



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

**“PRETRATAMIENTO DE LOS RESIDUOS
LIGNOCELULÓSICOS PROVENIENTES DE LA
EXTRACCIÓN DE ACEITE DE RICINO PARA LA
OBTENCIÓN DE ENZIMAS CELULASAS Y XILANASAS”**

TESIS DE MAESTRÍA

**QUE PARA OBTENER GRADO DE
MAESTRA EN INGENIERÍA QUÍMICA**

PRESENTA:

“Liliana Ortiz Moreno”

ASESOR:

“Dr. Manuel Sánchez Cantú”

COASESOR:

“Dra. Maria Elena Ramos Cassellis”

BUAP

H. Puebla Z., Octubre 2014

AGRADECIMIENTOS

En momentos como este, en donde un proyecto llega a su conclusión en el corazón no puede haber más que dicha y gratitud.

Agradezco a dios por darme la fortaleza, decisión, capacidad, por hacer que los tiempos cortos rindieran tan bien, por cada muestra de amor que me ha dado, por todas aquellas veces en las que me encontré en desesperación y me envió ayuda, palabras y fortaleza mediante toda la gente que me apoyó.

Doy gracias a mis amigos de la maestría, Chesquito que con paciencia me explicó tantas dudas, a Liliana Azotla y Mayra que no sólo me apoyaron con lo académico si no que hasta con mi hijo. Gracias Tocayita por escuchar y compartir, por la aceptación incondicional que mostraste a mi persona sin tapujos. Gracias a mis compañeros, todos fuimos un buen equipo.

Gracias a mis compañeros de laboratorio con los que crecí, todos aquellos con los que aprendí, y compartí conocimiento, tal vez varios de ellos no llegarán a leer esta tesis pero quiero que sepan que aprecio todo el tiempo compartido, lamento no haber llegado a la mayoría de los exámenes y también agradezco su comprensión. A los de la tesis pasada les agradecí en su momento, ahora agradezco a Fede, Elito, a Lalito, Andy, Jovas, gracias a Lupita por su ayuda en mis experimentos, a Uriel por su ayuda y sus ganas de aprender, a Jaziel por su apoyo en las lecturas de UV-vis, a Ale por compartir y contagiar su emoción en alimentos, a Bety, Kary y Cony por esas semanas laaaaargas de experimentos. A los compañeros que se quedan y los que vienen les deseo lo mejor, que todos sus experimentos salgan bien y que tomen conciencia de lo trascendental de su estancia en el laboratorio.

Gracias a mi familia; a mi madre que con sacrificio y devoción me cuidó, orientó, tuvo paciencia cuando no hacía más que derivar pregunta de una anterior, por enseñarme a cumplir mi palabra, a ser objetiva y justa. Gracias a mi padre que me inculcó el amor al trabajo, que tuvo mucha cautela al educarme de tal modo que pusiera en el centro el valor de la inteligencia antes que el de la belleza y cosas vanas, por tu confianza y medirme con la vara que yo me gané, gracias padre porque aunque me tomó tiempo entendí que tu intención jamás fue hacerme las cosas difíciles, si no enseñarme a vivir en el mundo real.

Gracias a ambos mamá y papá porque a pesar de sus diferencias coincidieron en los valores más fundamentales e hicieron un buen trabajo.

Gracias hermanos por su amistad, por su apoyo, por su sentido del humor, porque me doy cuenta que no todos los hermanos tienen la fortuna de conocerse como nos conocemos, fui bendecida con ustedes. Nadia, mi pilar, te amo hermana, gracias por cuidarme, por tus enseñanzas, por tus sacrificios, gracias por escucharme y por todo tu apoyo. Hermano, gracias por compartir tu emoción por aprender algo nuevo y compartirlo, por todas tus invitaciones a los conciertos de jazz, exposiciones de arte, al cine y demás, ustedes dos nos enseñaron a trabajar, ustedes dos nos enseñaron a no quedarnos de brazos cruzados, ustedes pusieron estándares altos a cumplir como hijos. Bera, hermana, contigo puse en práctica la constancia en el abrazo a pesar de tu apatía, que gusto me da que ya te dejes querer, gracias hermana porque aprendí mucho de lo que estudiabas en esas largas noches de estudio.

Gracias al doctor Sampieri, que me apoyó y comprendió, gracias a la doctora María Auxilio, a mis maestros de la maestría por su compromiso en la enseñanza en especial a la Dra. Nancy, la Dra. Mayra los maestros Antonio y Juan Antonio.

Gracias a la doctora Lydia por todo su apoyo y estar ahí cuando la necesité, por despejar mis dudas, por prestarme su material costoso y confiar en mí, por sus asesorías, sus consejos y por todos los gestos amables que tuvo con Ernesto y conmigo.

Gracias al doctor Marín por ser como es: desinteresado, compartido con el conocimiento y comprometido, por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y tenerme la confianza de proveerme de material, gracias por su confianza. Gracias a la doctora Cassellis por haberme enseñado otra metodología, por enseñarme a ser paciente, por el acompañamiento dedicado, por permitirme trabajar en su laboratorio y proveerme de lo que necesitaba, por compartir su conocimiento y experiencia, por su comprensión.

Leí una frase de Bob Proctor " Un mentor es alguien que ve más talento y capacidad dentro de ti, de lo que ves tú en ti mismo, y te ayuda a sacarlo de ti" Doctor Cantú, gracias por ser mi mentor, porque sin ser mi familiar confió en mí y en mis capacidades aún cuando yo dudé. Gracias por sus palabras de apoyo y confianza cuando yo me sentí derrotada y desesperada, porque sin que yo lo pidiera usted supo que necesitaba que alguien me ayudara a recuperar la confianza. Gracias por apoyar cuando

se necesitaba, por empujar cuando me hacía lenta, por toda la batalla que le di. Gracias por darme la oportunidad de hacer mi tesis de licenciatura y de maestría, por dejarme fluir en los temas que a mí me interesaban. Por su acompañamiento, por todas las retroalimentaciones, por forjarme y hacer de mí una mejor profesional.

Gracias a mi hijo, que así, tan pequeño, me ayudó a no rendirme, me da razones para perseguir mis metas, me da la fuerza para seguir cuando me siento cansada y me inspira a mejorar, por ser tan comprensivo y acoplarse a otro ritmo de vida. Gracias a mi esposo por su apoyo en esta aventura, porque se acopló a un nuevo estilo de vida, por tener fe en mí aún cuando yo la había perdido, por su comprensión, por crecer conmigo, porque siendo tan buen hombre me inspira a ser mejor mujer, David te admiro y me siento admirada y valorada, gracias por amarme de esta manera en la que siento que sólo tú puedes amarme así de tanto y así de sano, por ser mi calma, mi equilibrio y mi impulso, que honor ser la esposa de tan buen hombre. Te amo y doy gracias a dios por bendecirme con un buen hijo y un buen esposo.

Gracias a mis suegros por criar a tan maravillosos ser, gracias a todos los contribuyentes porque con a sus recursos pude estudiar la maestría y a su vez al Conacyt, por ser una de las pocas instituciones de gobierno que hace bien su trabajo, gracias a la facultad de ingeniería química que como todos tiene áreas de oportunidad pero que sin duda ha mejorado bastante, a todos los investigadores que han hecho crecer la universidad y por quienes aumentó el acceso a la información en las búsquedas bibliográficas, a la VIEP por su apoyo en los últimos meses, gracias a la BUAP que me ha dado preparatoria, universidad y maestría. Prometo esforzarme y poner en alto el nombre de mi querida universidad y de todos los laboratorios que me abrieron las puertas (Biocombustibles de la FIQu, Investigación de la Dra. Cassellis en la FIQu y Micología del ICUAP).

Índice de contenido

<u>Resumen</u>	1
<u>Introducción</u>	2
<u>CAPÍTULO I MARCO TEÓRICO</u>	4
<u>1.1 Residuos lignocelulósicos</u>	5
<u>1.1.2 Importancia de los productos generado a partir de residuos agroindustriales</u>	9
<u>1.2 Higuera</u>	11
<u>1.2.1 Impacto económico de la higuera</u>	12
<u>1.3 Biocombustibles</u>	12
<u>1.3.1 Tipos de biocombustibles</u>	13
<u>1.4 Bioetanol</u>	13
<u>1.4.1 Bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos</u>	14
<u>1.5 Pretratamiento</u>	15
<u>1.6 Generalidades de los hongos</u>	18
<u>1.6.2 <i>Pleurotus spp.</i></u>	22
<u>1.6.3 Especies del género <i>Pleurotus</i></u>	24
<u>1.6.4 <i>Pleurotus djamor</i></u>	24
<u>1.7 Enzimas</u>	26
<u>Bibliografía</u>	29
<u>CAPÍTULO II METODOLOGÍA</u>	36
<u>2.1 MÉTODOS</u>	37
<u>2.1.1 obtención de residuo</u>	37
<u>2.1.2 Determinación de la cantidad de aceite de ricino en la torta</u>	37
<u>2.1.3 Disminución de porcentaje de aceite en torta</u>	38
<u>2.2 Análisis químico proximal</u>	38
<u>2.2.1 Determinación de proteínas</u>	39
<u>2.2.2 Determinación de agua</u>	40
<u>2.2.3 Determinación de cenizas</u>	40
<u>2.2.4 Determinación de fibra cruda</u>	40
<u>2.2.5 Determinación carbohidratos totales</u>	41
<u>2.2.6 Determinación de lípidos</u>	41

<u>2.3.1 Determinación de azúcares reductores directos y azúcares reductores totales.</u>	42
<u>2.3.2 Determinación de lignina.</u>	42
<u>2.3.3 Determinación de celulosa.</u>	43
<u>2.3.4 Determinación de pH.</u>	43
<u>2.4 Producción de micelio.</u>	43
<u>2.5 Ensayo experimental.</u>	44
<u>2.6 Cultivo en sustrato.</u>	44
<u>2.7 Extracción enzimática.</u>	45
<u>2.8 Determinación enzimática.</u>	45
<u>2.9 Curva de calibración.</u>	46
<u>2.10 Biodegradabilidad enzimática.</u>	46
<u>2.11 EQUIPOS.</u>	47
<u>2.11.1 DRX.</u>	47
<u>2.11.2 Microscopía electrónica de barrido.</u>	48
<u>2.11.3 Determinación de área específica.</u>	48
<u>Bibliografía.</u>	49
<u>CAPÍTULO III DISCUSIÓN DE RESULTADOS.</u>	51
<u>3.1 Obtención de residuo.</u>	52
<u>3.2 Análisis Químico Proximal.</u>	53
<u>3.3 Caracterización fisicoquímica.</u>	57
<u>3.4 DRX.</u>	58
<u>3.4 Microscopía y EDS.</u>	64
<u>3.3 Inoculación de <i>Pleurotus djamor</i> en la torta de extracción.</u>	65
<u>3.6 Determinación de la actividad enzimática.</u>	67
<u>3.6.1 Actividad enzimática de xilanasas.</u>	68
<u>3.6.2 Actividad enzimática de celulasas.</u>	70
<u>3.7 Determinación de lignina y celulosa posterior a la biodegradabilidad enzimática.</u>	72
<u>Bibliografía.</u>	76
<u>CONCLUSIONES.</u>	81
<u>ANEXO.</u>	83

Índice de figuras

<u>Figura 1.1 Molécula de β-D-glucosa.</u>	5
<u>Figura 1.2 Estructura parcial de la celulosa.</u>	6
<u>Figura 1.3. a) alcohol cumárico, b) coniférico y c) sinapílico.</u>	6
<u>Figura 1.4. Modelo parcial de lignina.</u>	7
<u>Figura 1.5. Polisacáridos más comunes presentes en la hemicelulosa.</u>	8
<u>Figura 1.6. Arreglo típico de la pared celular de una planta.</u>	9
<u>Figura 1.7. Variedades de higuera silvestre.</u>	11
<u>Figura 1.8. Diagrama de flujo del proceso para la obtención de bioetanol.</u>	15
<u>Figura 1.9. Fisiología del hongo.</u>	19
<u>Figura 1.10 Hongo <i>Pleurotus djamor</i> en fase micelar.</u>	19
<u>Figura 1.11 Partes del <i>Pleurotus djamor</i>.</u>	25
<u>Figura 1.12. Distribución geográfica del hongo <i>Pleurotus djamor</i>.</u>	25
<u>Figura 1.13 Comparación de energía libre de activación de una reacción con y sin enzimas catalizadoras.</u>	26
<u>Figura 1.14. Acción de una enzima libre en un sustrato específico.</u>	27
<u>CAPÍTULO II METODOLOGÍA.</u>	36
<u>CAPÍTULO III DISCUSIÓN DE RESULTADOS.</u>	51
<u>Figura 3.1. a) Aceite crudo y b) Torta de prensado.</u>	52
<u>Figura 3.2 Balance de materia de semilla prensada.</u>	53
<u>3.4 DRX.</u>	58
<u>Figura 3.3 Partes de la semilla.</u>	59
<u>Figura 3.4 DRX de torta, testa, endospermo y xilano.</u>	60
<u>Figura 3.5 Ficha JCPDS de la celulosa nativa.</u>	61
<u>Figura 3.6 Ilustración del método de deconvolución de los picos.</u>	62
<u>Figura 3.7 Deconvolución de torta de ricino.</u>	63
<u>Figura 3.8 Microestructuras de la torta de ricino.</u>	64
<u>Figura 3.9. Cultivo de <i>Pleurotus djamor</i> día 1.</u>	66
<u>Figura 3.10 Crecimiento del hongo <i>Pleurotus djamor</i> 5 días.</u>	66
<u>Figura 3.11 Crecimiento del hongo <i>Pleurotus djamor</i>, 8 días.</u>	67
<u>Figura 3.12 Gráfica comparativa de actividades enzimáticas de xiladaspor tamaño de partícula.</u>	69

<u>Figura 3.13 Gráfica comparativa de actividad enzimática de celulasas por tamaño de partícula.</u>	71
<u>Figura 3.14 Comparación de pérdida de lignina.</u>	73
<u>Figura 3.15 Comparación en el porcentaje de celulosa posterior a la biodegradabilidad enzimática.</u>	75
<u>CONCLUSIONES.</u>	81
<u>ANEXO.</u>	83
<u>A.1 Curva de calibración de celulosa.</u>	84
<u>A.2 Curva de calibración de xilano.</u>	85

Índice de tablas.

