limpio en reactores biológicos estériles, variando las condiciones a 90 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se dejaron actuar en una estufa microbiológica a 27°C durante 20 días.

2.4.4. Extracción de enzimas y bagazo de manzana pretratado

Se separó el extracto enzimático del bagazo incubado cada 5 días, durante 20 días, siguiendo la metodología del apartado 2.3.1. el bagazo incubado se secó en estufa marca *RIOSSA* modelo *E51* a una temperatura de 60 °C durante 3 horas, para poder determinar la hidrólisis enzimática.

4.4.5 Hidrólisis enzimática

Para la hidrólisis enzimática se determinó la actividad enzimática y azúcares reductores directos al extracto obtenido cada cinco días durante el pretratamiento, y se observó la degradación de celulosa, hemicelulosa y lignina en el bagazo de manzana incubado y seco.

Bibliografía: capítulo 2

- Almeida, A. M. D., Castel-Branco, M. M., & Falcao, A. C. (2002). Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods. *Journal of Chromatography B*, 774(2), 215-222.
- AOAC. (2005). Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemists 18th ed.. E.U.A.
- Carrillo, L. los hongos de los alimentos y forrages, Argentina: UNAS, 2003.
- Collazos, C. (1993). La composición de alimentos de mayor consumo en el Perú. (6.a ed.). Lima: Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Nutrición
- Jones, J. K. N., & Stoodley, R. J. (1965). Fractionation using copper complexes. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, 5, 36–38.
- Miles, P. G., & Chang, S. T. (2004). *Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact*. CRC press
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31(3), 426-428.
- Pelaez-Acero, A., Meneses-mayo, M., Miranda-Romero, L.A., Ayala-Martinez, M., Crosby-Galvan, M.M. Loera-Corral, O., & Megías-Rivas, M. D. (2011). Enzimas fibrolíticas producidas por fermentación en estado sólido para mejorar los ensilajes de caña de azúcar. *Agrociencia*, 45(6), 675-685.
- Sánchez-Cantú, M., Ortiz-Moreno, L., Ramos-Cassellis, M. E., Marín-Castro, M., & De la Cerna-Hernández, C. (2018). Solid-state treatment of castor cake employing the enzymatic cocktail produced from *Pleurotus djamor* fungi. *Applied biochemistry and biotechnology*, 185(2), 434-449.
- Schwanninger, M., & Hinterstoisser, B. (2002). Klason lignin: Modifications to improve the precision of the standardized determination. *Holzforschung*, 56(2), 161–166

Terinte, N., Ibbett, R., & Schuster, K. C. (2011). Overview on native cellulose and microcrystalline cellulose I structure studied by X-ray diffraction (WAXD): Comparison between measurement techniques. *Lenzinger Berichte*, 89, 118-131.

Capítulo III:

RESULTADOS

En este capítulo se encuentran los resultados obtenidos durante la parte experimental, presentado por etapas.

3.1 Análisis Físicoquímico.

En la Tabla 3.1 se muestran las lecturas de pH, acidez y °Brix realizadas Al bagazo de manzana después del acondicionamiento. Este análisis permite saber las condiciones iniciales en la que se encuentra el bagazo de manzana, para así poder ser utilizado como sustrato en el proceso de fermentación sólida.

Tabla 3. 1 análisis físicoquímico.

<i>pH</i>	3.32±0.03
<i>Acidez</i>	1.17±0.04
<i>° Brix</i>	14.6±0.07

Se presenta el triplicado de las muestras ± DE (desviación estándar)

El bagazo de manzana presentó un pH de 3.3±0.03, por lo que puede clasificarse como alimento de alta acidez de acuerdo a lo establecido por Cameron y Esty (1940); dicho valor es menor en comparación al pH de desechos de procesamientos de manzana, encontrados por Gurpreet *et al.* (2013), donde obtuvieron un valor de 3.5±0.1 Las diferencias en esta propiedad dependen de la composición química, grado de maduración y especie de la fruta (Viñas *et. al.* 2013).

Valores de pH tan bajos como este tienen una gran influencia en el crecimiento microbiano, ya que son pocos los microorganismos que crecen por debajo de 4.0, pese al intervalo tan grande de pH al que pueden crecer y proliferar los hongos la mayoría de ellos prefiere un medio ácido para su desarrollo. En este sentido, se encuentra reportado que el pH adecuado para el crecimiento micelial de *Pleurotus* oscila entre 6.0-7.0 (Pérez, B., 2006), lo que significa que el pH del bagazo de manzana necesitaría ajustarse para ser utilizado como sustrato para inocular *Pleurotus ostreatus*.

Por otro lado, el valor de acidez se refiere a la determinación cuantitativa del contenido de ácido en el producto expresada en porcentaje del ácido predominante (Egan *et al.*, 1996). El resultado obtenido el bagazo de manzana es de $1.17 \pm 0.01\%$ de ácido málico. La acidez del bagazo proviene de la acidez natural desarrollada por el fruto durante su crecimiento como una forma de proteger los tejidos frente a presencia microbiana, en la mayoría de los frutos la acidez decrece gradualmente con el proceso de maduración jugando un papel importante en el balance acidez/azúcar y, por ende, influyendo en el sabor y aroma de los frutos (Briseño *et al.*, 2005).

Respecto al contenido de sólidos solubles, estos proporcionan una medida objetiva de la concentración de sólidos solubles de azúcares disuelta en un producto, por lo que se miden en porcentaje o grados Brix, considerando que 1 °Brix equivale a 1g de azúcar en 100g de agua a temperatura ambiente.

El valor del bagazo de manzana fue de 14.6 ± 0.2 °Brix, este valor es mucho menor en comparación con el valor de azúcares totales encontrado por O'shea *et al.* (2015) los cuales reportaron un valor del 54.20%. Lo anterior se atribuye a que debido a que estos autores trabajaron con manzana fresca (incluyendo la cáscara y la pulpa), por lo que los niveles de sólidos solubles incluyendo fructosa, glucosa, sacarosa y sorbitol, son mayores.

Estos azúcares solubles son consumidos preferentemente por el hongo *Pleurotus ostreatus* en su fase de crecimiento micelial junto con la hemicelulosa respecto de la celulosa y lignina; sin embargo, durante la fase de adaptación e inicio de crecimiento interfieren en el consumo de nutrientes por lo que es conveniente tenerlos en menor cantidad (Gómez & Cuervo 2008).

3.2 Análisis composicional.

La caracterización composicional, es de suma importancia debido a que los resultados determinan la composición química del bagazo de manzana y da referencia del éxito de la inoculación del hongo sobre este. Esta determinación consiste en determinación de humedad, cenizas, carbohidratos totales, proteínas, así como fibra,

los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados que se expresan en base seca en la Tabla 3.2 fueron aquellos los del promedio de las 3 determinaciones. A su vez, se determinó la desviación estándar.

Tabla 3. 2 Composición química proximal del bagazo de manzana variedad *Pyrus malus*

<i>Componente</i>	<i>g/100 g</i>
<i>Cenizas</i>	1.71± 0.04
<i>Carbohidratos totales</i>	88.40±0.12
<i>Extracto etéreo</i>	4.89± 0.46
<i>Proteína</i>	4.24±0.434

Se presenta el triplicado de las muestras ± DE (desviación estándar)

El contenido de humedad del bagazo de manzana fue 22.3 %, lo que indica que existe una reducida cantidad de agua libre o no ligada que pueda ser empleada por la flora microbiana (Belén-Camacho *et al.*, 2007). Se ha reportado que el contenido de agua óptimo para *Pleurotus ostreatus* se encuentra entre el 80-85% para un crecimiento máximo del micelio (Pérez, B., 2006) por lo que este dato permitió saber que será necesario realizar un ajuste de humedad al bagazo de manzana para poder usarlo como sustrato.

En la tabla 3.2 se puede observar el contenido de cenizas, estas comprenden a los minerales que quedan tras la combustión completa de los componentes orgánicos de un alimento en unas condiciones determinadas. Se sabe que la manzana contiene minerales como potasio, fósforo, calcio y hierro, entre otros (Matissek *et al.*, 1992; Ángel *et al.*, 2013), el valor encontrado fue de 1.71% el cual varía poco con el encontrado por Gullón *et al.* (2007) en la pulpa de manzana que fue de 1.53%; sin embargo, es similar al valor de cenizas de la variedad de manzana Karmijn de Sonnaville encontrado por O'shea *et al.* (2015) que fue de 1.6.%

También puede observarse que el contenido de carbohidratos totales fue el porcentaje más alto, ya que la muestra de bagazo de manzana contiene 88.40% este valor es similar al encontrado por Gurpreet *et al.* (2013) en donde se analizó la pulpa

de manzana generada por industrias de Canadá en donde obtuvieron el 83.8% y al bagazo de jugo de manzana variedad Karmijn de Sonnaville estudiado por O'shea *et al.* (2015) de 84.43%. El bagazo de manzana como fuente de carbohidratos favorecen las reacciones metabólicas y estructurales, siendo la función más importante la de satisfacer las necesidades energéticas del organismo mediante la liberación de energía almacenada en los enlaces de carbono y su transformación en trabajo biológico; además, también son el vehículo de algunos micronutrientes y fitoquímicos (Calvo & Mendoza, 2010; Cummings *et al.*, 1997). En el caso de los macromicetos como el *pleurotus ostreatus* consumen los carbohidratos en cantidades importantes durante la fermentación, en la cual se cubre todo el desarrollo, y los cambios durante la fase de incubación, así como los requerimientos energéticos para la fructificación (Mitchell *et al.*, 2004)

El extracto etéreo se refiere al conjunto de las sustancias extraídas, que incluyen, además de los ésteres de los ácidos grasos con el glicerol, determinados alcoholes, los fosfolípidos, las lecitinas, los esteroides, las ceras, los ácidos grasos libres, los carotenos, las clorofilas y otros pigmentos (Caravaca, 2003).

El bagazo de manzana contiene un valor de extracto etéreo de 4.89 %, son componentes liposolubles, este contenido a pesar de ser bajo no afecta al crecimiento del hongo del género *Pleurotus* debido a que estos crecen en sustratos libres de grasa; no obstante, esta reportado que la presencia de lípidos no interfiere en el crecimiento (López-Rodríguez *et al.*, 2008).

Como se muestra en la Tabla 3.2, el contenido de proteína del bagazo de manzana obtenida fue de 4.29%. Está reportado que las frutas contienen poca cantidad de proteínas, donde en frutas frescas el contenido aproximado es de 0.2 a 3 g/100 g de proteína. Figuerola *et al.* (2005) analizaron el bagazo de manzana, como fuente potencial de fibra y encontraron un valor de 3.12 %, así como Gurpreet *et al.*, 2013 un porcentaje de 2.9; estas cifras salen del intervalo estimado para una fruta fresca, ya que el bagazo de manzana fue sometido a un proceso secado, se produce un incremento en la concentración de los "sólidos", entre ellos la proteína (Calvo & Mendoza, 2010). El bagazo de manzana contiene un bajo contenido proteico, se sabe

que los substratos sobre los que suelen fructificar las especies de *Pleurotus* pueden contener valores bajos de nitrógeno mientras contengan celulosa y lignina (Fuller *et al.*, 2005; Calvo & Mendoza, 2010; Sánchez & Royse, 2001) por lo que el crecimiento no se verá afectado por el valor proteico.

La fibra cruda representa al residuo orgánico insoluble que resiste a la hidrólisis ácida y alcalina, libre de cenizas (Egan *et al.*, 1996). En el bagazo de manzana este valor fue de 28.53 %, el cual diferencia muy poco con el encontrado por Wang & Thomas (1998) que fue del 33%, esta variación se puede deber a la naturaleza de la muestra. La fracción de fibra cruda, es una medida para determinar celulosa y lignina, y estos componentes son de vital importancia para el crecimiento de los hongos del género de *pleurotus* ya que son su fuente de energía.

Por lo anterior se ha tratado de establecer otros sistemas de fraccionamiento de los carbohidratos estructurales que aporten información más precisa sobre éstos compuestos. En este contexto, el sistema desarrollado por Van Soest distingue dos tipos de fibra: Fibra Detergente Neutra (FDN) Fibra Detergente Ácida (FDA), que cuantifican las fracciones de la pared celular de importancia nutricional (Caravaca *et al.*, 2003). El bagazo de manzana arrojó un valor de 37.27% de FDN el cual supera al valor reportado por Wang & Thomas (1998) de 29.20% lo que se puede deber al origen de extracción del residuo ya que este consistió en las porciones enteras insolubles de la manzana, incluyendo semillas, cáscaras y núcleos. La FDN trata de determinar el contenido en las paredes celulares de una muestra alimenticia. La FDN ofrece una estimación más precisa del total de fibra en el alimento. Con la diferencia FDN y FDA se puede obtener el valor de la hemicelulosa (Robbins, 1975; Caravaca, *et al.*, 2003).

La fracción de FDA, determina el contenido de celulosa y lignina insolubles de la muestra analizada, aunque suelen existir otros componentes minotarios como minerales y nitrógeno. Para obtenerla se realiza una hidrólisis ácida con un detergente y un ácido durante una hora sobre una muestra, o bien sobre el residuo de FND (Caravaca, *et al.*, 2003). En el residuo se puede analizar la celulosa o lignina (Goering y Van Soest, 1970).

El valor obtenido para la FDA del bagazo de manzana es de 48.23%, porcentaje compuesto por celulosa y lignina, que son compuestos indigeribles por las enzimas. Este valor fue casi el doble que el encontrado por Wang & Thomas de 25.11% lo que se debe al origen y variedad de la manzana.

Con las cifras conocidas para FDN, FDA y obteniendo lignina por el método de Schwanninger y Hiterstoisser, (2002), se estimaron los valores de celulosa y hemicelulosa. En la tabla 3.3 se muestra el valor de cada uno de dichos componentes que se encuentran en el residuo de bagazo de sidra de manzana

Tabla 3. 3 Composición química del bagazo de manzana.

<i>Componente</i>	<i>%</i>
<i>Lignina</i>	7.5±0.042
<i>Celulosa</i>	29.97±0.80
<i>Hemicelulosa</i>	8.51±0.56

El valor obtenido para lignina de el bagazo de manzana fue de 7.5%, un valor cercano al encontrado por Wang, H. J., & Thomas, R, 1998 de 9%. El contenido de esta depende del estado de maduración de la fruta, y la determinación sirve para predecir la digestibilidad en materia seca y energía de un alimento, se encuentra envolviendo a la celulosa y hemicelulosa y restringe al acceso a estos carbohidratos, que sí pueden ser digeribles (Cho S *et al.*, 1997).

La lignina es el componente más difícil de degradar de la pared vegetal, aunque esta reportado que los organismos más eficientes como degradadores de la lignina son los “hongos de pudrición blanca”, entre los que se encuentra el hongo *Pleurotus ostreatus* (Higuchi 1990). Por esta razón, los residuos lignoceloticos, como el bagazo de manzana, son excelentes sustratos para la inoculación del mismo.

Las hemicelulosas, se distinguen de las celulosas por la ausencia de CH₂OH de los grupos laterales. Está constituida por pentosas, sobre todo D-xilanos, los cuales son derivados de la D- xilosa con enlace (1 – 4), y de hexosas distribuidas de forma

ramificada y lineal conformando polímeros tipo polisacáridos (como los xiloglucanos, formados por glucosas) denominados no-celulósicos a través de enlaces β (1-4), haciendo que su estructura sea menos rígida que la de la celulosa (Aspinall, 1982; Lineback, 1999; Mataix & Gassull, 2002; Gray, 2006; Moreno 2000; Taiz & Zeiger, 2006).

El porcentaje de hemicelulosa para el bagazo de manzana fue del 8.51 %, el cual fue más bajo que el encontrado por Chen *et al.*, 1988 donde caracterizaron física y químicamente la fibra de manzana encontrando un valor de 15%. o el valor encontrado por Wang & Thomas (1998) del 17% esta variación se puede deber al tratamiento físico que se le dio al bagazo de manzana, y no se está analizando la misma porción de la manzana.

La celulosa está formada por unidades de D-glucosa unidas por enlaces β (1-4) (Taiz & Zeiger, 2006). Es el componente más abundante de las paredes celulares de las plantas superiores (Lineback, 1999; Mataix & Gassull, 2002) y representa aproximadamente 1/4 de la fibra alimentaria de los granos de cereales y frutas, así como 1/3 en hortalizas y frutos secos (Gray, 2006). No obstante, este valor dependerá de la especie y estado de maduración de cada uno.

En la Tabla 3.3 se observan los datos obtenidos con respecto al contenido de celulosa del bagazo de manzana con 29.977% un valor que se asemeja al encontrado en el bagazo de manzana por Chen *et al.*, 1988 de 31%, valor muy alto y conveniente para la etapa del pretratamiento con las enzimas celulasas en sustratos susceptibles a éstas (Gray, 2006).

3.3 Análisis estructural

En el análisis estructural se llevó a cabo por las técnicas de difracción de rayos X (DRX) y Microscopía electrónica de barrido (MEB); esto se realizó con el fin de identificar si el bagazo de manzana está compuesto de materiales que presenten naturaleza cristalina, para posteriormente relacionar los resultados con los de la actividad enzimática. A su vez, el análisis MEB permitió analizar la morfología del sustrato e identificar si este consiste en un sólido poroso que permita la inoculación

del hongo en este favoreciendo su diseminación y, por ende, presentar una buena actividad enzimática.

3.4.1 Difracción de rayos X

En la figura 3.1 se presenta el difractograma de rayos x realizado al bagazo de manzana.

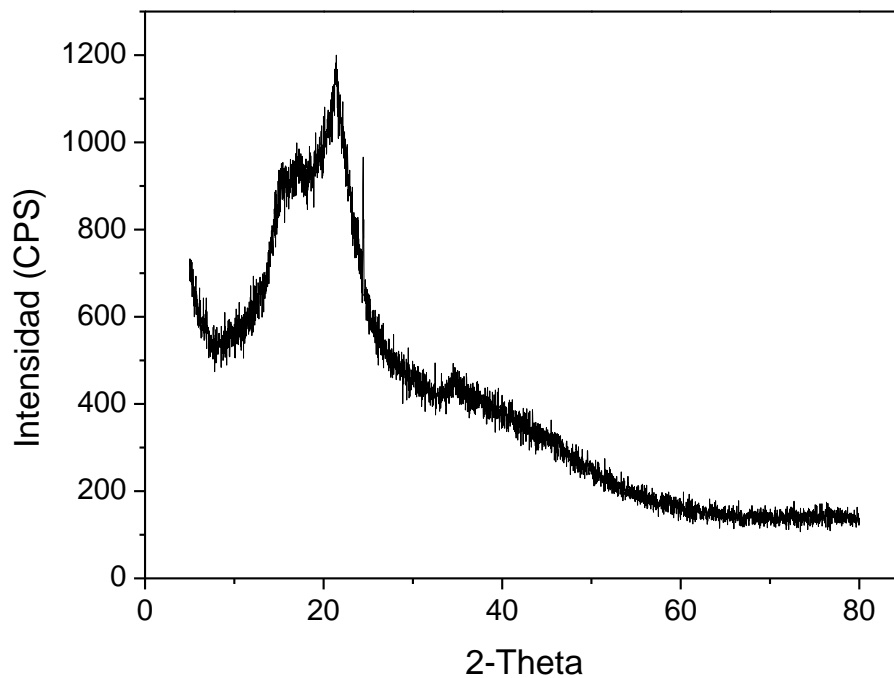


Figura 3. 1 Patrones de rayos X en de bagazo de manzana.

Las señales de difracción de rayos X de la muestra se observan las señales características de la celulosa, y se comparó con la ficha JCPDS de la celulosa nativa Figura 3.2.

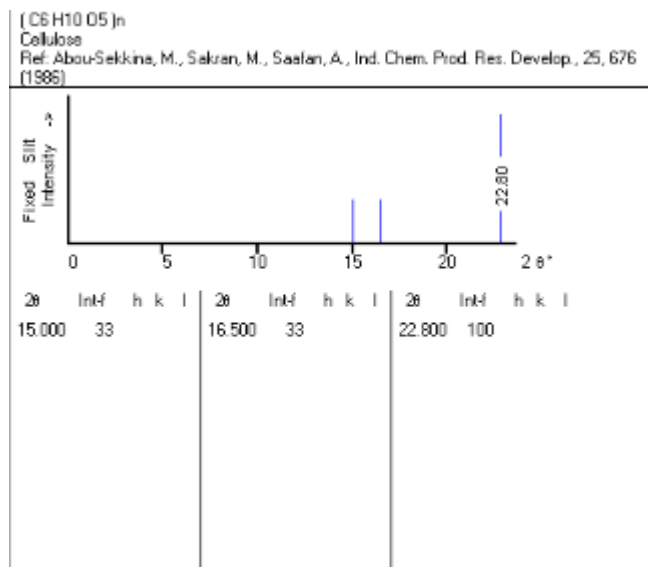


Figura 3. 2 Ficha JCPDS de la celulosa nativa.

El índice de cristalinidad de la celulosa (IC) se calculó a partir de las integrales de pico I (hkl), de acuerdo con la ecuación 3.1 (Terinte *et al.*, 2011).

$$IC = \left[\frac{I_{101} + I_{101} + I_{002}}{I_{101} + I_{101} + I_{002} + I_{Nc}} \right] * 100 \quad \text{EC. 3.1}$$

donde: I_{101} , I_{101} y I_{002} representan el área bajo el plano cristalino y I_{Nc} representa el área de la celulosa no cristalina.

Para llevar a cabo la de convolución de las señales se utilizó el software PeakFit. En la figura 3.3 se muestra la de convolución de las señales de las reflexiones centradas en 15.3, 17 y 22.5 grados de 2 theta, respectivamente; además se consideró una señal respectiva a la sección amorfa (19 de 2θ).