<u>Tabla 1.1 Definición de proceso físico, químico y biológico.</u>	16
<u>Tabla 1.2. Clasificación de los hongos respecto a la forma de nutrirse y comportamiento.</u>	20
<u>Tabla 1.3. Clasificación y ejemplos de los hongos <i>Pleurotus</i>.</u>	22
<u>Tabla 1.4. Factores que afectan la velocidad de reacción de las enzimas.</u>	28
<u>Tabla 2.1 Códigos extracciones enzimáticas.</u>	45
<u>Tabla 3.1. Análisis Químico proximal de la torta de extracción de la semilla de higuera.</u> 54	
<u>Tabla 3.2. Caracterización fisicoquímica de la torta de higuera.</u>	57
<u>Tabla 3.3 % en peso de elementos en la torta de extracción.</u>	65
<u>Tabla 3.4 Actividad enzimática de xilanasas UI/g ss.</u>	68
<u>Tabla 3.5 Actividad enzimática de celulasas UI/gss.</u>	70
<u>Tabla 3.6 Porcentaje de lignina en torta de extracción de semilla de higuera posterior a aplicación de enzimas.</u>	72
<u>Tabla 3.7 Determinación de celulosa posterior a la biodegradabilidad enzimática</u>	74

Resumen

En este proyecto de investigación se llevó a cabo la extracción de aceite de ricino (*Ricinus cummunis*) por prensado mecánico térmico para poder acceder a la torta de extracción de la dicho aceite.

La torta fue caracterizada mediante un análisis químico proximal y fisicoquímico, también fue sometida a difracción de rayos X, microscopía electrónica de barrido y se le midió el área de contacto.

Posteriormente se utilizó torta de extracción de aceite de ricino como sustrato de crecimiento con dos tamaños de partícula (0.420 – 0.841mm y 0.841 – 2.0 mm) del hongo *Pleurotus djamor*, en donde se determinó que este hongo es capaz de crecer exitosamente en dicho sustrato sin necesidad de adicionarle ningún material de soporte. Después se procedió realizar extracciones de enzimas extracelulares producidas por el hongo mediante buffer de citratos con pH 4.8 y 5.3 los días 8,11, 14, 17, 20 y 23.

Se encontró que a menor tamaño de partícula se favorece ligeramente la actividad enzimática de xilanasas y que mayor tamaño de partícula favorece ligeramente la actividad enzimática de celulasas. Los días que presentaron mayor actividad enzimática fueron el 14 para la xilanasas y el 11 para las celulasas.

En este sentido se determinó que al aplicar los extractos enzimáticos de los días de mayor actividad con pH 4.8 y 5.3 se presentó mayor grado de deligificación y ligero aumento en la disponibilidad de celulosa con el pH 5.3.

Introducción

En la actualidad la ciencia se enfrenta al reto de generar energéticos renovables sustentables debido a que se busca disminuir las emisiones de gases invernadero producidas no sólo por la etapa de combustión de combustibles, si no, desde su proceso de producción. Lateralmente se ha desarrollado un segundo problema que tiene también que ver con la contaminación, pero que proviene de los residuos generados por el aumento de consumo de productos agroindustriales.

Los residuos agroindustriales también contribuyen a la emisión de gases invernadero en su etapa de descomposición si no son tratados adecuadamente, sin embargo, al ser residuos de desecho son muy económicos y tienen alto contenido de celulosa que a su vez está compuesta por monómeros de β -D-glucosa, y por lo tanto son fuente de energía. Además de celulosa son ricos en proteínas, por lo que pueden ser empleados como materia prima para la producción de alimentos.

En el caso particular de los residuos lignocelulósicos generados por la higuera en la extracción de aceite de ricino se perfilan como materia prima de biocombustibles de segunda generación debido a que la semilla de higuera contiene una proteína altamente tóxica llamada ricina, lo cual la imposibilita para su uso en la producción de alimentos.

Para que estos residuos puedan ser empleados como materia prima de combustibles debe ser sometido a un pretratamiento que consiste en degradar la lignina que da soporte a la celulosa, la mantiene fuertemente unida y le brinda protección. La lignina es una sustancia muy resistente a la degradación, incluso a ácidos en bajas concentraciones; pero es necesario eliminarla para obtener altos rendimientos en la producción de bioetanol. El pretratamiento es por lo tanto una etapa crucial ya que de él depende hacer accesibles los azúcares fuente de energía que serán hidrolizados y fermentados en etapas posteriores.

En la actualidad se han desarrollado pretratamientos físicos que no consiguen degradar la lignina eficazmente, pretratamientos químicos muy agresivos que si bien es cierto llegan a presentar buenos grados de delignificación, resultan ser muy contaminantes y costosos.

Es por esto que este trabajo se enfocó en el pretratamiento biológico empleando como aliado al hongo *Pleurotus djamor* que es especialista en degradar lignina mediante

la producción de una poderosa batería enzimática extracelular, y que además, es capaz de degradar la celulosa mediante la producción de celulasas y xilanasas.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO.

En este capítulo se describe la composición de los residuos lignocelulósicos y sus fuentes; así como la importancia que tienen los productos generados a partir de ellos. Se hace alusión a la higuera (*Ricinus cummunis*) y a su impacto económico, además de su potencial en el ámbito de los biocombustibles.

Además, se señalan las generalidades de los biocombustibles, su desarrollo y clasificación. A su vez, se destaca la importancia del bioetanol; por lo que se mencionan sus fuentes y su elaboración a partir de biomasa lignocelulósica.

Por otro lado, se indican las etapas necesarias para producir bioetanol remarcando la importancia del pretratamiento en su elaboración y los tipos de pretratamiento.

También, se mencionan las generalidades de los hongos, en particular del hongo *Pleurotus* y en específico del *Pleurotus djamor* y, por último, de las generalidades de las enzimas entre las que destaca el cómo actúan y su clasificación.

1.1 Residuos lignocelulósicos.

Los residuos lignocelulósicos también llamada biomasa lignocelulósica (1) se puede definir como cualquier material orgánico proveniente de las plantas. Incluyen materiales agrícolas, residuos forestales, desechos sólidos municipales y desechos industriales (2) tales como paja de diversos cereales, bagazo de caña de azúcar, desechos de papel, bagazo, de cerveza, fibra de coco, desechos frutales, cáscaras, tallos, etc. (3). Los residuos lignocelulósicos están compuestos por celulosa, lignina, además otros polisacáridos comúnmente llamados hemicelulosa (4).

La celulosa es un polímero de la D-glucosa enlazadas por medio de enlaces glucosúricos β -1,4'. Este arreglo de enlace es muy rígido y estable, lo que hace de la celulosa un material estructural apto para soportar el peso de la planta. En la figura 1.1 se puede observar la molécula de la β -D-glucosa (5).

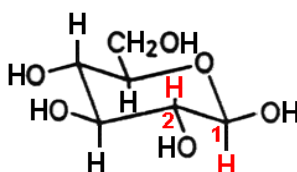


Figura 1.1 Molécula de β -D-glucosa.

Las moléculas de celulosa se mantienen unidas por medio de enlaces de hidrógeno entre los grupos $-OH$ de los anillos de glucosa; al conjunto de estructuras de celulosa unidas por grupos $-OH$ se les conoce como microfibrillas. La figura 1.2 muestra una estructura parcial de la celulosa en donde se observan las características descritas.

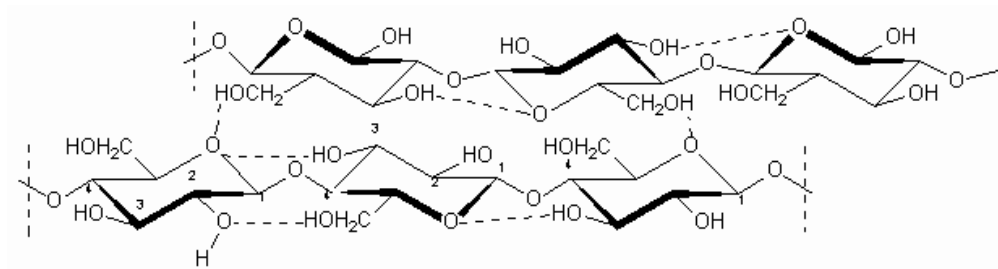


Figura 1.2 Estructura parcial de la celulosa.

Por otra parte, la lignina es un polímero altamente ramificado que por lo general está formado por alcoholes coniferílico, cumárico y sinapílico. En la figura 1.3. se observan los monómeros de los alcoholes 3a cumárico, 3b coniférico y 3c sinapílico. Las proporciones de estos alcoholes presentes en la lignina varían entre especies, órganos vegetales incluso entre las capas de una pared celular (6).

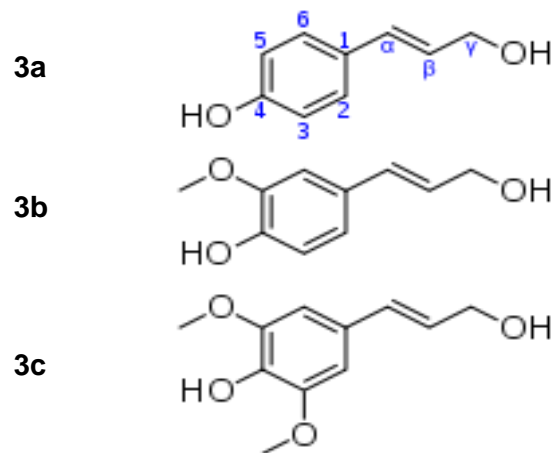


Figura 1.3. **a)** alcohol cumárico, **b)** coniférico y **c)** sinapílico.

El polímero de lignina es amorfo y comúnmente está unido mediante enlaces C-C y C-O-C en cada unidad de alcohol fenilpropanoide que forma una estructura compleja y ramificada en tres dimensiones. La cual se cree no está unida de un modo único ni repetido. En la figura 1.4 se observa un modelo parcial hipotético de árbol de haya publicado por Taiz y Zeiger en donde se puede observar que las unidades fenilpropanoides no se encuentran ordenadas de manera simple y repetida (6).

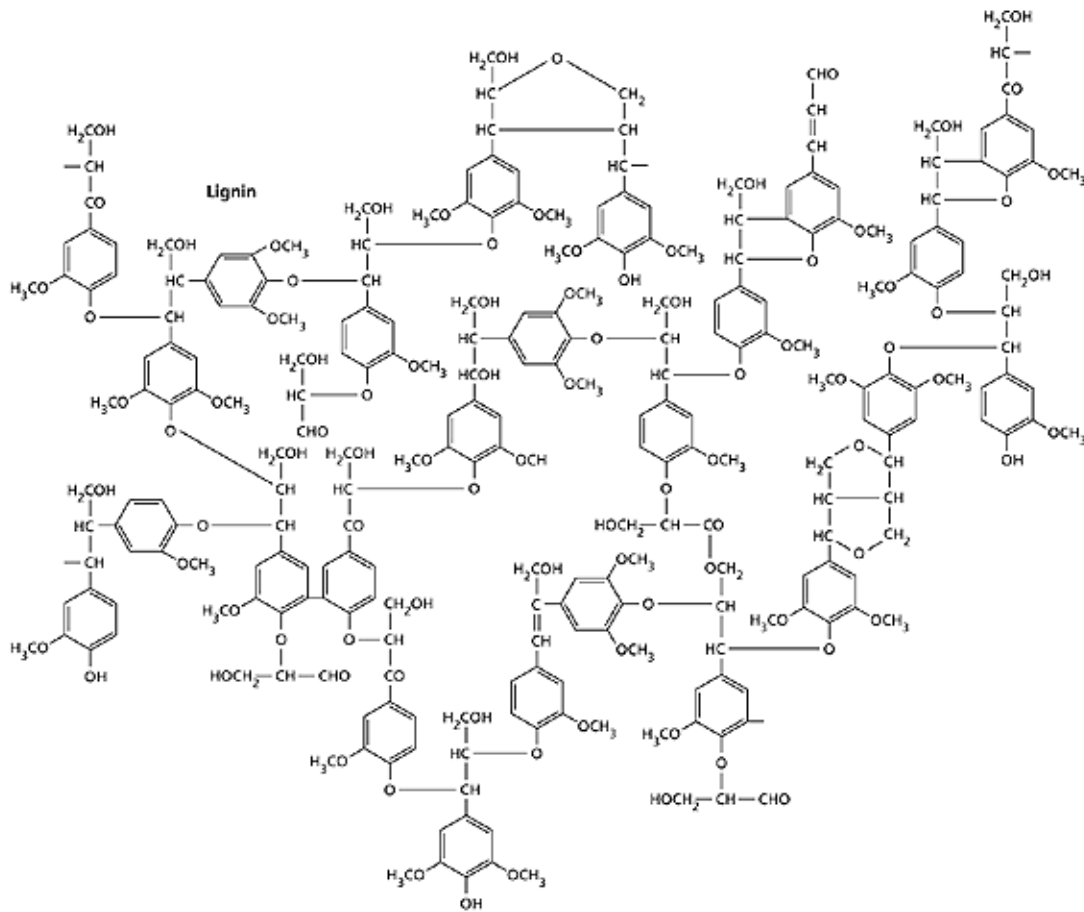


Figura 1.4. Modelo parcial de lignina.

La lignina funge un papel fundamental en la conducción del agua y los nutrientes absorbidos por las raíces hasta las partes superiores de la planta (7). La lignina llena los espacios en la pared celular, en la hemicelulosa y en los demás componentes de la planta (6).

La hemicelulosa, por su parte, es un polímero ramificado más corto que la celulosa y, a diferencia de la misma, no se encuentra formada por un solo tipo de polisacárido. Su función es unir a las microfibrillas formadas por la celulosa (8). Las hemicelulosas son muy heterogéneas; sin embargo, pueden establecerse dos grandes grupos:

- Hemicelulosas neutras, formadas por pentosanos de arabinosa y xilosa y por hexosanos de galactosa, manosa y glucosa.
- Hemicelulosas ácidas, que contienen ácidos galacturónico y glucorónico (9).

Los monómeros de cinco o seis carbonos de la hemicelulosa se unen a la celulosa mediante enlaces en los hidrógenos (10). En la figura 1.5 se pueden observar los polisacáridos más comunes presentes en la hemicelulosa (D-xilopiranososa, L-arabinofuranosa, D-glucopiranososa, D-galactopiranososa, D-manopiranososa, ácido glucopiránico, 4-O-metil-ácido D-glucopiránico y ácido D-galactopiránico) (11). Cabe mencionar que los enlaces cruzados de la microfibrillas con las cadenas de hemicelulosa proporcionan fuerza mecánica a las estructuras vegetales (12).

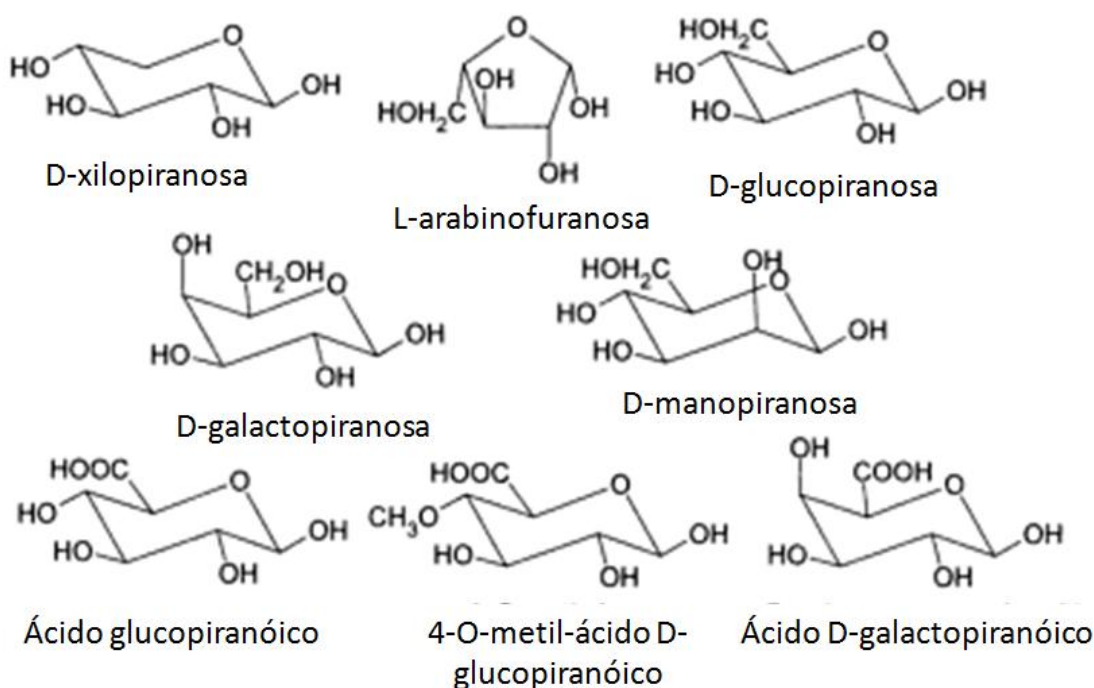


Figura 1.5. Polisacáridos más comunes presentes en la hemicelulosa.

Finalmente, en la figura 1.6 se muestra el complejo arreglo típico de la pared celular de una planta, en donde se puede apreciar de manera gráfica la ubicación de la celulosa, la lignina y la hemicelulosa (13).

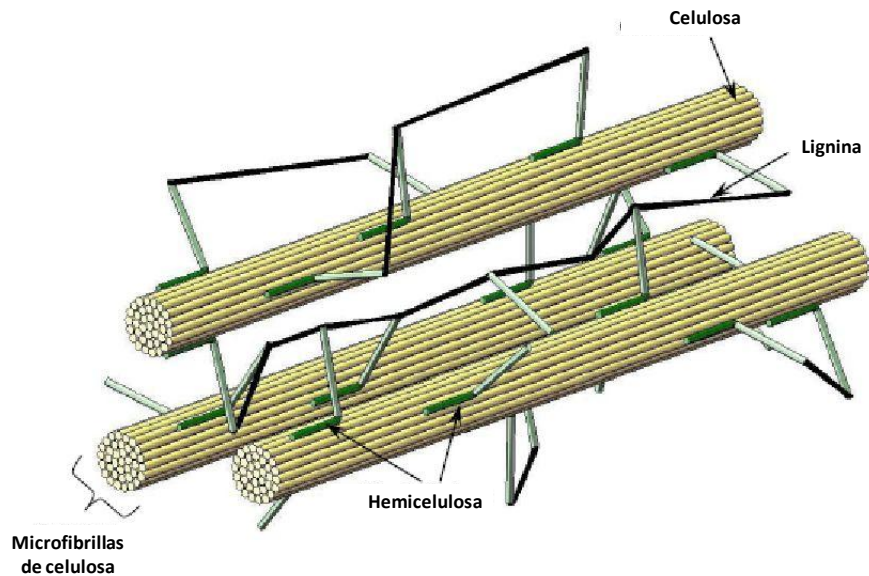


Figura 1.6. Arreglo típico de la pared celular de una planta.

1.1.2 Importancia de los productos generados a partir de residuos agroindustriales.

La FAO (*Food and Agriculture Organization*, por sus siglas en Inglés) reportó en el 2000 que tan solo la población en los países en desarrollo aumentó 260% lo cual provocó el incremento de la producción agrícola (14) y, por ende, de sus residuos. Se estima que la agricultura genera 140 billones de toneladas métricas de biomasa lignocelulósica cada año a nivel global (3).

Al respecto, el departamento de energía de Estados Unidos calcula que más de 500 millones de toneladas de biomasa residuos lignocelulósicos de esta materia prima puede estar disponible por año en dicho país con precios muy bajos que oscilan de 20 – 50 \$/ton. Estos residuos atraen cada vez más atención como una materia prima renovable disponible en abundancia y económica, capaz de producir productos químicos y biocombustibles como el bioetanol y solventes orgánicos como el butanol (15).

El empleo de estos residuos lignocelulósicos tiene un gran potencial para industrias de diversos sectores tales como la energética, para la elaboración de biogas que es utilizado para calentar, generar vapor o electricidad (15), Industrias interesadas en la producción de productos químicos de origen, biopolímeros, área de la salud; para la producción de antibióticos y hormonas, aminoácidos, ácido cítrico (3).

Por lo que una economía basada en recursos renovables ofrece beneficios como (3):

- Nuevas áreas de crecimiento en zonas rurales con gran producción de biomasa.
- Nuevos sectores de negocios emprendedores e innovadores.
- Reducción de dependencia de los recursos no renovables.
- Disminución de emisiones de gases invernadero.
- Mejora de la salud debido al empleo de materiales de origen biológico en lugar de materiales químicos sintéticos.
- Creación de empleo y desarrollo rural.

Uno de los sectores que contribuye a la generación de una gran cantidad de biomasa es el de la extracción de aceites vegetales, mismos que son empleados preferentemente para la elaboración de alimento animal (16) y producción de suplementos alimenticios. Los residuos lignocelulósicos provenientes de tortas de extracción de aceite han sido empleados para la producción de enzimas industriales, antibióticos, biopesticidas, vitaminas, proteínas hidrolizadas, alimento, fuente de energía (17).

En el caso particular de la torta de extracción de la semilla de higuera, esta es empleada mayormente como fertilizante debido a su contenido de nitrógeno, fósforo, potasio y trazas de nutrientes como el magnesio, zinc y cobre, que hacen de ella un fertilizante balanceado (18). No obstante, cabe mencionar que la torta de aceite de ricino no puede emplearse con fines alimenticios debido a que contiene la proteína altamente tóxica llamada ricina (19).

En cuanto a los residuos agroindustriales provenientes de tortas de prensado de aceite, se tuvo una producción total superior a 25 millones de toneladas por año en 2005 - 2006 de las cuales se exportaron 4.3 millones de torta de aceite según Ramachandran (17). Al respecto, la India reporta haber exportado 200 mil toneladas de torta de aceite de

ricino en ese mismo periodo, así como un aumento en la exportación de años posteriores correspondiendo 240 mil toneladas al periodo 2009-2010 (18).

1.2 Higuera.

La higuera es un arbusto de compleja morfología, perteneciente a la familia de las Euforbiáceas, proveniente de África y de la India. Tiene un largo ciclo de vida (hasta 12 años), por lo que se le puede cultivar y cosechar durante su periodo de vida o anualmente, según el ambiente y el sistema de producción (19) (20). En la figura 1.7 se puede observar sólo tres de la amplia variedad de especies.



Figura 1.7. Variedades de higuera silvestre.

Su tamaño varía desde 0.8 a 5 metros de altura, se reproduce de forma anemófila, es decir, las flores masculinas situadas en la parte superior polinizan a las femeninas en la parte inferior de la planta por acción del viento. Las raíces de la higuera pueden ser fistulosos pivotantes y las de las especies gigantes se asemejan a las de los árboles. Sus tallos presentan variación en cuanto al color, con cicatrices foliares, cuando la planta es joven el tallo es tierno y jugoso pero conforme va envejeciendo se vuelve leñoso. El fruto está envuelto por una capa que puede ser lisa o espinosa de diversos colores y texturas, al secarse la semilla puede ser dehiscente, que consiste en abrir la cubierta y expulsar la semilla, o indehiscente, en donde permanece la semilla en el fruto seco, y contiene de 35 a 60% de aceite (19) (20).

La higuera se caracteriza por su amplia adaptación, ya que puede proliferar en climas tropicales, subtropicales y templados. Puede encontrarse en altitudes que van desde el nivel del mar hasta 2300 metros, aunque para su producción comercial es recomendable una altitud que oscile entre 300 y 1500 metros sobre el nivel del mar. Se

adapta a regiones áridas y semiáridas, donde su resistencia a la sequía es una de sus virtudes más destacadas (19) (20).

1.2.1 Impacto económico de la higuera.

Es una planta muy versátil, ya que pueden aprovecharse el aceite, la torta, la cáscara de esta semilla y residuos de la planta (18). Según reportes realizados por Castoroil.in el precio de la semilla de higuera en 2012 fue de \$736 dólares americanos por tonelada métrica, el aceite de ricino fue valuado en \$1,550 dólares americanos la tonelada métrica y \$109 dólares la tonelada métrica de torta de extracción de semilla de higuera (21).

En la actualidad el aceite de ricino es utilizado para la industria cosmetológica, como lubricante, en la fabricación de colorantes, anilinas, desinfectantes, germicidas, adhesivos, insecticidas, barnices, plásticos, en biomedicina, biodiesel, en cuanto a la torta de extracción para composta (19) (18).

El impacto económico de la higuera radica en que por una parte favorece al sector agrícola debido a que se trata de una planta de fácil cultivo ya que se adapta a zonas áridas, semiáridas y no requiere de suelos de alto rendimiento (20). Por otro lado, contribuye en el ámbito industrial por la gran variedad de productos que se pueden elaborar y los que se encuentran en etapa de investigación. Ambos sectores son fuente de empleo y activación económica. La FAO reportó que en 2012 la producción de aceite de ricino fue de 1,630 millones de toneladas métricas (22). Tomando en cuenta que el máximo rendimiento es de 50% en peso (23) la producción mínima de torta de higuera debió ser una cantidad igual a la producción de aceite crudo.