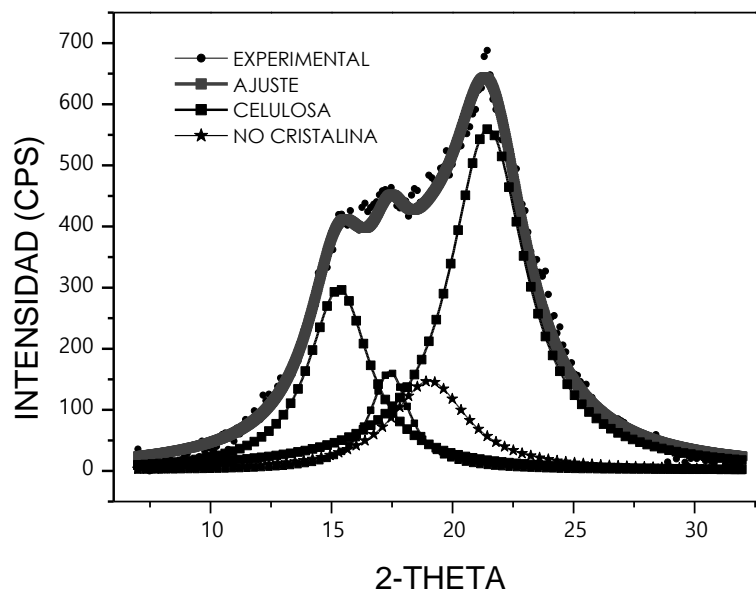


Figura 3. 3 Deconvolución de las señales de celulosa y hemicelulosa no cristalina.

IC = 85.8269861

También mediante este método se calculó el tamaño promedio de cristal utilizando la ecuación de Scherrer (Ec.3.2)

$$L = K\lambda / (B(\theta) \cos\theta) \quad \text{Ec.3.2}$$

donde K es el factor de forma (se usó un valor de 0.9), L es el tamaño medio del cristal, λ es la longitud de onda de la radiación de $\text{CuK}\alpha = 1.5406$, $B(\theta)$ es el ancho completo a media máxima (FWHM) y θ es el Angulo de difracción

En este sentido, el tamaño promedio de cristal para la celulosa, obtenido a partir del plano 200 fue de 29\AA ; Los valores de índice de cristalinidad y tamaño promedio de cristal no están muy alejados de los encontrados por López-Martínez et al. (2016) que obtuvieron celulosa a partir de bagazo de caña con un tratamiento químico, encontrando un tamaño promedio de cristal de 22\AA y Sánchez-Cantú *et al.* (2018) donde analizaron la torta de higuera para usarla como sustrato en la producción de *Pleurotus djamor* teniendo un IC de 86.2 y un menor tamaño de cristal con 21\AA

Es importante obtener estos datos ya que tanto las fases cristalinas que componen al bagazo de manzana como su tamaño promedio de cristal representan un reto para el sistema enzimático ya que afectan fundamentalmente la hidrólisis enzimática. A su vez, la cristalinidad de estos disminuye la accesibilidad de las enzimas al sustrato, en consecuencia, la celulosa amorfa es rápidamente degradada y, a medida que aumenta el grado de cristalinidad, la celulosa comienza a ser resistente a la hidrólisis (Gutiérrez-Rojas *et al.*, 2014).

3.4.2 Microscopia Electrónica de Barrido

Las microscopías del bagazo de manzana pueden observarse en la figura 3.4. en la imagen 3.4a) se puede ver que la muestra consiste en aglomerados de apariencia fibrosa, los cuales son característicos de los residuos lignocelulósicos, en la imagen b) se pueden apreciar con mas detalle las microfibrillas de celulosa.

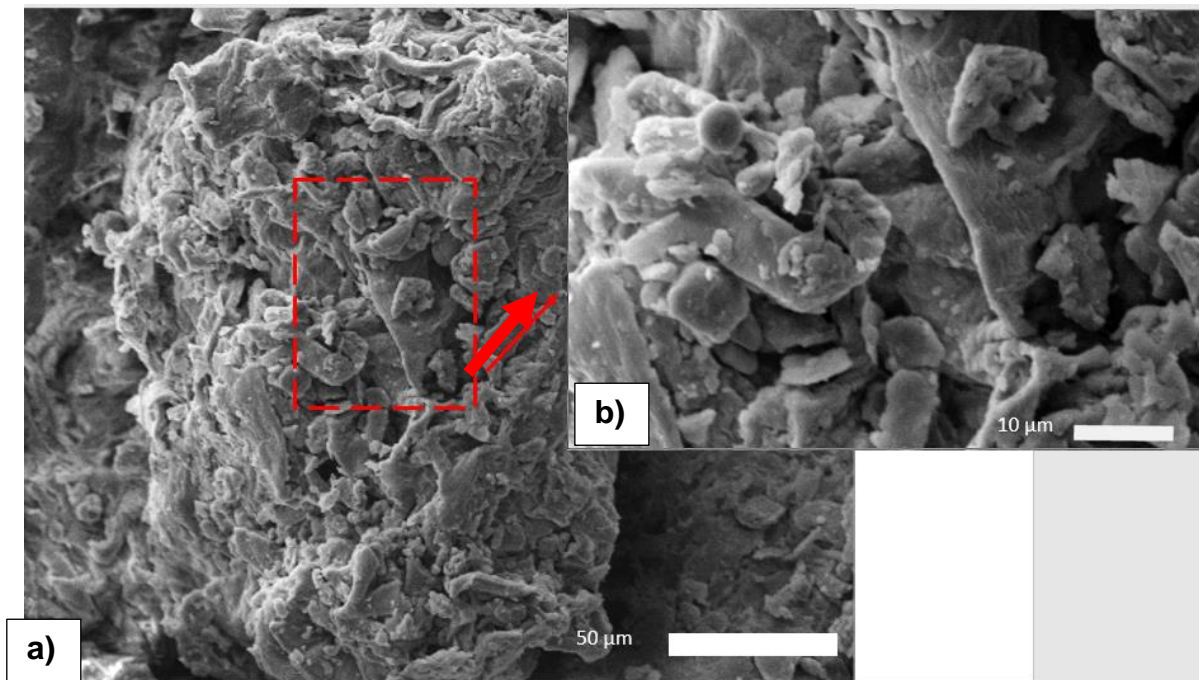


Figura 3. 4 SEM del bagazo de manzana a) muestra fibrosa de celulosa a 50μm

b) ampliación de la imagen a

Mediante la espectroscopia de rayos X de energía dispersa (EDS) puede realizarse un análisis elemental para conocer los elementos presentes en la muestra. Este reveló que el bagazo de manzana contenía principalmente C, O, Si, P, K, Ca y Fe. Los porcentajes en peso se presentan en la tabla 3.4

Tabla 3. 4 Porcentaje en peso de los elementos presentes en el bagazo de manzana.

Elemento	%
Carbono	48.13
Oxígeno	50.18
Silicio	0.17
Fósforo	0.24
Potasio	0.76
Calcio	0.32
Hierro	0.2

La suma de los porcentajes de los minerales presentes en el bagazo de manzana da un total de 1.69% este coincide con el porcentaje de cenizas calculado en el análisis composicional que fue de 1.71%.

3.4 Producción del micelio.

Se utilizó una cepa de *P. ostreatus* (G) y se cultivó a 28°C. Cabe recalcar que empezó a notarse crecimiento del micelio de la caja Petri con agar desde el segundo día de inoculación y la colonización completa se completó en el día 10. En la Figura 3.5 puede verse la propagación completa del micelio de *Pleurotus ostreatus* en la caja Petri.

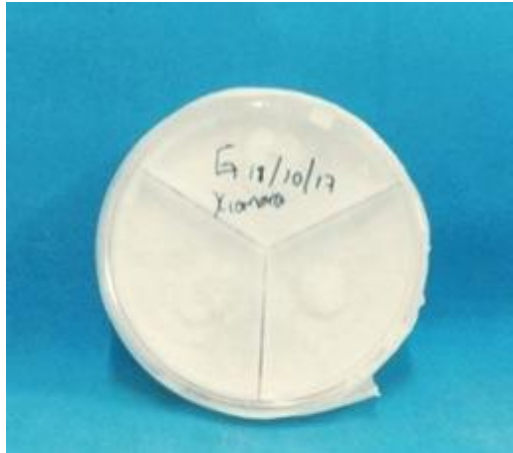


Figura 3. 5 Micelio propagado en caja Petri de *Pleurotus Ostreatus*.

3.5 Activación del micelio.

El micelio de *Pleurotus ostreatus* en la caja Petri inoculado a 10 días fue utilizado para obtener el micelio activado en semilla de trigo frescas. En el día 30 de inoculación se pudo observar la propagación total del micelio en el trigo.

En la Figura 3.6 se muestra el micelio activado en trigo, del cual se tomaron granos para inocular sobre el bagazo de manzana.



Figura 3. 6 Micelio activado de *pleurotus ostretus* en trigo.

3.6 Preparación y acondicionamiento del sustrato.

Por otro lado, para que el bagazo de manzana sea utilizado como sustrato para inocular *Pleurotus ostreatus* fue necesario su acondicionamiento. Primero se aumentó el contenido de agua hasta un 120%. Este fue el más apropiado debido a que con porcentajes menores la fermentación en estado sólido no se llevaba a cabo en su totalidad, quedándose en etapas tempranas del desarrollo micelar, ya que al momento de esterilizar los tubos se perdía agua y se sabe que para el crecimiento del hongo es necesaria una humedad de entre el 80 y 85% (Perez, B. 2006).

Se realizó un diseño experimental con el porcentaje de sustrato y pH a utilizar en el bagazo de manzana el cual se muestra en la tabla 3.5

Tabla 3. 5 Diseño experimental.

Variables independientes			Variables dependientes	
pH	Combinación con soporte %		crecimiento micelar %	
	Bagazo de manzana	Paja	día 3	día 7
5.3	70	30	20	30
	80	20	25	40
	90	10	10	25
3.3	100	0	0	0
5.7	100	0	5	20
6.5	100	0	20	35

De acuerdo con el diseño experimental se realizaron combinaciones del bagazo de manzana con paja de maíz como soporte a diferentes porcentajes, al 70, 80, 90 (pH final de 5.3) y con el 100% de bagazo (pH 3.3), también se realizó un ajuste de pH al bagazo de manzana para no usar la paja como soporte, por lo que se realizaron dos mezclas con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ en una relación 2% con respecto al peso del bagazo de manzana a utilizar como sustrato ajustando (pH final 5.7) y al 3% (pH de 6.5). Todos los reactores se inocularon con micelio activado de la cepa G (*Pleurotus ostreatus*).

En la figura 3.5 se puede apreciar el crecimiento micelial en el tercer y séptimo día de inoculación de acuerdo con el diseño experimental.