1.3 Biocombustibles.

El desarrollo de producción de combustibles de fuentes renovables es muy importante debido a que en la actualidad el 92% de la energía consumida en el mundo proviene de fuentes no renovables y se espera que para el 2030 la demanda de energía aumente un 44% (3). Por lo anterior, la búsqueda de nuevas fuentes renovables se hace indispensable que por un lado ayuden a reducir la dependencia a los combustibles fósiles y por otro sean amigables con el medio ambiente.

Los biocombustibles son combustibles producidos a partir de biomasa (24) ; es decir, de fuentes naturales y renovables; tales como el biogás y el bioetanol, que pueden ser empleados para hacer trabajar máquinas de combustión interna (25).

1.3.1 Tipos de biocombustibles.

Los biocombustibles se pueden clasificar de acuerdo a la materia prima y la tecnología empleada en su proceso de elaboración en (26):

a) Biocombustibles de primera generación. Son elaborados a partir de insumos que también son de consumo humano tales como la soya y la palma para el caso de biodiesel, la caña y el maíz para la elaboración de bioetanol.

b) La segunda generación de biocombustibles. Es obtenida a partir de materia prima que no son de consumo humano como tal como residuos agroindustriales, aceite de ricino, jatropha, aceite quemado y las grasas animales.

c) La tercera generación de biocombustibles. Se obtiene de cultivos que requieren más investigación y desarrollo para comercializar, tales como árboles de crecimiento rápido alterados genéticamente y algas (26) (27).

1.4 Bioetanol.

El bioetanol es un biocombustible que ha adquirido gran relevancia en los últimos años debido que en varios países como Estados Unidos, Argentina y Europa, Paraguay, etc. han emitido normativas que exigen mezclar biocombustibles a los combustibles fósiles. Dichas normativas produjeron un incremento su producción y consumo (28) (29).

El bioetanol es una fuente de energía renovable que puede ser producido a partir de materia prima agrícola; sin embargo, hay que tener especial cuidado respecto a la elección de la materia prima que se emplee para su elaboración ya que debe tomarse en cuenta que no debe ser fabricado a partir de materia prima de consumo humano o animal como es el caso del maíz, la remolacha, la caña de azúcar correspondiente a biocombustibles de primera generación (30).

Al respecto, una alternativa para evitar el uso de materias primas consumidas por el ser humano la constituye el empleo de materia prima de segunda generación, como es el caso de la biomasa lignocelulósica. En cuanto a la torta de aceite de ricino, en donde la presencia de la proteína ricina la inhabilita para la elaboración de productos alimenticios y la perfila para su empleo en la producción de bioetanol. Se puede pensar incluso en la implementación de una biorefinería en donde se produzca biodiesel a partir del aceite de higuera y bioetanol a partir de la torta de prensado (31). Una biorefinería incentivaría el desarrollo de nuevos procesos productivos para la obtención de productos que en la actualidad se obtienen a partir de derivados del petróleo.

1.4.1 Bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos.

Cabe advertir que en la producción de bioetanol a partir de caña de azúcar, remolacha, maíz o trigo tiene elevados rendimientos debido a su elevado contenido de azúcares (32). En el caso de la caña de azúcar y la remolacha la obtención de azúcares es prácticamente directa y aunque la producción de bioetanol a partir de cereales requiere un proceso de licuefacción y sacarificación, no dejan de tener rendimientos más elevados que los obtenidos mediante residuos lignocelulósicos que requieren de procesos más drásticos y complejos que implican pretratamiento e hidrólisis (33).

A pesar de la diferencia de los rendimientos es menester atender a experiencias pasadas como lo fue el aumento en índice de precios de los cereales de grano, aceite y azúcar en un 70%, 69% y 260% que se atribuyó al empleo de estas materias primas para la elaboración de biocombustibles (34) (35). Por ende, debe continuarse realizando investigación que lleve a la producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica con mayores rendimientos que haga posible el aprovechamiento la celulosa y hemicelulosa tan abundante en el planeta (30).

La producción de bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos comprende tres etapas básicas: pretratamiento, hidrólisis y fermentación (36). El diagrama de flujo de la figura 1.8 representa el proceso de producción del bioetanol y se puede observar que en la etapa de pretratamiento se pretende extraer la celulosa, hemicelulosa y lignina a fin de liberar a las dos primeras y dejarlas libres para el proceso de hidrólisis o sacarificación, en donde el objetivo principal es obtener azúcares hidrolizando la celulosa y hemicelulosa

(37) para posteriormente pasar al proceso de fermentación, en el que se obtiene el bioetanol mediante la fermentación de los azúcares (38).

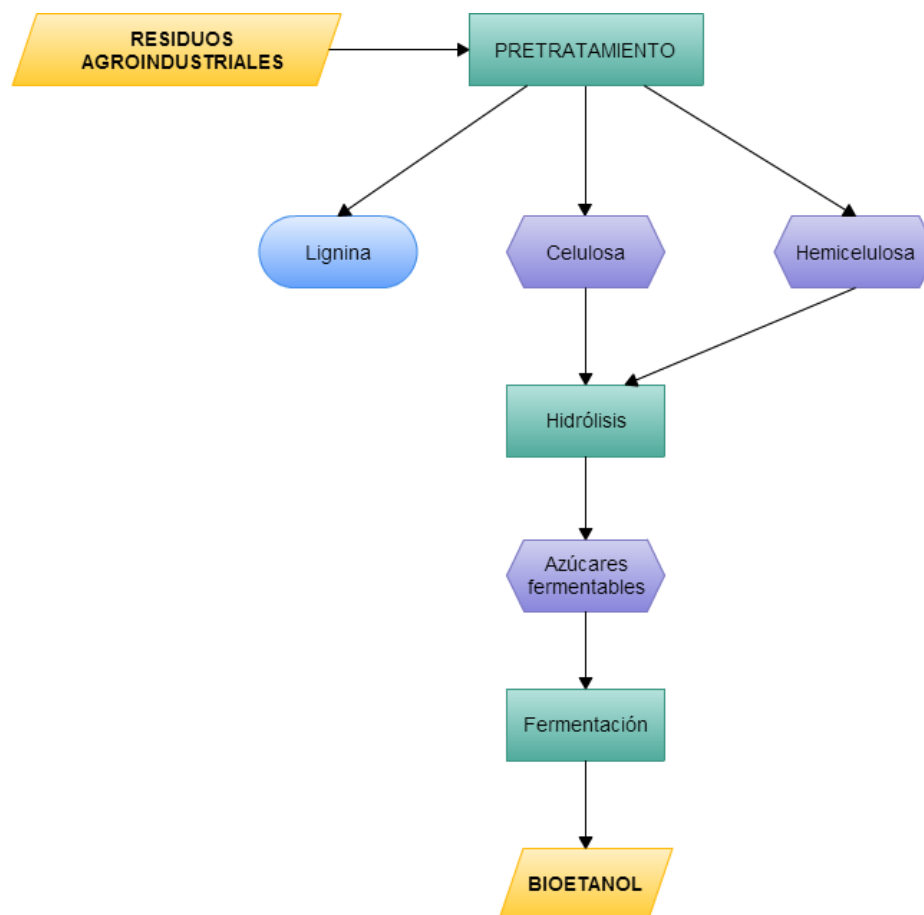


Figura 1.8. Diagrama de flujo del proceso para la obtención de bioetanol.

De las cuatro etapas anteriormente mencionadas, el pretratamiento es una etapa indispensable para el procesamiento de biomasa lignocelulósica que complementa la hidrólisis enzimática y posibilita la obtención de altos rendimientos de bioetanol (36) (38).

1.5 Pretratamiento.

El pretratamiento tiene por objeto hacer más accesible la celulosa y la hemicelulosa, mediante la degradación de la lignina, reduciendo la cristalinidad de la celulosa, preservando la hemicelulosa y degradando la estructura de la lignina para su posterior eliminación (39) (40).

El pretratamiento es de suma importancia en la producción de bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos ya que esta etapa representa por lo menos el 20% del costo total de producción y puede ser considerado como la etapa más cara del proceso (39) (40).

Existen tres tipos de pretratamientos: físicos, químicos y biológicos. En la tabla 1.1 se define cada tipo de pretratamiento, se dan ejemplos de cada tipo de pretratamiento y se mencionan sus ventajas y desventajas.

Tabla 1.1 Definición de proceso físico, químico y biológico.

Pretratamiento	Físico.	Químico.	Biológico.
Definición.	Los tratamientos físicos son aquellos en los que se pretende disminuir el tamaño de partícula de la biomasa para aumentar el área de superficie específica disponible, reducir el grado de polimerización y la cristalinización de celulosa. Algunos de los pretratamientos físicos son métodos como el de trituración, explosión de vapor, procesos hidrotérmicos, etc. (36) (41).	Son aquellos que se utilizan para eliminar el contenido de lignina de los residuos agroindustriales mediante hidrólisis alcalina o ácida. Estos tratamientos comprenden: la hidrólisis ácida, hidrólisis alcalina y mediante solventes orgánicos (36).	En el pretratamiento biológico se emplean microorganismos capaces de degradar la lignina, la celulosa y la hemicelulosa. Incluye el empleo de micelio de hongos de la pudrición marrón, suave y blanca. También se emplean bacterias como <i>E. Coli</i> pero para incrementar el rendimiento de la producción de bioetanol, es decir para la degradación de celulosa más que de la lignina (40) (42).
Ejemplos	En un estudio utilizando biomasa de cosechas, <i>miscanthus</i> y pasto	Zhou y colaboradores reportaron rendimientos de 77.6% y 73.6%	Lee y colaboradores reportaron una biodegradación de hasta

	varilla realizado por Miao y colaboradores encontró que a menor tamaño de partícula es mayor el consumo energético (43).	aplicando diluciones de ácido sulfúrico de 1% durante 5 y 10 minutos a pasto varilla (44).	77% en césped común aplicando el hongo <i>Cyathus stercoreus</i> (39).
Ventajas	Incrementa el área superficial específica y disminuye el tiempo de digestión (39) .	Alto grado de eliminación de lignina y altos rendimientos de hidrólisis (39).	Es un método seguro y amigable con el medio ambiente, además de que no requiere temperaturas elevadas (39). En el caso de los hongos de la pudrición blanca el mismo residuo puede ser empleado como sustrato para el cultivo del hongo (36).
Desventajas	Requieren grandes cantidades de energía que provoca el aumento en los costos de producción, además de que no degrada por completo la lignina (36) (40). En ocasiones el consumo de energía necesario para llevar a cabo este tratamiento es mayor la que tiene la biomasa teóricamente (39).	Tienden a ser muy caros debido a la necesidad de contar con maquinaria resistente a la corrosión, los lavados que se requieren para la eliminación de los químicos, así como su recuperación, manejo y confinación de residuos peligrosos (36).	Requiere mayor tiempo que los métodos físicos y químicos (39).

Cabe recalcar que el mismo residuo lignocelulósico sirve como sustrato para el cultivo de los hongos, lo cual tiene dos ventajas; la primera es que se evita la inversión en sustrato y la segunda es que los mismos hongos producen las enzimas que degradarán dicho sustrato, cosa que no ocurriría en caso de que el cultivo se hiciera en medio líquido (36) (45).

En el caso de los hongos de la pudrición marrón, atacan la celulosa sin atacar efectivamente a la lignina, por lo que este tipo de hongos son propuestos para la hidrólisis más que para el pretratamiento, tal como lo propuso Deswal en biomasa lignocelulósica previamente tratada con ácido sulfúrico para posteriormente degradar la celulosa con *Fomitopsis sp* (46). y Valdeir Arantes propone el uso del hongo *Wolfiporia* posterior al pretratamiento con el hongo de pudrición blanca *P. medulla-panis* (47).

En cuanto a los hongos de la pudrición blanca atacan tanto a la celulosa como a la lignina, por lo que son más eficientes en la degradación de residuos lignocelulósicos. Hatakka y colaboradores estudiaron el pretratamiento de la paja de trigo por 19 hongos de la pudrición blanca y encontraron que el 35% de la paja se convierte en azúcares reductores mediante el pretratamiento *Pleurotus ostreatus* en 5 semanas (45). Esta es una de las razones por la cual se eligió al hongo *Pleurotus djamor*, el cual pertenece al grupo de hongos de la pudrición blanca.

Otras de las ventajas del uso de pretratamientos biológicos es que al evitar el empleo de sustancias peligrosas, se prescinde de los lavados y no se requiere utilizar temperaturas elevadas, por lo cual los costos de operación son considerablemente menores comparado con los demás métodos (45).

1.6 Generalidades de los hongos.

En general los hongos son organismos formados por células eucariotas, es decir, por células que presentan núcleos bien definidos. Los hongos se forman por estructuras en forma de filamentos tubulares llamadas hifas (48).

Las hifas representan la unidad estructural de la mayoría de los hongos. Crecen por sus puntas y se ramifica abundantemente, lo cual origina una red de hifas a la que se le denomina *micelio* (48) (49), que rodea e infiltra a las sustancias de las que se alimenta para posteriormente generar el talo o cuerpo en el caso de hongos multicelulares. El

cuerpo está formado también a base de hifas (49). En la figura 1.9 se puede observar la fisiología de un hongo, en donde las hifas se encuentran a lo largo de todo el hongo, el micelio es la base del cuerpo y la estructura reproductiva se localiza en la parte superior, donde se generan las esporas (48) (49).

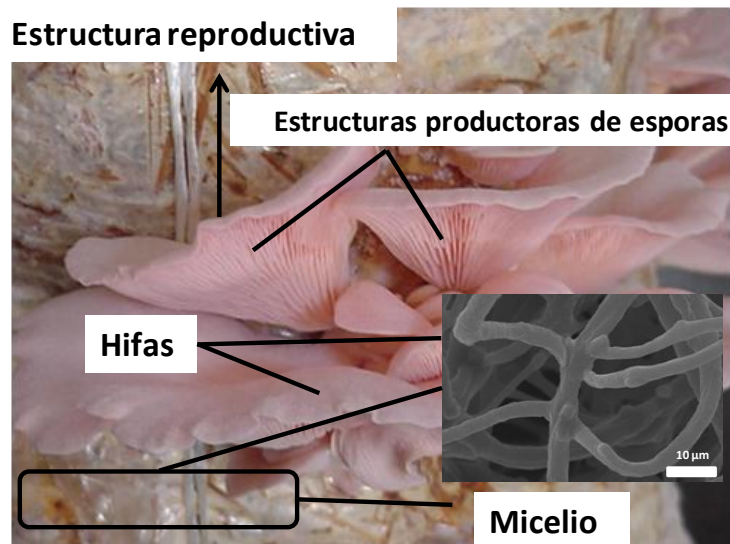


Figura 1.9. Fisiología del hongo.

Una de las principales funciones de los hongos en los ecosistemas es el de descomposición de la materia orgánica generada por otros seres vivos, esta acción es realizada por su fase miceliar, mediante la producción de enzimas extracelulares (50). En la figura 1.10 se presenta la fase miceliar del hongo, *Pleurotus djamor*, en ocasiones incluso el micelio toma la tonalidad rosa característico de esta cepa.



Figura 1.10 Hongo *Pleurotus djamor* en fase miceliar.

Cualquier especie fúngica es capaz de descomponer sólo ciertos compuestos orgánicos (celulosa, quitina, queratina, lignina, proteínas, hidrocarburos, etc.) y un cierto número de microorganismos incluyendo a bacterias y protozoos. Estos microorganismos son requeridos para llevar a cabo la completa descomposición de los residuos, existiendo una secuencia que depende de la habilidad nutricional de cada microorganismo. Algunas especies inician el proceso de descomposición, pero su actividad se detiene ante la acumulación de determinados metabolitos (productos del metabolismo) o por la incapacidad de proseguir el desdoblamiento por falta de enzimas adecuadas, siendo reemplazadas por otros que continúan y terminan el proceso (49).

Los hongos se pueden clasificar en relación a la forma de nutrirse y comportamiento ecológico. En la tabla 1.2 se pueden observar los tipos de hongos y su descripción (51).

Tabla 1.2. Clasificación de los hongos respecto a la forma de nutrirse y comportamiento.

Clasificación.		Descripción.	Ejemplos
Saprótrofos Obligados.		Viven y extraen sus nutrientes de materia orgánica muerta.	<i>Aspergillus</i> , <i>Mucor</i> y <i>penicillium</i> .
Necrótrofos	Facultativos	Son simbiontes facultativos que se nutren de plantas viva y pueden vivir o no asociados con otros organismos vivos.	Hongos del género <i>Fusarium</i> , <i>Pythium</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Rhizoctonia</i> .
	Obligados	Este tipo de hongo penetra en el tejido y hacen que muera.	Existen hongos del género <i>Fusarium</i> , <i>Verticillium</i> y <i>Septoria</i> .
Biótrofos	Facultativos	Pueden estar o no como simbiontes. Si son simbiontes, obtienen nutrientes desde las células vivas. También pueden alimentarse de manera saprótrofa.	<i>Fusarium</i> , <i>Verticillium</i> .

	Obligados	Estos organismos están en la naturaleza sólo como simbioses y mantienen una alimentación biótrofa	Algunos carbones y Bortritis.
--	-----------	---	-------------------------------

Los hongos parásitos pueden vivir a expensas de tejidos vivos de un organismo, absorbiendo azúcares y aminoácidos simples de las células vivas del hospedante (biótrofos), por lo que ocasionan enfermedades; o bien le causan la muerte por toxinas o la destrucción de tejidos por enzimas y luego utilizan la materia orgánica (necrótrofos) (50).

La mayoría de los hongos son saprófitos, es decir, requieren de materia orgánica en descomposición para su alimentación, también pueden ser parásitos de plantas y animales. Los saprófitos se alimentan de materia orgánica muerta: restos de plantas y animales, sustancias de desecho, productos sintéticos y cualquier elemento soluble que difunda en el medio. Necesitan compuestos carbonados ricos en energía elaborados por otros organismos; son degradadores por excelencia cumpliendo un papel muy importante en los ciclos de los nutrientes junto con las bacterias, actinomicetes y protozoos (50).

Es conveniente para el planeta la abundancia de hongos saprofitos ya que la mayor cantidad de residuos proviene de los vegetales, los cuales contienen altos porcentajes de lignina y celulosa. La madera por su parte está constituida mayormente por estas sustancias y a los hongos degradadores de la madera se les denomina “hongos de la pudrición (52). Son hongos que producen alteraciones de color y cambios en sus propiedades físicas y químicas, provocando graves alteraciones en la estructura de la madera mediante la liberación de enzimas que inicialmente provocan un cambio de color seguido de una reducción de peso específico y aumento de humedad y finaliza con la degradación de la estructura de la madera que provoca una pérdida total de las características físico-mecánicas de la madera (53).

Se les clasifica en: hongos de la pudrición oscura o marrón, hongos de la pudrición blanda y hongos de la pudrición blanca (52). En la tabla 1.3 se describe brevemente la forma de ataque de los tres tipos de hongos *Pleurotus* y se hace mención de algunos ejemplos.

Tabla 1.3. Clasificación y ejemplos de los hongos *Pleurotus*.

Hongo de la Pudrición:	Ataque.	Ejemplos.
Blanda.	Ataca maderas puestas en contacto con el suelo. Atacan sobre todo la celulosa de la pared secundaria de la célula que le da una consistencia blanda a la madera (53).	<i>Chaetomium</i> , <i>Xylaria</i> , <i>Hypoxylon</i> , <i>Alternaria</i> , <i>Coniothyrium</i> , <i>Humicola</i> , <i>Stemphylium</i> , y <i>Stysanus</i> (54)
Marrón.	Se caracteriza por que los hongos causantes de la pudrición marrón concentran su ataque en la celulosa, pentosas y hemicelulosa de la pared celular, dejando un material carbonoso formado por lignina. La madera atacada presenta un color marrón y tiende a agrietarse en forma de cubos (53).	<i>Serpula Lacrymans</i> , <i>Pora</i> <i>spp.</i> y <i>Coniophora puteana</i> (54).
Blanca.	Se caracterizan por degradar más la lignina que la celulosa, dejando como residuo un complejo de celulosa. La madera atacada toma un color blancuzco y un aspecto fibroso (53).	<i>Coriolus Versicolor</i> , <i>Fomes</i> <i>sp.</i> , <i>Pholiota sp.</i> , <i>Polystictus sp.</i> Y <i>Pleurotus</i> <i>spp.</i> (54).

Varios estudios se enfocan en la habilidad de los hongos de la pudrición blanca en la degradación de compuestos resistentes, principalmente los de la familia *Phanerochaete* donde se encuentra el género *Pleurotus spp* (55).

1.6.2 *Pleurotus spp.*

El género *Pleurotus spp*, presenta distribución cosmopolita, se cita tanto en África, América, Europa, Asia y Australia, e incluye especies comestibles de alto valor económico en varios países, *pleurotus ostreatus* (Jacq. Ex Fr) Kumm (Hongo ostra), es la especie mayormente cultivada (56).

En México su hábitat generalmente se localiza en zonas tropicales y subtropicales. Este género crece durante todo el año en las zonas de alta humedad y en algunas regiones fructifican preferentemente en la época de lluvias en los meses de junio a septiembre (57) (58).

Los nombres comunes con que se les conoce varían, dada su amplia distribución y según la ubicación geográfica en la que se encuentre. Así tenemos que en el estado de Morelos se le conoce con el nombre de “Oreja de Cazahuate”, “Hongo de Cazahuate”, “Cazahuate”. En el estado de México en Laguna Zempoala, y Huautla de Jiménez Oaxaca, como “Oreja Blanca”, En Calacuya y San Lorenzo Zacamulpa, Estado de México, como “Hongo de Maguey”. En Tehuacán Puebla como “Hongo de Encino” y en la parte central de Puebla (Atlixco) se le conoce como “hongo de cazahuate”. En Xalapa Veracruz, se le conoce como “Hongo de Patancán”. En Perote y Totalco, Veracruz, como “Hongo de Maguey”. En Uxpanapa, Veracruz como “Hongo de Cazahuate” y en el Estado de Quintana Roo como “Kushun – che”. En Coatepec, Veracruz y alrededores como “Hongo del Bagazo” (58).

Como se puede observar los nombres comunes hacen alusión al tipo de sustrato en el que crece y da una idea de la gran variedad de sustratos en la que el hongo *Pleurotus* puede desarrollarse.

El hongo (“spp” significa que el género *Pleurotus*, tiene varias especies), ha sido objeto de varias investigaciones en diferentes contextos, se han realizado estudios donde se demostró que *P. ostreatus* degrada la lignina conjuntamente con la celulosa, lo que ha permitido su cultivo industrial sobre residuos agroindustriales con fines alimenticios, constituyéndose en el tercer hongo cultivado más importante para propósitos alimentarios (59). Nutricionalmente es rico en proteínas, fibra, hidratos de carbono, vitaminas y minerales, además de tener un sabor y olor únicos (56) (60). En el área de la medicina se ha encontrado que el género *Pleurotus* lleva a cabo actividades antibacteriales, antivirales, antitumores, hematológicas y que ayuda en la reducción de los niveles de colesterol (60). Más estudios se han hecho en relación a los factores nutricionales de este género.

1.6.3 Especies del género *Pleurotus*.

Las principales especies en el género *Pleurotus* frecuentemente discutidas en la bibliografía, así como las más cultivadas en laboratorios, comercialmente y utilizadas en la investigación científica son las siguientes: *P. ostreatus*, *P. abalonus*, *P. citrinopileatus*, *P. columbinus*, *P. cornucopiae*, *P. cystidiosus*, *P. djamor* (citado como *P. flabellatus*), *P. dryinus*, *P. eryngii*, *P. levis*, *P. opuntiae*, *P. pulmonarius* (citado como *P. florida*) y *P. sajor-caju*, entre otras (61).

El micelio de estos hongos se ha empleado en procesos de biorremediación ambiental, debido a que puede retener o inmovilizar en sus paredes celulares a diferentes metales pesados, tanto en aguas residuales como en el suelo aprovechando la capacidad del hongo de absorber y acumular metales en su fase miceliar (62). Enzimáticamente tiene la propiedad de degradar compuestos hidrocarbonados con estructuras complejas, por lo que se ha comprobado su eficiencia en la degradación de derivados del petróleo (63). Se le ha utilizado como generador de lacasas para decolorar colorantes textiles de estructura azoica ($R-N=N-R'$) (64) (65).

1.6.4 *Pleurotus djamor*.

El hongo *Pleurotus djamor* es lignolítico, es decir, que se alimenta de la lignina degradándola mediante la producción de enzimas extracelulares, es decir, que son producidas dentro de las células de los hongos y realizan su función fuera del micelio. Crecen en forma de repisa de 20 a 60 mm de ancho sésil, liso, carnoso que va de color rosa a rojo, que suele tener un desarrollo muy rápido (66) (67) y tiene un himeneo con láminas delgadas juntas entre sí del mismo color que el píleo (68).

Por lo general, crece en grandes conjuntos sobre troncos podridos o frutales en descomposición. Crecen con las primeras lluvias y permanecen durante toda la temporada. En la figura 1.11 se puede observar un espécimen de *Pleurotus djamor* y sus partes.

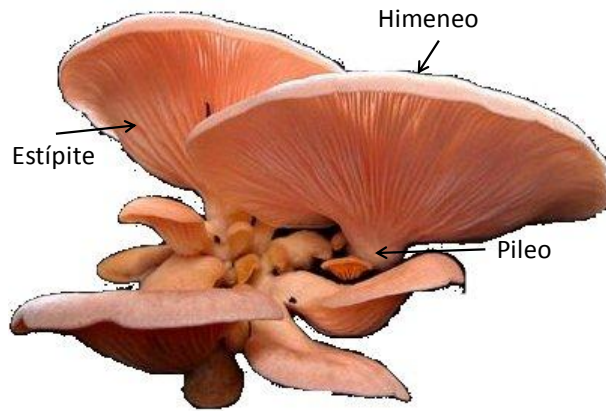


Figura 1.11 Partes del *Pleurotus djamor*.

La figura 1.12 (69), presenta la distribución geográfica de éste hongo alrededor del mundo. Los puntos amarillos señalan a México en varios sitios, Costa Rica, Argentina, Brasil, Hawai, Tailandia, Japón, Malasia, Singapur, entre otras.