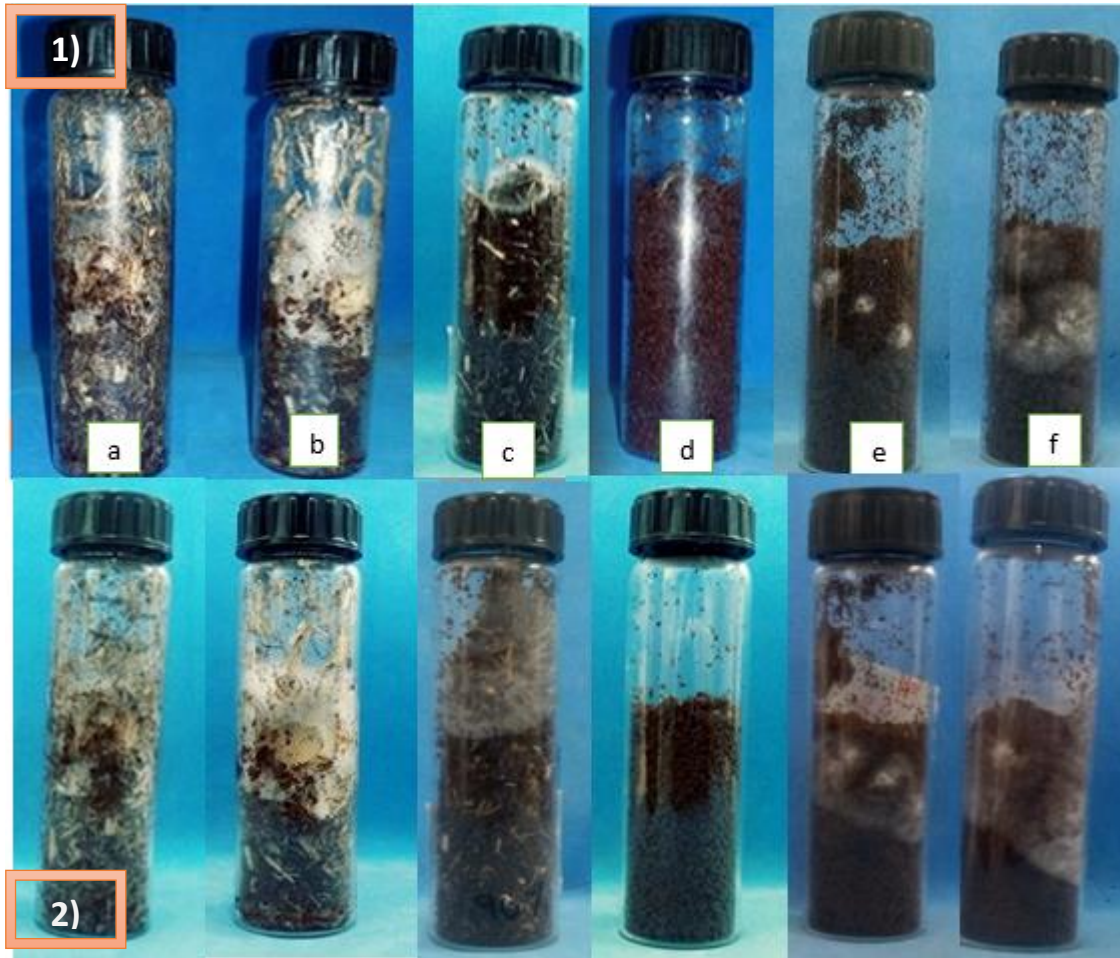


Figura 3. 7 Figura 3.7 Crecimiento micelar del hongo *Pleurotus ostreatus*: **1)** día 3 y **2)** día 7 de inoculación.

(a) 70% b) 80% c) 90% d) 100% a pH 3.3 e) 100% pH 5.7 y f) pH 6.5)

De acuerdo a la tabla 3.5 y la figura 3.7 se puede analizar que la paja fue un gran aporte de carbono para el desarrollo del micelio, el mayor crecimiento de micelio se muestra en el reactor con 80% de bagazo de manzana y 20% de paja. Por otro lado, para el séptimo día de inoculación este presentaba una propagación micelar del

40%; sin embargo, no hubo crecimiento del hongo con el 100% de bagazo de manzana debido al pH ácido del sustrato, ya que el hongo requiere un intervalo de pH entre 6-7 para el desarrollo del micelio (Perez, B. 2006).

Sin embargo, al ajustar el pH con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ observó crecimiento micelar a los 3 días de inoculación y en el séptimo día de inoculación después del ajuste de pH a 5.7 se presentó un crecimiento micelar del 20% y con un pH de 6.5 del 35%.

De acuerdo a los resultados obtenidos se tomó la decisión de no utilizar el soporte (paja), debido a que no se apreció una gran diferencia en la velocidad de crecimiento del micelio del hongo *Pleurotus ostreatus* con el 80% de bagazo de manzana sin ajustar el pH y ajustando el pH del sustrato a 6.5. En la figura 3.8 se muestra el estudio realizado del crecimiento micelar del hongo *Pleurotus ostreatus* durante los 27 días de inoculación (Figura 3.8).

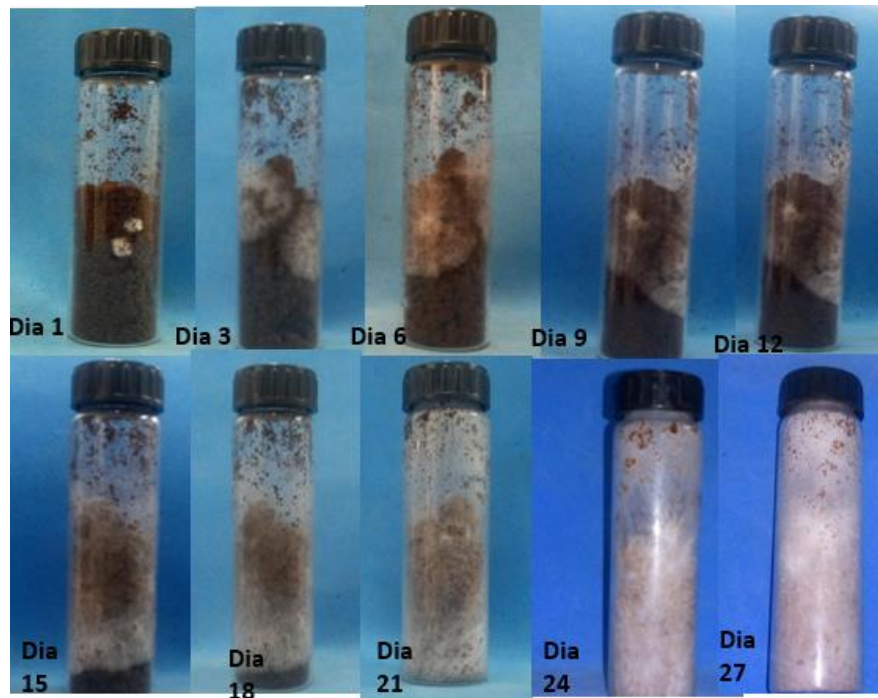


Figura 3. 8 Crecimiento del micelio durante 27 días del hongo *Pleurotus Ostreatus*.

3.7 Actividad enzimática

La actividad enzimática que es la cantidad de enzima que degrada sustrato en un tiempo determinado, En este caso se midieron la actividad de 3 enzimas

hidrolasas (celulasas, xilanasas y pectinasas), las cuales degradan xilano, celulosa y ácido poligalacturónico, respectivamente. La actividad enzimática se reportó en Unidades Internacionales (U), definiendo la U como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de azúcares por minuto en las condiciones de la reacción. Para cada fermentación la actividad se expresó en U por gramos de sustrato seco (U/gss).

Para esta determinación se realizaron curvas de calibración de glucosa, xilosa y d-galacturónico para conocer la concentración de azúcares liberados durante la fermentación.

3.7.1 Actividad enzimática: celulasas

La actividad enzimática de las enzimas celulasas se presenta en la figura 3.9, la cual se determinó durante 27 días de inoculación del hongo. El día de mayor actividad fue el día 15 con 119.07 ± 4.83 U/gss, lo cual se atribuye a que en este día de inoculación el hongo ya se propagó en el sustrato y ya hay degradación de lignina y hemicelulosa que son las que protegen a las microfibrillas de celulosa y esta queda expuesta, esto sucede por la acción de otras enzimas que también están presentes en el coctel enzimático. Después del día 15 la actividad empieza a disminuir, así como la concentración de celulosa.

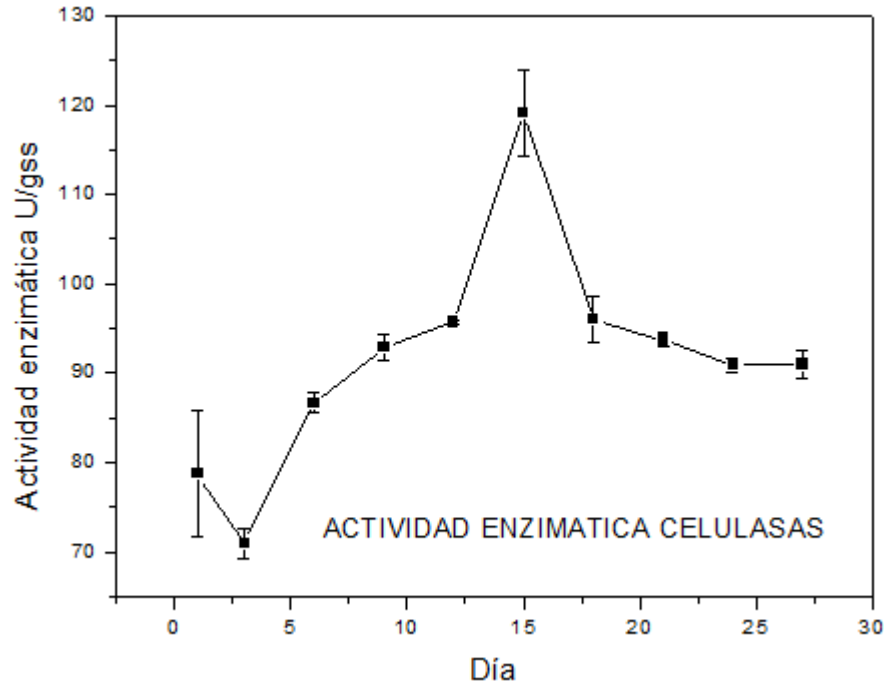


Figura 3. 9 Actividad enzimática de las enzimas celulasas.

La actividad de las celulasas del hongo *Pleurotus ostreatus* inoculado en el bagazo de manzana fue once veces mayor que la encontrada por Kumaran *et al.* (1997) donde obtuvieron una actividad de celulasas de 10.1 U/gss en el día 9 de inoculación, empleando *P. ostreatus* en residuos agrícolas enriquecidos con urea y sales de fosfato. Así mismo, Marquez *et al.* (2007) que usaron como sustrato bagazo de caña tuvieron la actividad máxima el día 19 fue de 1.16 U/gss estas diferencias en las actividades puede ser debido a que la celulosa del bagazo de manzana se encuentra más disponible a la degradación, posteriormente la concentración disminuye, a esto se le atribuye el decremento de actividad después del día 15 de inoculación fue bajando la concentración de celulosa.

3.7.2 Actividad enzimática: xilanasas

La actividad enzimática de las enzimas xilanasas se puede observar en la figura 3.10. Las enzimas presentaron un primer máximo de actividad para el día 9 de la fermentación (16.90 ± 0.62 U/gss) y posteriormente descendió hasta 9.06 ± 0.66 U/gss y volvió a ascender alcanzando la máxima actividad el día 18 con 16.94 ± 0.04 U/gss.

Este mismo comportamiento fue encontrado por Luna *et al.* (2013) en el que utilizaron rastrojo de cebada como sustrato para inocular *Pleurotus Ostreatus* en fermentación sólida, donde las xilanasas mostraron mayor actividad a los 12 días de FES (80.5 U/gss) con un segundo incremento el día 25 de 67.2 U/gss. Estos resultados demuestran que la actividad de las xilanasas depende del tipo de la estructura celular que integra al sustrato y su composición con respecto a la parte lignocelulósica.

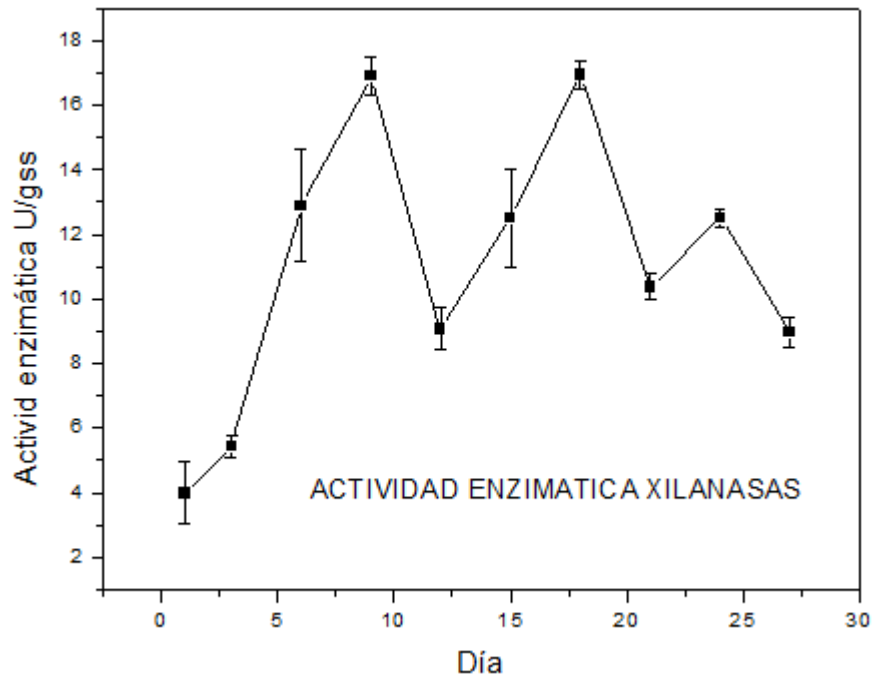


Figura 3. 10 Actividad enzimática xilanasas

3.7.3 Actividad enzimática: pectinasas

La actividad de las pectinasas puede observarse en la figura 3.11. En estas enzimas se observa la menor actividad en el día 3 de inoculación siendo de 7.64 ± 0.31 U/gss posteriormente asciende hasta alcanzar la máxima actividad en el día 15 de 16.30 ± 0.87 U/gss que es igual a 14.9 U/mL. La actividad presentada es mayor a la reportada por Pereira *et al.* (2017) en donde evaluaron la producción de cuerpos frutales y pectinasas por *Pleurotus ostreatus*, utilizando residuos de cebolla como sustrato en la fermentación en estado sólido. El extracto crudo del sustrato gastado generado por el cultivo de *P. ostreatus*, mostró una actividad de pectinasa de 4.82 U/mL. La diferencia en ambas actividades puede deberse a que en el presente

trabajo se midió la actividad durante el crecimiento del micelio, y Pereira *et al* evaluó la actividad durante la etapa fructífera del hongo

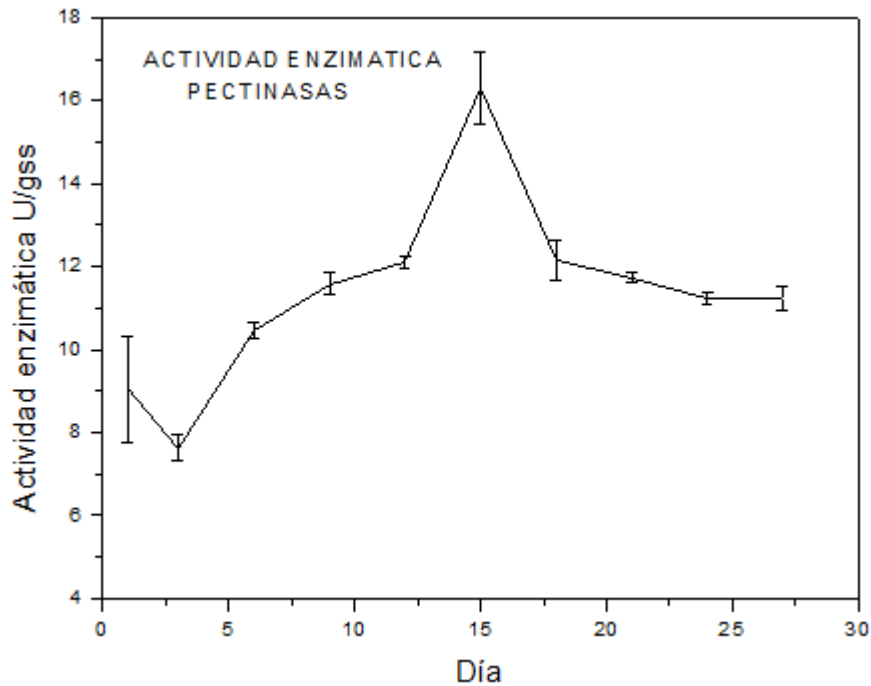


Figura 3. 11 Actividad enzimática pectinasas

Por otro lado, por Inácio *et al.* (2015) inocularon *Pleurotus pulmonarius* en fermentación sólida sobre residuos de naranja como sustrato, presentando la actividad enzimática de pectinasas de 9.4 U / mL después de 35 días de cultivo. Por lo general, los residuos de naranja seca contienen hasta un 12% de fibra cruda en donde está incluida la pectina y celulosa, en el bagazo de manzana este valor fue mucho mayor (28.53%), y a esto se atribuyó la diferencia en las actividades, ya que las pectinasas son las encargadas de hidrolizar la pectina, por lo que la concentración de esta en el sustrato influye en la actividad enzimática.

En la Figura 3.12 se pueden analizar las actividades de las enzimas extracelulares producidas por *P. ostreatus* (xilanasas, celulasas y pectinasas) en la biomasa de bagazo de manzana. Está claro que las celulasas exhibieron una mayor actividad en comparación con las xilanasas y pectinasas; sin embargo, las 3 presentaron la máxima actividad a partir de los 15 días de inoculación y después

tuvieron un decremento, lo que se puede atribuir a que tal vez bajo la concentración de celulosa, hemicelulosa y pectina respectivamente en los últimos días de inoculación y la formación de azúcares a través de la fermentación como xilosa y glucosa que son inhibidores de la actividad enzimática (Mandels & Reese 1960; Bartley & Knee, 1982).

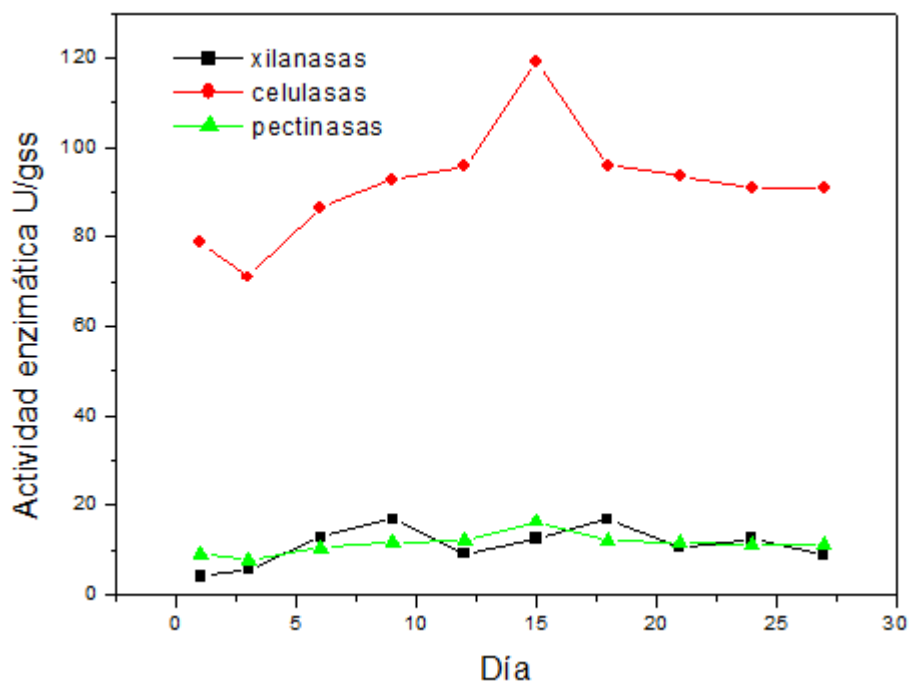


Figura 3. 12 Comparación de las actividades enzimáticas de las enzimas extracelulares de *Pleurotus ostreatus*

Estos resultados demuestran que *P. ostreatus* es un productor eficiente de estas enzimas industriales importantes, como lo son xilanasas, celulasas y pectinasas en un sistema de sustrato sólido y barato que es el bagazo de manzana.

3.8 Actividad enzimática específica

Se define la actividad específica como el número de micromoles de producto formado por minuto por miligramo de proteína (U/mg proteína), de una manera general se puede decir que la actividad específica de una enzima es igual a la velocidad máxima por miligramos de enzima (Arriaga *et al.*, 1979).

Dentro de la tabla 3.6 se muestran las actividades específicas de las enzimas xilanasas, celulasas y pectinasas. La actividad específica máxima de la xilanasas en

el bagazo de manzana se observó en el día 3 (0.58 ± 0.03 U/mg) este resultado fue cuatro veces más grande al encontrado por Reddy *et al.* (2003) en residuos agrícolas de banano donde la actividad específica máxima fue el día 20 (0.1435 U/mg). En las enzimas celulasas la actividad específica fue de 0.054 ± 0.014 U/mg de proteína en el bagazo de manzana el día 12, por su parte Márquez *et al.* (2007) obtuvieron la actividad específica máxima de 10.00 U/mg de proteína a 19 días de fermentación sólida en bagazo de caña de azúcar, esto se puede atribuir a la cantidad de proteína presente en cada sustrato. La actividad específica máxima de las pectinasas fue de 0.37 ± 0.07 U/mg proteína el día 6 de la fermentación.

Tabla 3. 6 Actividades específicas de las enzimas extracelulares de *pleurotus ostreatus* inoculado en bagazo de manzana.