Figura 1.12. Distribución geográfica del hongo *Pleurotus djamor*.

En este trabajo se ha elegido el *Pleurotus djamor* por no formar parte de las especies más consumidas en México, además de elegir la variedad rosa debido a que la mayoría de las especies de pleurotos consumidas son blancas o grisáceas (68).

La elección de este hongo para realizar este trabajo de tesis se debe a sus propiedades características de producir enzimas lacasas, xilanasas y celulasas.

1.7 Enzimas.

Si bien es cierto que los hongos *Pleurotus* son degradadores de lignina, celulosa y hemicelulosa, también es cierto que esto lo hacen mediante las enzimas que desprenden.

Las enzimas son proteínas cuya acción biológica consiste en la catálisis de las reacciones del metabolismo, las cuales tardarían mucho de no ser por la intervención de las enzimas (70).

Para entender cómo trabajan las enzimas se puede abordar el mecanismo de acción de las enzimas desde dos perspectivas. La primera es en términos de los cambios de energía que ocurren durante la reacción y la segunda describe cómo el sitio activo facilita la catálisis (71).

En cuanto a la primera; la eficiencia de la reacción enzimática se debe a que al agregar las enzimas específicas al sustrato disminuye significativamente la energía mínima que se requiere para que un sustrato se convierta en producto en sin la presencia de las enzimas. En la figura 1.13 se observa la energía libre de activación requerida por los reactantes para llevar a cabo la reacción es muy elevada, mientras que la línea continua indica una energía libre de activación menor cuando se agrega las enzimas adecuadas para dicho sustrato, mismo que va a poder convertirse en productos en menos tiempo y con menos energía (71) (72) .

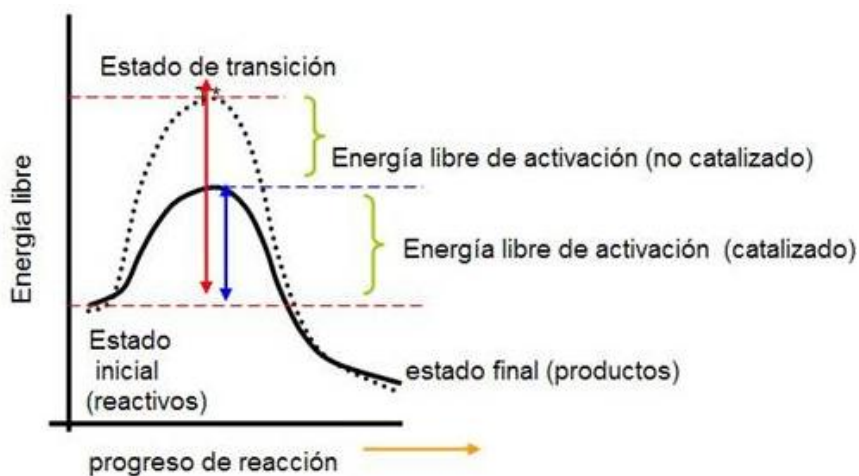


Figura 1.13 Comparación de energía libre de activación de una reacción con y sin enzimas catalizadoras.

Aunque por ahora no existe alguna explicación en términos químicos que pueda explicar la forma en que se lleva a cabo una reacción enzimática, se tiene certeza de que un elemento esencial en estas reacciones es la unión de sustratos (o productos). La unión del sustrato ocurre en o cerca de una región de la molécula de la enzima conocida como sitio activo, que es la otra forma de entender la forma de trabajo de las enzimas que ya se había mencionado (73)

El sitio activo (desde la perspectiva del sustrato) puede ser una hendidura o una concavidad profunda en donde el sustrato adecuado se une, al parecer, sólo en la orientación requerida y como cualquier catalizador acelera la reacción sin ser consumido en el proceso. En la figura 1.14 se observa la acción de la enzima en un sustrato específico, donde una enzima libre se une de manera temporal a la molécula de sustrato libre formando un complejo sustrato enzima en donde el sustrato se convierte en producto y se libera dejando libre a la enzima que se recupera y vuelve a estar libre para volver a unirse a un sustrato libre (71) (73).

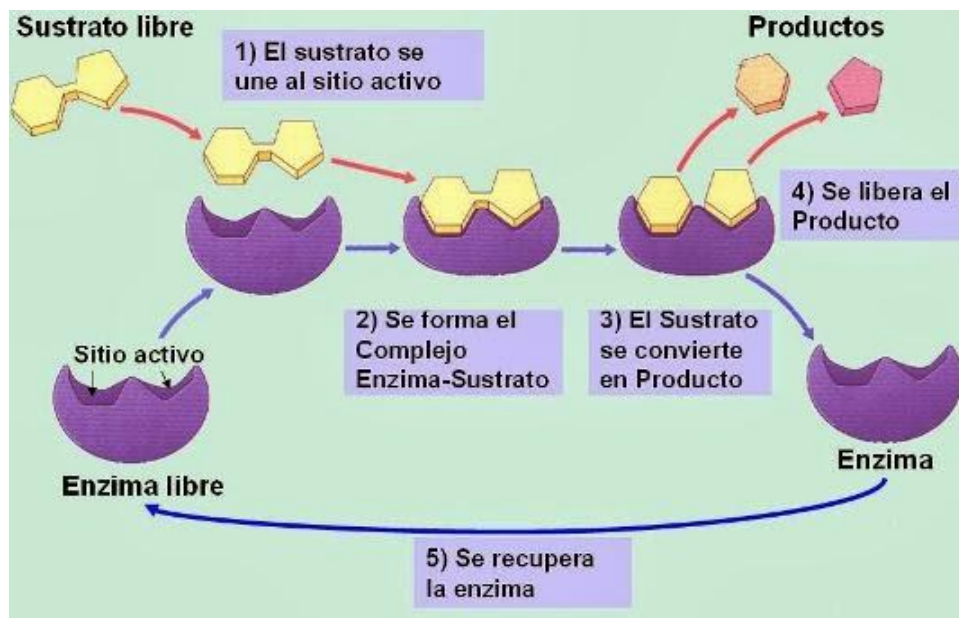


Figura 1.14. Acción de una enzima libre en un sustrato específico.

En la tabla 1.4 se pueden apreciar los factores que afectan la velocidad de reacción de las enzimas; como la temperatura favorece hasta determinado punto y en qué

condiciones puede llegar a ser perjudicial, pH, mismo que varía con respecto al tipo de enzima y concentración.

Tabla 1.4. Factores que afectan la velocidad de reacción de las enzimas.

VARIABLE	DESCRIPCIÓN.
Concentración.	La velocidad de reacción [μ moles de producto formado/min] de una enzima aumenta con la concentración del sustrato hasta llegar a su velocidad máxima. La nivelación de la velocidad de reacción a altas concentraciones de sustrato refleja la saturación con los sustratos de todos los sitios de unión disponibles en la enzima (71).
Temperatura.	<p>Incremento de la velocidad: La velocidad de reacción aumenta con la temperatura hasta que la velocidad máxima es alcanzada que va de 35 a 40°C. Esto se debe que el aumento de la temperatura ocasiona un aumento de la velocidad de las moléculas del sustrato y des enzimas, lo que aumenta la posibilidad de que ocurran colisiones moleculares entre la enzima y el sustrato. Formándose mayor cantidad de complejo enzima-sustrato (71).</p> <p>Decremento de velocidad: Las temperaturas mayores a la óptima provocan un decremento de la velocidad. Producto de la desnaturalización de la enzima debido a la alta vibración que causa el rompimiento de los enlaces de hidrógeno (71).</p>
pH.	Los cambios del pH pueden afectar la unión entre sustrato y enzima ocasionando la ruptura de diversos enlaces en la enzima que provoca un cambio en el sitio activo y desnaturaliza la enzima. El pH óptimo varía según la enzima de la que se trate. Para enzimas celulares el pH óptimo en 7, para las digestivas varía de 1 – 6 y para enzimas de la cavidad oral de 8 – 12 (71).

Bibliografía.

1. **Hu C., Zhao Z. K.** Biorefinery with microbes. [aut. libro] Gathergood N. Xie H. *The role of green chemistry in biomass processing and conversión*. New Jersey : Wiley, 2013, pág. 295.
2. **Anish R., Rao M.** *Lignocellulosic biomass: part III Hydrolysis a fermentation. Handbook of Plant-Based: Biofuels*. E.U.A. : CRC Press, 2009. pág. 160.
3. **Kaur S., Dhillon G. S., Sarma S. J., Bra S. K.r, Misra K., Obero H. Si.** Waste Biomass: A prospective renewable resource for Development of bio-based economy/processes. [aut. libro] Gurpreet, Singh Dhillon Carlos Ricardo Soccol Satinder Kaur Brar. *Biotransformation of Waste Biomass into High Value Biochemicals*. E.U.A : Springer, 2014, págs. 4-12, 139, 163.
4. **Cohen R., Hadar Y.** Fungi in agricultural waste conversion. [aut. libro] Gadd G. M. *Fungi in bioremediation*. Reino Unido. : Cambridge University Press, 2001, 10, págs. 4,5.
5. **Wade, L. G. Jr.** *Química Orgánica*. México : Pearson, 2012. pág. 1134. Vol. 2.
6. **Taiz L., Zeiger E.** *Plant physiology*. E.U.A. : Sinauer, 1998. págs. 361-363, 392.
7. **Audesirk T., Audesirk G., Byers B. E.** *Biología: ciencia y naturaleza*. México : Pearson, 2004. pág. 384.
8. **Calaza, P.** *Revisión bibliográfica y análisis comparativo de métodos de evaluación de riesgo de arbolado urbano : caso particular, La Coruña : tesis doctoral*. España : USC, 2007. pág. 35.
9. **Zarzuelo A, Galvez J.** Fibradietética. [aut. libro] Sánchez F. *Tratado de Nutrición: Bases Fisiológicas y bioquímicas de la nutrición*. 2a. Madrid : Médica Panamericana, 2010, Vol. I, 9, pág. 237.
10. **Adam, J. W.** *Structure and function of plants*. E.U.A. : Wiley Blackwell, 2007. pág. 4.
11. **Grödahl M., Gatenholm P.** *Role of acetyl substitution in hardwood xylan. Polysaccharides: structural diversity and functional versatility*. 2a. E.U.A : Severian Dumitriu, 1998. pág. 510.

12. **Lodish Berk, . Pag. 232.** *Biología celular y molecular.* México : Pearson, 2003. pág. 232.
13. *Ethanol production from energy crops and wastes for use as a transport fuel in Ireland.* **J.D. Murphy, K. McCarthy.** 149, s.l. : Applied Energy, 2005, Vol. 82, págs. 148–166.
14. **AGRICULTURA, ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA.** Depósito de documentos de la FAO. *El estado mundial de la agricultura y la alimentación 2000.* [En línea] FAO, 2000. <http://www.fao.org/docrep/x4400s/x4400s12.htm>.
15. **Vandamme, E. J.** Agro-Industrial Residue Utilization for Industrial Biotechnology Products. [aut. libro] Ashok Pandey Poonam Singh nee' Nigam. *Biotechnology for agro-industrial residues utilisation: utilisation of agro-residues.* Reino Unido 2009 : Springer, 1, págs. 4,5.
16. **Head S. W., Swetman A. A., Hammonds T. W., Gordon A., Southwell K. H., Harris R. V.** *Small Scale Vegetable Oil Extraction.* Gran Bretaña : NRI, 1995. pág. 105.
17. *Oil cakes and their biotechnological applications – A review.* **Ramachandran S., Singh S. K., Larroche C., Soccol C. R., Pandey A.** 10, s.l. : Bioresource Technology, 2006, Vol. 98, págs. 2000-2009.
18. **Anugraha, Apartments.** Castor Oil.in. *Comprehensive Castor Oil Report A report on castor oil & castor oil derivatives. 2010.* [En línea] http://www.renewable-energyeilat.org/sites/default/files/Castor_Oil_Report%20Nov%202010.pdf.
19. **Ganduglia F., León J. G., Gasparini R., Rodríguez M. E., Huarte G. J. y Estrada J., Filgueiras E.** *Manual de biocombustible.* Perú : ARPEL– LICA, 2009. págs. 140, 141.
20. **Pedrosa D. M., de Macêdo N. E. O.** *Agronegócio da mamona no Brasil.* Brasil : Embrapa, 2007. págs. 23 – 134.
21. **Apartments, Anugraha.** CastorOil.in. [En línea] 2014. http://www.castoroil.in/downloads/Preview_of_Comprehensive_Castor_Oil_Report.pdf.
22. **fish, Fact.** factfish.com. *India: Castor oil seed, production quantity (tons).* [En línea] 2013. <http://www.factfish.com/statistic-country/india/castor%20oil%20seed,%20production%20quantity>.

23. **Fonnegra G. R., Jiménez R. S. L.** *Plantas medicinales aprobadas en Colombia*. Colombia : Editorial Universidad de Antioquia, 2007. pág. 140.
24. **Dufey, Annie.** *Producción y comercio de biocombustibles y desarrollo sustentable*. Londres : lied, Londres. pág. 3.
25. *Biofuels: Environment, technology and food security*. **Escobar, J. C, Venturini, E. S. y Yáñez, O. J.** s.l. : Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2009, Vol. 13, pág. 1276.
26. *Environmental and Sustainability Factors Associated With Next-Generation Biofuels in the U.S.: What Do We Really Know?* **Williams R. D. P., Inman D., Aden A., Heath G. A.** 13, s.l. : Environmental Science Technology, 2009, Vol. 43, págs. 4763–4775.
27. **BR&Di.** National biofuels action plan. [En línea] 2008. www1.eere.energy.gov/biomass/pdfs/nbap.pdf.
28. **IICA.** *América Latina y el Caribe Mapeo político-institucional y análisis de la competencia entre producción de alimentos y bioenergía*. Procitropicos. Costa Rica : IICA, 2010. págs. 23-28.
29. **Gastón F., Beling A.** *La energía de los emergentes: innovación y cooperación para la promoción de energías renovables en el sur global*. Argentina : Teseo, 2012. págs. 249-252.
30. **FAO.** *El Estado mundial de la agricultura y la alimentación*. Roma : FAO, 2008. págs. 11-21.
31. *Bioethanol production potential from Brazilian biodiesel co-products*. **Visser E. M., Filho D. O., Martins M. A., Stewar B. L.** 35, s.l. : Biomass and bioenergy, 2011, págs. 489-494.
32. *Producción de etanol a partir de diferentes materias primas, un análisis comparativo*. **Otero M. A., Saura G., Martínez-Valdivielso J. A.** 2, s.l. : ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, 2005, Vol. XXXIX, págs. 18-21.
33. *Producción de etanol carburante: material lignocelulósico una nueva alternativa*. **Cordona C. A., Julián O., Montoya M. I., Quintero J. A.** 3, s.l. : Ingeniería de Recursos Naturales y del Ambiente, 2005, Vol. 1, págs. 47-55.

34. *Bioenergy and the potential contribution of agricultural biotechnologies in developing countries*. **J. Ruane, A. Sonnino, A. Agostini**. Roma : Biomass and bioenergy, 2010, Vol. 34, págs. 1427-1439.
35. *An overview of biofuel policies across the world*. **Sorda G., Banse M., Kemfert C.** 11, Germany : Energy Policy, Vol. 38, págs. 6977–6988.
36. **Nigam P. S, Gupta N., Anthwal A.** *Biotechnology for agro-industrial residues utilisation*. North Ireland : Springer, 2009. págs. 16-20.
37. **Amarasekara A., Wiredu B.** A comparison of the use of dilute aqueous p-toluenesulfonic acid and in single steppretreatment – saccharificationof biomass. [aut. libro] Méndez-Vilas A. *Fuelling the future: Advances in science and technologies for energy generation, transmission and storage*. E.U.A. : BrownWalker Press, 2012, pág. 3.
38. **A.S., Amarasekara.** *Handbook of Cellulosic Ethanol*. E.U.A. : Scrivener Publishing-Wiley, 2014. págs. 283-288.
39. *Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production*. **Kumar P., Barrett D. M., Delwiche M. J., Stroeve P.** 8, s.l. : I&EC, 2009, Vol. 48, págs. 3713–3729.
40. *Review of pretreatment processes for lignocellulosic etanol production, and development of an innovative method*. **Chiaromonti D., Ferrero S. M. F., Oriani L., Ottonello P., Torre P., Cherchi F.** 46, s.l. : Biomass and bioenergy, 2012, págs. 25 - 35.
41. *Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. Canada*. **Agbor V. B., Cicek N., Sparling R., Berling A., Levin D. B.** s.l. : Biotechnology advances, 2011, Vol. 29, págs. 675–685.
42. *Optimization of bioethanol production from glycerol by Escherichia coli SS1*. **Azreen N. A., Suhaimi S. N., Abd-Aziz S., Hassan M. A., Phang L.** 66, s.l. : Renewable Energy, 2014, págs. 625 – 633.
43. *Energy requirement for lignocellulosic feedstock densifications in relation to particle physical properties, Preheating, and binding agents*. **Miao Z., Grit T. E., Hansen A. C., Ting K. C.** 27, s.l. : Energy & Fuels, 2013, Vol. 1, págs. 588-595.

44. *Dilute sulfuric acid pretreatment of transgenic switchgrass for sugar production.* **Zhou X., Xu J., Wang Z., Cheng J. J., Li R., Rongda Qu R.** 104, s.l. : Bioresource Technology, 202, págs. 823–827.
45. *Producción de bioetanol a partir de subproductos lignocelulósicos.* **Sánchez A. M., Gutiérrez A. I., Muñoz Hernández J. A., C. A. Rivera C. A.** 5, Colombia : Universidad de Tolima, 2010, Vol. 1.
46. *Enhanced exoglucanase production by brown rot fungus Fomitopsis sp. RCK2010 and its application for cellulose saccharification.* **Deepa Deswal, Rishi Gupta, Ramesh Chander Kuhad.** 7, s.l. : Applied Biochemistry and Biotechnology, 2012, págs. 2004-2016.
47. *Evaluation of different carbon sources for production of iron-reducing compounds by Wolfiporia cocos and Perenniporia medulla-panis.* **Valdeir Arantes, Adriane M.F. Milagres.** 4, s.l. : Process Biochemistry, 2006, Vol. 41, págs. 887–891.
48. **Gama, M. A.** *Biología 1: Un enfoque constructivista.* 3a. México : Pearson Prentice Hall, 2007. pág. 238.
49. **Campbell N. A., Reece J. B.** *Biología.* España : Panamericana, 2005. págs. 609 - 610.
50. **Kendrick, B.** *Fungi and the History of Mycology.* Sidney, Canada : Wiley.
51. **Riveros, Alba Stella.** *Inducción de resistencia en plantas Interacción: Planta-Patógeno.* Colombia : Universidad de Tolima Ibagué, 2010. pág. 20.
52. **Herrera T., Ulloa M.** *El reino de los hongos: micología básica y aplicada.* México : UNAM, 1990.
53. **Capuz, R.** *Materiales orgánicos: maderas.* España : UPV, 2005. pág. 111.
54. **Caneva, G., Nugari, M. P. y Salvadori, O.** *La biología en la restauración.* España : Nerea, 2000. pág. 81.
55. **Morrison D. J., Williams R. E., Whitney R.** *Infection, disease development, diagnosis, and detection.* E. U. A. : Forest Service Publications, 1991. págs. 62-75.

56. **Chang S. T., Miles, P. G.** *Edible mushrooms and their cultivation*. Florida : CRC Press, 2004. pág. 345.
57. *Genus Pleurotus (Jacq.: Fr.) P. Kumm. (Agaricomycetidae): diversity, taxonomic problems cultural and traditional medicinal uses.* **Guzmán, G.** 2, s.l. : The International Journal of Medicinal Mushrooms, 2000, págs. 95-123.
58. *Studies of the Genus Pleurotus (Basidiomycotina), II. P. djamour in Mexico and in other Latin American Countries, Taxonomic Confusions, Distribution and semi-Industrial Culture. Cryptogamic Botany.* **Guzmán G., Montoya L., Salmones D., Bandala V.** México : Instituto de Ecología, Xalapa, 1993, Vol. 3, págs. 213-220.
59. **Gaitán R., Salmones D., Pérez R., Mata G.** *Evaluación de la eficiencia biológica de cepas de Pleurotus pulmonarius en paja de cebada fermentada.* México : Revista mexicana de micología, 2009.
60. **Cohen R., Persky L., Hadar Y.** *Biotechnological applications and potential of wood degrading mushrooms of the genus Pleurotus.* s.l. : Applied Microbiology and Biotechnology, 2002. págs. 582-594.
61. *Safety Assessment of Transgenic Organisms.* Francia : OECD, 2006. pág. 277. Vol. 1.
62. *Interactions of heavy metals with white-rot fungi.* **P., Baldrian.** 1, s.l. : Enzyme and Microbial Technology, 2002, Vol. 32, págs. 78-91.
63. **M., Leal C.** *Biorremediación de un suelo agrícola contaminado con aceite residual automotriz.* México : Universidad de Colima, 2003. pág. 131.
64. *Degradation of xenobiotic compounds by lignin-degrading white-rot fungi: enzymology and mechanisms involved.* **Shrivastava C., Modi S., Vyas B. R.** 4, s.l. : Indian journal of experimental biology, 2005, Vol. 43, págs. 301-312.
65. **Rodríguez P. S., Bermudez S. R. C., Serrat D. M., Kourouma A.** *Selección de cepas de Pleurotus ostreatus para la decoloración de efluentes industriales.* *Revista mexicana de micología.* México : Sociedad Mexicana de micología, 2006. págs. 9-15.
66. **T., Cotter.** *Organic Mushroom Farming and Mycoremediation.* E. U. A. : FSC, 2014. pág. 334.

67. **S., Cappello.** *Hongos del Yumka*. México : Universidad Autónoma de Tabasco, 2006.
68. **Leal, H.** *Biotecnología alimentaria*. México : Limusa, 2004. págs. 351, 352.
69. **Global Biodiversity Information Facility.** Discovery life. [En línea]
http://www.discoverlife.org/mp/20m?r=.5&t_la=38&t_lo=145&kind=Pleurotus+djamor&place=target.
70. **C., Montero.** *Manual de técnicas de histoquímica básica*. México : Universidad Autónoma de San Luid Potosí, 1997. pág. 114.
71. **Champe P., Harvey R.** *Biochemistry*. 2a. E.U.A. : Lippincott Williams and Wilkins, 1994. pág. 49.
72. **Conn E., Stumpf P., Bruening G., Doi R.** *Bioquímica Fundamental*. México : Limusa, 2001.
73. **Garrido A., Tejón J. M., Blanco D., Villaverde C., Mendoza C., Ramírez J.** *Fundamentos de bioquímica estructural*. Madrid : Tébar, 2006. pág. 193.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA.

En éste capítulo se abordan los métodos, reactivos y materiales para la realización de este trabajo de tesis. En primer lugar se presenta la metodología para la obtención de la torta de extracción de aceite de ricino a la que se sometió a una segunda extracción de aceite por maceración, así como las técnicas empleadas para el análisis químico proximal, sus modificaciones y la caracterización fisicoquímica que aportó información de la composición de la torta de extracción de aceite de ricino. También se encuentra descrito el método que fue empleado para el cultivo en sustrato sólido (en este caso la torta), así como la técnica empleada en la extracción de las enzimas extracelulares producidas por el hongo *Pleurotus djamor* y la determinación de actividad enzimática de celulasas y xilanasas. Además, se incluyen las características de los equipos empleados para el análisis de la torta de extracción, así como para las determinaciones enzimáticas.

2.1 MÉTODOS

2.1.1 obtención de residuo.

Para obtener el residuo lignocelulósico o torta de extracción se pesaron en una balanza analítica marca Denver Instrument 10 kilogramos de semilla de higuera recolectada en estado silvestre en las coordenadas 18°59'52" N – 98°20'53"O correspondientes a la ubicación de Cuacnopalan, Puebla, México. Posteriormente, se realizó la extracción de aceite de semilla de ricino mediante prensado mecánico caliente a 220°C en la prensadora AMEX-PLUS de 5.6 Kw/(61rpm) ubicada en el laboratorio de biocombustibles de la Facultad de Ingeniería Química de la BUAP.

2.1.2 Determinación de la cantidad de aceite de ricino en la torta.

Después de haber obtenido la torta o residuo lignocelulósico se procedió a tomar muestras con el fin de obtener la cantidad de aceite contenido en la torta, el cual se realizó mediante el método soxhlet (1). En primer lugar se llevó a peso constante un matraz de bola marca IVA (2). Posteriormente, se agregaron 200 mL de alcohol al 99.8% de pureza marca Meyer secado por el método descrito por Armaregon y Perrin (3). El matraz fue ensamblado a un dispositivo de extracción soxhlet en el que fue colocado un capuchón de celulosa marca Startorius grado 30 de 33 x 80 mm con 10 gramos de torta pesada en la balanza analítica y se tapó con algodón. El equipo de extracción fue conectado a un refrigerante tipo Allihn de vidrio conectado a su vez a un recirculador marca Eseve.

Posteriormente, se evaporó el alcohol del aceite mediante una destilación a presión reducida con un vapor marca BURICH R-3 a 60°C con vacío y, finalmente, se pesó el matraz con aceite obtenido.

Para la determinación de aceite se utilizó la fórmula 1:

$$\% \text{ de aceite} = \frac{P-p}{M} \times 100 \quad [1]$$

Donde

P = Masa en gramos del matraz con grasa.

p = Masa en gramos del matraz sin grasa.

m = Masa en gramos de la muestra.

2.1.3 Disminución de porcentaje de aceite en torta.

Debido a que en el laboratorio no se cuenta con un aparato soxhlet de gran capacidad para la recuperación del aceite contenido en la torta, se le trató con una antigua técnica reportada conocida como maceración (4) (5). Dicho tratamiento consistió en mantener sumergida la torta en metanol (99.8% de pureza marca Meyer) con una proporción 1:1 durante dos semanas; posteriormente, se le retiró el metanol y se le reemplazó por nuevo metanol en la misma proporción, se dejó macerar durante tres días realizando agitaciones periódicas. Luego de transcurrido el tiempo se drenó, se dejó secar y se realizó la determinación de aceite por el método soxhlet (1).