Tiempo (Días)	Actividad específica (U/mg proteína)		
	xilanasas	celulasas	pectinasas
1	0.45 ± 0.04	0.048 ± 0.028	0.22 ± 0.02
3	0.58 ± 0.03	0.044 ± 0.0007	0.27 ± 0.04
6	0.17 ± 0.03	0.034 ± 0.03	0.37 ± 0.07
9	0.33 ± 0.02	0.058 ± 0.004	0.25 ± 0.03
12	0.54 ± 0.10	0.054 ± 0.014	0.27 ± 0.05
15	0.35 ± 0.04	0.038 ± 0.036	0.13 ± 0.07
18	0.31 ± 0.02	0.044 ± 0.10	0.31 ± 0.01
21	0.45 ± 0.08	0.052 ± 0.09	0.30 ± 0.03
24	0.31 ± 0.009	0.042 ± 0.008	0.28 ± 0.02
27	0.32 ± 0.004	0.029 ± 0.02	0.19 ± 0.002

Se pueden percibir las diferencias entre las actividades enzimáticas específicas en la figura 3.13, hay un gran cambio entre las actividades específicas y la actividad enzimática, esto se debe a que la técnica utilizada para medir la actividad enzimática es una técnica colorimétrica para la hidrólisis de los polisacáridos presentes en la muestra y cuantifica los azúcares reductores liberados durante la fermentación, para la actividad específica se utilizó el método de lowry el cual aunque también un método

calorimétrico este cuantifica la concentración de proteínas en el sustrato; las celulasas fueron las de mayor actividad enzimática, es decir se encontró una gran liberación de glucosa, pero fue la de menor actividad específica es decir es menor el producto que se forma por proteína (Arriaga *et al.*, 1979; Miller 1959; Lowry 1951) . La enzima con mayor actividad específica es la enzima xilanasas es decir fue la que tuvo una mayor afinidad con el sustrato (bagazo de manzana)

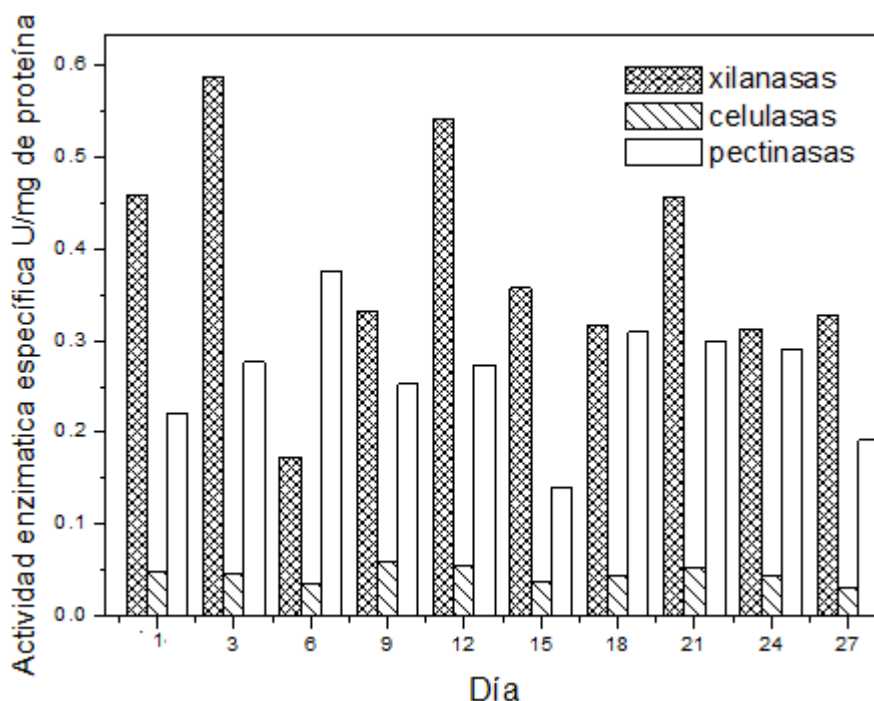


Figura 3. 13 Actividad enzimática específica de las enzimas extracelulares de *Pleurotus ostreatus*.

3.9 Pretratamiento enzimático

Posteriormente de la determinación de actividad enzimática, los extractos enzimáticos de los días de mayor actividad para xilanasas (día 18), celulasas y pectinasas (día 15), fueron diluidos en proporción 1:1 con buffer de citratos 5.3, 4.8 y buffer de acetatos a 4.8, respectivamente. Estos fueron inoculados y después incubados a 30°C en bagazo de manzana durante 20 días con el fin de cuantificar el consumo de los componentes de la pared celular; celulosa, hemicelulosa y lignina; así como medir la actividad enzimática y la producción de azúcares durante el tratamiento.

3.10.1 Cuantificación de celulosa durante el pretratamiento enzimático

En la figura 3.14 se muestran los porcentajes de celulosa durante el tratamiento de las enzimas extracelulares, estos son bastante interesantes, ya que al quinto día de incubación con las 3 enzimas se presentó un incremento de celulosa, siendo el menor el de las enzimas pectinasas, este aumento de concentración puede deberse a que los primeros días de inoculación enzimática no hay una buena eliminación de lignina y hemicelulosa que son las microfibrillas que protegen a la celulosa de la degradación, posteriormente durante los días siguientes los porcentajes decaen, para el final del tratamiento había bajado hasta un 74.31% del contenido inicial, el tratamiento con pectinasas se obtuvo un porcentaje de celulosa muy parecido al final del tratamiento se tenía 74.5%. por su parte las celulasas fueron las que presentaron mayor degradación de celulosa en el bagazo de manzana, decayendo 30.87%.

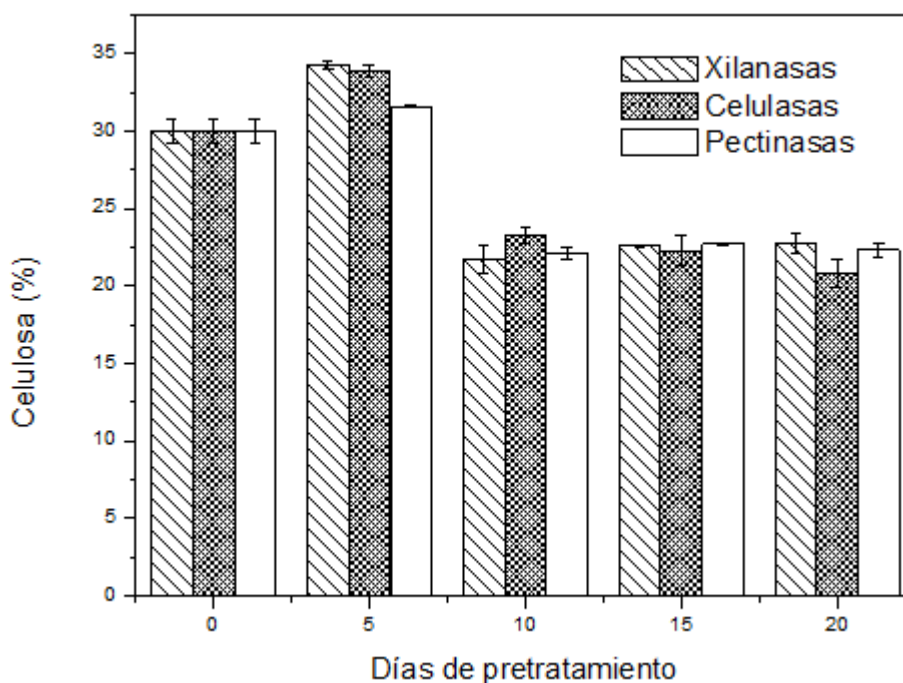


Figura 3. 14 Cuantificación de la celulosa durante el tratamiento enzimático.

3.10.2 Cuantificación de hemicelulosa durante el pretratamiento enzimático

La degradación de la hemicelulosa durante el tratamiento se presenta en la Figura 3.15. El bagazo de manzana con el tratamiento en las 3 enzimas presentó una degradación del 31% para el día 10, al final del tratamiento en el día 20 la mayor degradación de hemicelulosa fue con las enzimas xilanasas llegando a 4.54%, con una degradación de 55.64%. y con las celulasas y pectinasas los valores fueron muy parecidos, 5.87% y 5.74% de hemicelulosa, respectivamente.

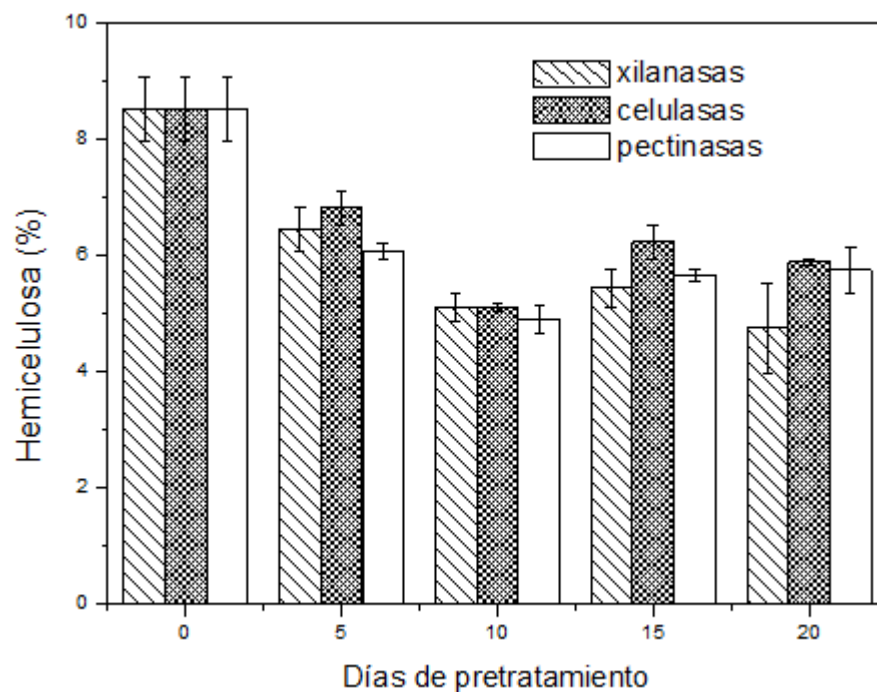


Figura 3. 15 Cuantificación de hemicelulosa durante el tratamiento enzimatico.

Los resultados obtenidos coinciden con Sánchez-Cantú *et al.*, 2018 en el que realizaron un pretratamiento sobre torta de ricino empleando xilanasas y celulasas producidas a partir del hongo *Pleurotus djamor* durante 15 días, encontrando que empleando las enzimas celulasas los valores de hemicelulosa permanecieron prácticamente sin cambios durante el tratamiento, mientras que se verificó que los valores de hemicelulosa disminuyeron progresivamente durante todo el tiempo de incubación alcanzando una degradación de 58.3%. Esta eficiencia de las xilanasas se

puede deber a que son específicas para hidrolizar xilano, el cual es el principal tipo de hemicelulosa (Anthony P. *et al.*, 2016).

3.10.3 Cuantificación de lignina durante el pretratamiento

La lignina es el componente más importante de degradación durante el tratamiento ya se emplearon las enzimas extracelulares de *Pleurotus ostreatus* el cual es un buen degradador de lignina a través de enzimas extracelulares (Stajic *et al.*, 2006). En la figura 3.16 se muestran los porcentajes de lignina cada cinco días de incubación de las enzimas, donde se observa una disminución del porcentaje de lignina con las 3 enzimas hasta el día 10 de inoculación, después incrementa y vuelve a disminuir al final del pretratamiento esto se relaciona con la actividad enzimática, en estos días de pretratamiento se encontró la presencia de azúcares que son inhibidores de la misma, por lo que se aumentó la concentración de este componente, las enzimas celulasas degradaron un 51.3% el porcentaje de lignina en el bagazo de manzana, seguido de las pectinasas, las cuales alcanzaron un 56% aunque en el día 10 del tratamiento llegaron a degradar hasta un 52%, por su parte las enzimas xilanasas degradaron un 60% de la lignina en el sustrato.

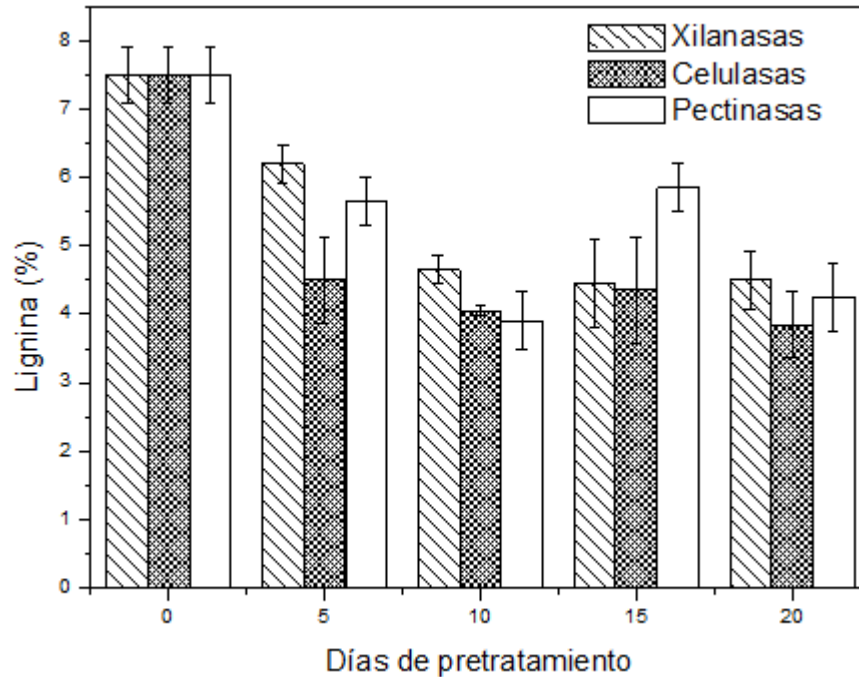


Figura 3. 16 Cuantificación de lignina durante el tratamiento enzimático.

De los 3 polisacáridos de la pared celular del bagazo de manzana, la lignina fue el componente mayormente degradado seguido de la hemicelulosa y el porcentaje de menor degradación fue la celulosa, pues es sabido que para degradar esta última es necesario remover la lignina y hemicelulosa, pues están entrelazadas en una matriz, se puede observar que todas las enzimas degradan lignina ya que es la función principal de las enzimas extracelulares de *Pleurotus Ostreatus* así como también dentro de estas se encuentran las lacasas que aunque no fueron cuantificadas, se pueden encontrar estables en el buffer de acetatos pH 4.8 que se utilizó y es sabido que estas son las principales degradadoras de este componente (Sánchez-Riaño *et al.*, 2014; Sánchez-Cantú *et al.*, 2018; Ramírez *et al.*, 2003).

3.12 Actividad enzimática y azúcares durante el tratamiento.

Durante el tratamiento se midió la actividad enzimática cada 5 días, así como los azúcares producidos ya que estos valores están relacionados entre sí, la velocidad inicial de una reacción catalizada por una enzima depende de la concentración de

sustrato, cuando estas hidrolizan celulosa, hemicelulosa lignina y pectina, los enlaces se rompen y liberan azúcares reductores, sin embargo, cuando se alcanza la máxima velocidad de reacción, estos llegan a una saturación y la actividad desciende (Champe &Harvey, 1994).

Este comportamiento se puede observar en los 3 gráficos de actividad y los azúcares producidos por cada enzima, para poder hacer una comparación entre los mismos, la figura 3.17 muestra la actividad y los azúcares producidos durante el tratamiento por las enzimas celulasas, figura 3.18 actividad y azúcares producidos durante el tratamiento enzimático con enzimas xilanasas, y figura 3.19 actividad enzimática con los azúcares producidos durante el tratamiento enzimático con enzimas pectinasas.

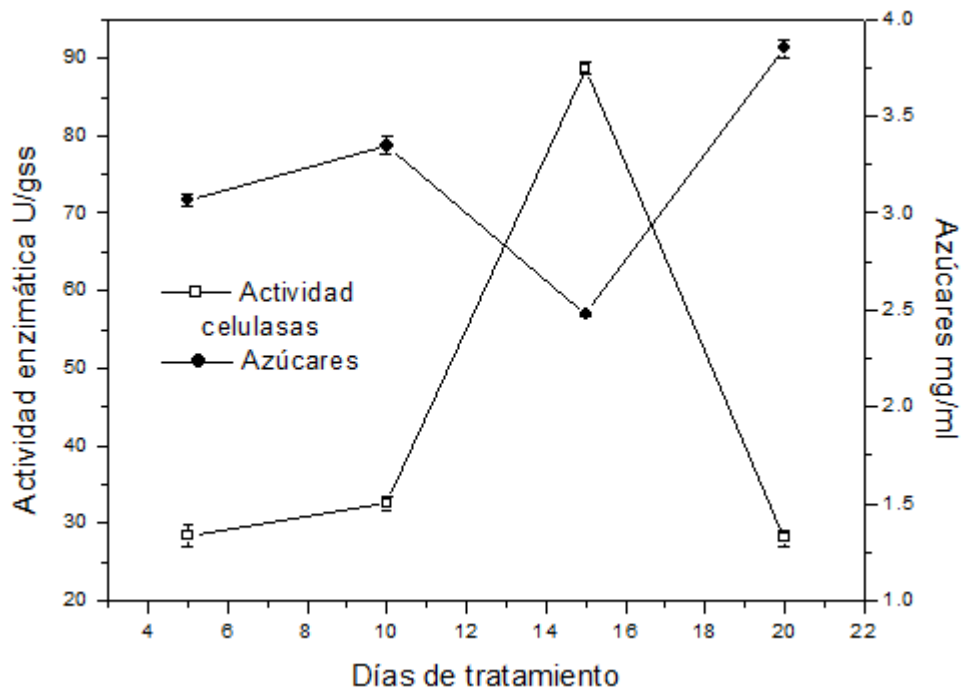


Figura 3. 17 Actividad de las enzimas celulasas y azúcares producidos durante el tratamiento enzimático.

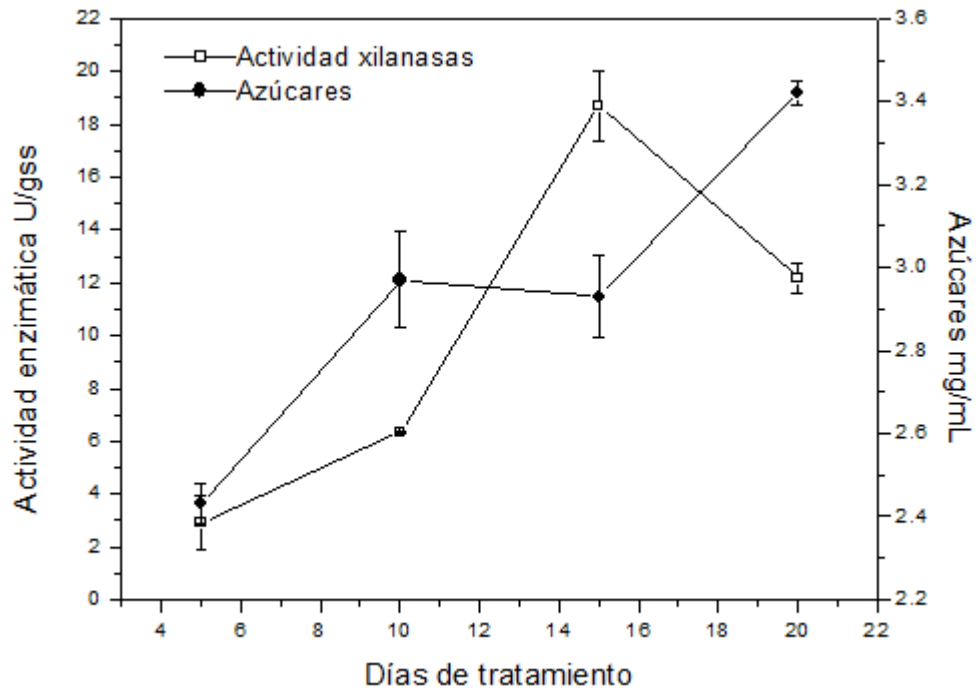


Figura 3. 18 Actividad y azúcares producidos durante el tratamiento enzimático con enzimas xilanasas.

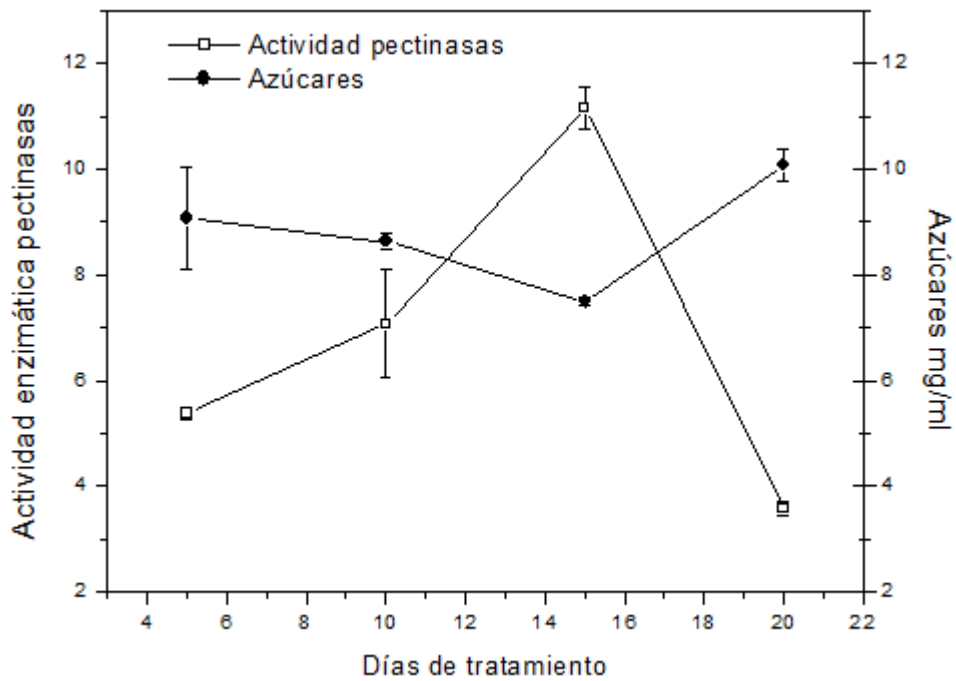


Figura 3. 19 Actividad y azúcares producidos durante el tratamiento enzimático con enzimas pectinasas.

Se puede analizar con los tres tratamientos enzimáticos que al inicio del tratamiento la actividad enzimática va en ascenso hasta alcanzar la actividad máxima el día 15 de inoculación siendo las celulasas las enzimas de mayor actividad, seguido por las xilanasas y pectinasas, posteriormente empieza a descender; la producción de azúcares también aumenta conforme avanzan los días en tratamiento sin embargo esto disminuye cuando la actividad máxima se alcanza, esto coincide con lo encontrado por Jorgensen *et al.*, 2007 debido a que cuando se presenta mayor concentración de azúcar hay un menor rendimiento enzimático ya que esta inhibe la actividad enzimática, como se puede observar con los gráficos que las enzimas xilanasas fueron las que produjeron menos azúcares y las enzimas pectinasas fueron las que tuvieron mayor rendimiento de estos, no obstante presentan la actividad más baja.

Bibliografía capítulo 3

- Ángel, A. R., Interián L. y Esparza R. M. (2013). Principios básicos de bromatología para estudiantes de nutrición. Estados Unidos de América: Palibrio LLC.
- Anthony, P., Harish, B. S., Jampala, P., Ramanujam, S., & Uppuluri, K. B. (2016). Statistical optimization, purification and applications of xylanase produced from mixed bacteria in a solid liquid fermentation using *Prosopis juliflora*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 8, 213-220
- Bartley I& Knee M. The Chemistry of Textural Changes in Fruit During Storage. *Food Chem.* 1982;9:47-58.
- Barreiro, J. y Sandoval, A. (2006). Operaciones de conservación de alimentos por bajas temperaturas. Caracas, Venezuela: Equinoccio.
- Belén-Camacho, D. R., Román, J. C., García Pantaleón, D., Moreno-Álvarez, M. J., Medina Martínez, C., & Ojeda Escalona, C. E. (2007). Efecto del secado solar en los contenidos de humedad, carbohidratos, carotenoides totales e índice de peróxidos del mesocarpio de la palma coroba (*Attalea spp.*). *Interciencia*, 32(4), 257-261.
- Bolaños, N., Herrera, C. H. y Lutz, G. (2003). Química de los Alimentos: Manual de Laboratorio. Costa Rica: Editorial de la Universidad de Costa Rica
- Cai Q, Yue X & Niu T. (2004). The screening of culture condition and properties of xylanase by white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Process Biochemistry*, 39(11), 1561-1566.
- Calvo, C. y Mendoza, E. (2010). Bromatología: composición y propiedades de los alimentos. México, D.F.: Mc Graw Hill.
- Cameron y Esty (1940). Construcción de curvas de penetración de calor. En Academia del Área de Plantas Piloto de Alimentos (*Ed*). Introducción a la Tecnología de Alimentos. México, DF: Limusa
- Caravaca, F. P. et. al (2003). Composición analítica de los alimento. *Bases de la producción animal*. 1 (16).

- Chen, H., Rubenthaler, G. L., Leung, H. K., & Baranowski, J. D. (1988). Chemical, physical, and baking properties of apple fiber compared with wheat and oat bran. *Cereal Chem*, 65(3), 244-247.
- Cho S, DeVries JW, Prosky L. (1997) Dietary Fiber Analysis and Applications. Gaithersburg, MD: AOAC; 1997
- Cummings et. al. (1997). Consulta de FAO/OMS de expertos sobre los carbohidratos en la nutrición humana. 66. Roma
- De Arriaga, M. D., Soler. M., Busto. F., Cadenas.E. (1979). *Cinética enzimática: manejo de datos*. Universidad de Oviedo.
- Dhillon, G. S., Kaur, S., & Brar, S. K. (2013). Perspective of apple processing wastes as low-cost substrates for bioproduction of high value products: a review. *Renewable and sustainable energy reviews*, 27, 789-805.
- Egan, H., Kirk, R. S. y Sawyer, R. (1996). Composición y análisis de alimentos de PEARSON. México: Patria
- Figuerola, F., Hurtado, M. L., Estévez, A. M., Chiffelle, I., & Asenjo, F. (2005). Fibre concentrates from apple pomace and citrus peel as potential fibre sources for food enrichment. *Food Chemistry*, 91(3), 395-401.
- Fuller, M. et. al. (2005). Determination of Amino Acid Bioavailability in Humans and Model Animals. En Martínez, A. y Muñoz, V (Ed). *Proteínas y péptidos en nutrición enteral*. Scielo. 21 (1). Madrid, España.
- Gómez, J. P. G. (2008). Producción de *Pleurotus ostreatus* sobre residuos sólidos lignocelulósicos de diferente procedencia. *Nova*, 6(10), 126-140.
- Gray J (2006) Dietary fiber definition, analysis, physiology & health. In Champ M (ed) Brussels, Belgium: ILSI Europe. En subproducto de la cebolla.
- Gullón, B., Falqué, E., Alonso, J. L., & Parajó, J. C. (2007). Evaluation of apple pomace as a raw material for alternative applications in food industries. *Food Technology and Biotechnology*, 45(4), 426-433.
- Gurpreet D. Surinder.K, S., & Satinder, S. K.B (2013). Perspective of apple processing wastes as low-cost substrates for bioproduction of high value products: a review. *Renewable and sustainable energy reviews*, 27, 789-805

- Gutiérrez-rojas, I., Moreno-sarmiento, N., & Montoya, D. (2014). Mecanismos y regulación de la hidrólisis enzimática de celulosa en hongos filamentosos: casos clásicos y nuevos modelos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 32(1), 1-12.
- Higuchi T. (1990). Lignin biochemistry: biosynthesis and biodegradation. *Wood Sci. Technol.* 24, 23-63
- Inácio, F. D., Ferreira, R. O., De Araujo, C. A. V., Peralta, R. M., & De Souza, C. G. M. (2015). Production of Enzymes and Biotransformation of Orange Waste by Oyster Mushroom, *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Qué. *Advances in Microbiology*, 5(01), 1.
- Jay, J. M. (2000). *Microbiología moderna de los alimentos*. España: Acribia.
- Jorgensen, H., Kristensen, J. B., & Felby, C. (2007). Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 1(2), 119-134.
- Koolman J. y Röm, K. H. (2004). *Bioquímica: texto y atlas*. Alemania: Panamericana.
- Kumaran, S. S. C. A., Sastry, C. A., & Vikineswary, S. (1997). Laccase, cellulase and xylanase activities during growth of *Pleurotus sajor-caju* on sagohampas. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 13(1), 43-49.
- López-Rodríguez, C., Hernández-Corredor, R., Suárez-Franco, C., & Borrero, M. (2008). Evaluación del crecimiento y producción de *Pleurotus ostreatus* sobre diferentes residuos agroindustriales del departamento de Cundinamarca. *Universitas Scientiarum*, 13(2).
- Luna L, Meneses M, Mendoza G, Montalvo C y Loera O 2013: Efecto y actividad enzimática de *Pleurotus ostreatus* en pared celular de rastrojo de cebada. *Livestock Research for Rural Development*. 25, Article #223. Recuperado el 11 de octubre 2018 <http://www.lrrd.org/lrrd25/12/luna25223.htm1-8>.
- Márquez-Araque, A. T., Mendoza Martínez, G. D., González Muñoz, S. S., Buntinx Dios, S. E., & Loera Corral, O. (2007). Actividad fibrolítica de enzimas producidas por *Trametes* sp. EUM1, *Pleurotus ostreatus* IE8 y *Aspergillus niger* AD96. 4 en fermentación sólida. *Interciencia*, 32(11), 780-785.

- Matissek, R., Schnepel, F. M. y Steiner, G. (1992). Análisis de los alimentos: fundamentos, métodos, aplicaciones. Alemania: Acribia
- Mandels, M., & Reese, E. T. (1960). Induction of cellulase in fungi by cellobiose. *Journal of Bacteriology*, 79(6), 816.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing
- Mitchell, D. A., von Meien, O. F., Krieger, N., & Dalsenter, F. D. H. (2004). A review of recent developments in modeling of microbial growth kinetics and intraparticle phenomena in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 17(1), 15-26
- Moreno, R. (2000) . Nutrición y Dietética para los tecnólogos de alimentos. Madrid, España: Editorial Ediciones Díaz Santos S.A
- O'shea, N., Ktenioudaki, A., Smyth, T. P., McLoughlin, P., Doran, L., Auty, M. A. E., ... & Gallagher, E. (2015). Physicochemical assessment of two fruit by-products as functional ingredients: Apple and orange pomace. *Journal of food engineering*, 153, 89-95
- Pereira, G. S., Cipriani, M., Wisbeck, E., Souza, O., Strapazzon, J. O., & Gern, R. M. (2017). Onion juice waste for production of *Pleurotus sajor-caju* and pectinases. *Food and Bioproducts Processing*, 106, 11-18.
- Perez, B. (2006) descripción de las características macroscópicas del cultivo in vitro de cepas de *pleurotus* aisladas en Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de ciencias químicas y farmacia, 11-14. *Bioagro*, 23(1), 19-26. Recuperado el 24 de Febrero de 2016
- Ramírez, N. E., Vargas, M. C., Ariza, J. C., & Martínez, C. (2003). Caracterización de la lacasa obtenida por dos métodos de producción con *Pleurotus ostreatus*. *Revista colombiana de biotecnología*, 5(2), 64-72.
- Reddy, G. V., Babu, P. R., Komaraiah, P., Roy, K. R. R. M., & Kothari, I. L. (2003). Utilization of banana waste for the production of lignolytic and cellulolytic enzymes by solid substrate fermentation using two *Pleurotus* species (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*). *Process Biochemistry*, 38(10), 1457-1462.
- Sánchez Riaño, A. M., Rivera Barrero, C. A., & Murillo Perea E. (2010). Perspectivas de uso de subproductos agroindustriales para la producción de

- bioetanol. *Revista Tumbaga* 17(46)
- Sánchez, J. E., & Royse, D. J. (2001). *La biología y el cultivo de Pleurotus spp* (No. 635.8 S211b). México, MX: Limusa.
- Sánchez Riaño, A. M., Rivera Barrero, C. A., & Murillo Perea E. (2010). Perspectivas de uso de subproductos agroindustriales para la producción de bioetanol. *Revista Tumbaga* 17(46)
- Sánchez-Cantú, M., Ortiz-Moreno, L., Ramos-Cassellis, M. E., Marín-Castro, M., & De la Cerna-Hernández, C. (2018). Solid-state treatment of castor cake employing the enzymatic cocktail produced from *Pleurotus djamor* fungi. *Applied biochemistry and biotechnology*, 185(2), 434-449.
- Stajic, M., Persky, L., Friesem, D., Hadar, Y., Wasser, SP., Nevo, E. and Vukojevic, J. (2006). Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected *Pleurotus* species. *Enzyme and Microbiology Technology* 38, 65-73.
- Viñas et. al. (2013). *Poscosecha de pera, manzana y melocotón*. España: Mundi-Prensa
- Yan, H., & Kerr, W. L. (2013). Total phenolics content, anthocyanins, and dietary fiber content of apple pomace powders produced by vacuum-belt drying. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(6), 1499-1504.

CONCLUSIONES

Conclusiones:

- 1 El análisis composicional del bagazo de manzana reveló que es fuente de carbohidratos estructurales, los cuales son esenciales para que el hongo *Pleurotus ostreatus* se desarrolle y produzca enzimas.
- 2 El hongo *Pleurotus ostreatus* tiene la capacidad de crecer sobre el bagazo de manzana sin necesidad de usar algún material de soporte, solo con las condiciones de humedad y pH óptimos para el crecimiento.
- 3 La producción de enzimas hidrolasas por el hongo *Pleurotus ostreatus* se puede llevar a cabo de forma factible presentando la mayor actividad a la mitad de la fermentación, siendo las enzimas celulasas las de mayor rendimiento ya que el residuo está compuesto principalmente de celulosa.
- 4 Se confirma la importancia de las enzimas extracelulares del hongo *Pleurotus ostreatus* en la biodegradación de lignocelulosa.
 - Se sugiere continuar con la purificación de los extractos enzimáticos para la obtención de enzimas puras. Además de realizar la cuantificación de enzimas lacasas que también son excretadas por el hongo *Pleurotus ostreatus* y han sido relacionadas con la degradación de compuestos lignocelulósicos.