2.2 Análisis químico proximal.

El análisis químico proximal consiste en realizar la determinación del porcentaje de agua, lípidos, carbohidratos, fibra cruda, proteínas y cenizas contenidos en una muestra. Para lo cual se realizan una serie de análisis por triplicado a fin de tener una buena aproximación.

2.2.1 Determinación de proteínas.

La determinación de proteínas es posible debido a que se compone principalmente de nitrógeno y a que se encuentran reportados factores mediante los cuales es posible determinar su porcentaje. Estas son las bases de la técnica empleada para la cuantificación de proteína empleada conocida como Kjeldahl (6). Consiste en agregar una mezcla de sulfato de potasio y sulfato cúprico a 0.02 a 0.04 gramos de muestra libre de grasa a la que se agregaron 3 mL de ácido sulfúrico en un tubo Kjeldahl marca Eseve. Consecutivamente, se introdujeron en un aparato Kjeldahl y se aumentó la temperatura a 100°C, en donde permaneció durante 30 minutos, se aumentó después a 200°C durante 30 minutos y finalmente se aumentó a 300°C donde permaneció hasta cambiar de color. Cuando esto sucede se esperó a que se enfriara y se le agregó 50 mL de agua destilada y 10 mL de NaOH al 40%.

Posteriormente, se realizó una destilación simple empleando una manta de calentamiento marca Eseve de 250 mL en donde se llevó a punto de ebullición la solución obtenida de la digestión en un matraz de bola de 250 mL marca Kimax Kimble ensamblada a una cabeza de destilación que contenía 5 mL de ácido bórico al 4% y 2 gotas de reactivo wesslow unida a un refrigerante. El destilado fue recuperado en un matraz Erlenmeyer de 125 mL marca Schott y titulado empleando una bureta marca Kimax Kimble con HCl 0.02N. Se utilizó la fórmula 2 para la determinación de nitrógeno y el factor de conversión correspondiente a semillas y oleaginosas reportado por la FAO (7).

$$\% \text{ Nitrógeno} = (V \times N \times 0.014 \times 100) / m \quad [2]$$

Donde:

V= volumen de aforo.

N= Normalidad de HCl.

m= masa de la muestra.

2.2.2 Determinación de agua.

Luego de haber extraído exceso de aceite y secar los residuos lignocelulósicos se realizó la determinación de humedad mediante el método reportado por la FAO (8), en donde se utilizó un crisol que se llevó a peso constante (2). Se pesaron 5 mg de muestra en una balanza analítica y se sometió a una temperatura de 130°C durante 3 horas en una estufa marca Binder; posteriormente, se sacó de la estufa, se dejó enfriar en un desecador y se pesó en la balanza analítica.

La fórmula 3 fue empleada para la determinación de humedad:

$$\% \text{ de humedad} = \frac{\text{g de muestra} - \text{g de muestra seca}}{\text{g de muestra}} \times 100 \quad [3]$$

2.2.3 Determinación de cenizas.

Una vez realizada la determinación de humedad se procedió a definir la cantidad de cenizas contenida en el residuo lignocelulósico se siguió el método descrito en la Norma Mexicana NMX-Y-093-SCFI-2003 (9), en el que se llevó el crisol a peso constante (2), se pesaron 2 gramos de muestra, se metieron a una mufla marca Terlab a 600°C durante 2 horas, se dejó enfriar el crisol, se pasó al desecador y se pesó en la balanza analítica. La fórmula 4 fue empleada para la determinación de cenizas:

$$\% \text{ de cenizas} = \frac{\text{g de crisol con cenizas} - \text{g de crisol}}{\text{g de muestra}} \times 100 \quad [4]$$

2.2.4 Determinación de fibra cruda.

Por otra parte, la determinación de fibra (2) se realizó mediante el método reportado en el manual de evaluación de alimentos de la FAO (10). Para realizar la determinación de lignina se pesaron 2 gramos de muestra libre de grasa y se agregaron a un vaso de precipitado de 500 mL al que se vertieron 200 mL de ácido sulfúrico con perlas de ebullición y se llevaron a punto de ebullición en una parrilla eléctrica marca Cimarec durante 30 minutos, se filtró y se repitió el procedimiento con la solución de NaOH, se filtró, dicho filtrado se colocó en un crisol y se metió a una estufa marca Blinder a secar a 120°C durante una hora, posteriormente, se sacó, se dejó enfriar en un desecador y se pesó.

Luego de haber obtenido el primer peso se metió a la mufla a 600°C, se dejó enfriar un poco, se colocó en el desecador y se pesó. La fórmula 5 fue empleada para la determinación de fibra cruda.

$$\%FIBRA = \frac{P1-P2}{w} \times 100 \quad [5]$$

Donde

p1: Fibra

p2: Ceniza

w: Peso total de la muestra.

2.2.5 Determinación carbohidratos totales.

En lo que respecta a la determinación de carbohidratos se calcula como la cantidad necesaria para completar 100% del análisis químico proximal (13) (14). Para el cálculo de cenizas se empleó la fórmula 8.

$$\%Carbohidratos = 100\% - \%humedad - \%lípidos - \% carbohidratos - \% fibra cruda - \%proteína - \%cenizas \dots\dots\dots[6]$$

2.2.6 Determinación de lípidos.

Una vez disminuido el contenido de aceite en la torta de extracción se determinó el contenido de aceite en la torta.

2.3 Caracterización físico química.

La caracterización fisicoquímica consistió en la determinación de azúcares reductores directos, azúcares reductores totales, la determinación de lignina, de carbohidratos y de pH.

2.3.1 Determinación de azúcares reductores directos y azúcares reductores totales.

Los azúcares reductores directos son los azúcares provenientes de la glucosa y la fructosa mientras que los azúcares reductores totales son polisacáridos que provienen de la sacarosa, la celulosa o de otros polisacáridos (15).

La determinación de azúcares reductores directos se realizó mediante la técnica de Lane-Eynon descrita por la norma mexicana NMX-F-312-1978, la cual consiste en realizar una titulación.

En primera instancia se realiza una alícuota con 3 g de torta de semilla de higuera aforando a 100 mL de agua, posteriormente se realiza una solución mezclando 5 mL de reactivo Fehling A, 5 mL de reactivo Fehling B marca Meyer y 200 mL de agua destilada. La solución fue llevada al punto de ebullición, se agregó azul de metileno y se tituló con la alícuota. En el caso de la determinación de carbohidratos totales se somete la alícuota a una hidrólisis por medio ácido empleando una solución de ácido clorhídrico (1:1) que se calentó a ebullición durante 30 minutos y se procedió a realizar el mismo procedimiento que en la técnica de azúcares totales.

La fórmula 8 fue empleada para ambas determinaciones:

$$\% \text{ azúcares reductores} = \frac{F \cdot V}{m \cdot g} \times 100 \quad [7]$$

Donde:

F: Factor de Fehling equivalente a 0.5

V: Volumen del aforo

m: Masa de la muestra

g: Volumen del filtrado empleado en la titulación

2.3.2 Determinación de lignina.

La lignina fue determinada por el método de Klason (11), en el que se introdujeron 250 mg de muestra libre de aceite en un matraz de 150 mL, se le agregó 2.5 mL de ácido sulfúrico al 72% y se mantuvo en ebullición durante 30 minutos. Acto seguido, fueron agregados 70 mL de agua destilada y se introdujeron a una autoclave marca presto de 21L a

120°C y 120 Kg/cm². Posteriormente, se filtró en un crisol Gooch y se realizaron lavados hasta alcanzar un pH de 6. Para la determinación de lignina se hizo uso de la fórmula 6:

$$\% \text{ Lignina} = \left(\frac{w_f - w_i}{w_{\text{muestra}}} \right) \quad [8]$$

Donde:

w_f: peso final.

w_i: Peso de crisol y papel filtro.

W_{muestra}: Peso de la muestra.

2.3.3 Determinación de celulosa.

La determinación celulosa se realizó por balance, tomando en cuenta que la fibra cruda es la suma de la celulosa y la lignina de acuerdo a lo estipulado por la FAO (12), en la fórmula 7 se observa la forma en la que se calculó la celulosa.

$$\text{Celulosa} = \text{Fibra cruda} - \text{Lignina} \quad [9]$$

2.3.4 Determinación de pH.

El pH se determinó mediante la técnica descrita en la norma mexicana NMX-F-317-S-1978 (16) que consiste en calibrar el potenciómetro a 4 y 7 con soluciones patrón, una vez calibrado se realizaron soluciones de 9 mL por cada 3 g de muestra a 20°C.

2.4 Producción de micelio.

La cepa de *Pleurotus djamor* empleada fue recolectada en el municipio de Atlixco, Puebla por el laboratorio de micología del ICUAP y cultivada a 28°C. Esta cepa fue multiplicada en batería de micelio a emplearse en el cultivo, para lo cual se requirió elaborar agar de papa con una composición aproximada por litro de 4 g de almidón de papa, 20 g de dextrosa y 15 g 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 (17). Se introdujeron en una incubadora microbiológica marca Rios Rocha a 28 °C durante 5 días.

Este procedimiento se repitió dos veces más a fin de asegurar que la cepa estuviera libre de agentes contaminantes.

2.5 Ensayo experimental.

Con el fin de determinar si en realidad era necesaria o no la paja para aumentar el área de contacto, se realizaron pruebas preliminares con 100% torta a la que se etiquetó como 100T, 90% torta - 10% paja (etiquetada como 90T), 80% torta – 20% paja (etiquetada como 80T) y 70% torta - 30 % de paja (etiquetada como 70T). Dicha paja fue procesada y agregada al residuo lignocelulósico que llamaremos sustrato cuando se trate del cultivo. Se aumentó la humedad al 80% agregando agua destilada, fueron pesados 17 gramos de muestra en una balanza analítica e introducidos en tubos de vidrio con tapa de rosquilla.

Posteriormente, se esterilizaron en una autoclave marca Presto a 120°C y 15 psi durante 20 minutos, se dejó enfriar y se realizó el cultivo mediante la técnica de Pitt y Hoking, inoculando cada unidad experimental con iguales cantidades de biomasa micelar(0.1g de micelio en peso seco) (17), se introdujeron en la incubadora microbiológica marca Rios y Rocha a 28°C, se observó el crecimiento y se determinó el sustrato a usar.

2.6 Cultivo en sustrato.

Inicialmente se procedió a la homogenización del tamaño de partícula. Para lo cual se emplearon tamices de acero inoxidable del número 10, 20 y 40, quedando dos muestras; la primera en un intervalo de 0.420 – 0.841mm y la segunda en un intervalo de 0.841 – 2.0 mm. Posteriormente se aumentó la humedad del sustrato al 80% y se prepararon 38 tubos de vidrio con tapa de rosquilla en los que se agregaron 15 gramos del sustrato húmedo a cada uno. A continuación se esterilizaron en una autoclave marca presto a 120°C y 15 psi durante 50 minutos, se dejó enfriar y se realizó el cultivo mediante

la técnica de Pitt y Hoking (17), se introdujeron en la incubadora microbiológica a 28°C, durante 8 días y a partir del día 8 se realizaron 6 extracciones enzimáticas cada 3 días.

2.7 Extracción enzimática.

Como se menciona en el apartado anterior se realizaron 6 extracciones a partir del día 8 de incubación cada 3 días y fueron etiquetadas como lo ilustra la tabla 2.1.

Tabla 2.1 Códigos extracciones enzimáticas.

Día	pH 4.8	pH 5.3
8	1C	1X
11	2C	2X
14	3C	3X
17	4C	4X
20	5C	5X
23	6C	6X

Para la extracción enzimática se retiró el micelio y se homogenizó el sustrato en el que se creció el hongo durante la etapa de cultivo en la etapa anterior. Se pesaron 10 gramos de muestra, se le agregaron 15 mL de solución Buffer de Citratos pH 4.8 para favorecer estabilidad de celulasas y pH 5.3 (18) (19) para favorecer la estabilidad de xilanasas y se homogeneizaron en un agitador de rotación circular a 90 rpm marca Civeq durante 5 minutos.

Una vez realizada la agitación se realizó la separación de sólidos agregando el extracto enzimático en tubos falcon con punta de 50 mL, se sometieron a centrifugación durante 35 minutos a 3000 rpm en una centrífuga Solbat, se vertió en otro tubo de centrífuga y se volvió a centrifugar a 3000 revoluciones durante 35 minutos. Después, se llenaron tubos eppendorf de 2 mL y se congelaron a -20°C para su posterior determinación de actividad enzimática.

2.8 Determinación enzimática.

Para la determinación enzimática de xilanasas y celulasas se requirió de una solución de xilano al 0.5% utilizando xilano marca sigma CAS 9014-63-5 y una solución carboximetilcelulosa (CMC) al 0.5% empleando CMC marca Meyer Cat.5895 así como

una solución 3,5 DNS marca Aldrich, buffer de citratos pH 4.8 y 5.3, se empleó la técnica de Miller (20) encubando 5 minutos tanto celulasas como xilanasas. La lectura de la actividad enzimática se realizó en un espectrofotómetro marca Jenway 6405V/Vis (190 a 1100nm) a una longitud de onda de 540Å, en donde se leyó la absorbancia.

Mediante la fórmula de la pendiente obtenida en la curva de calibración se obtuvo la actividad enzimática expresada en UI/gss que equivale a unidades internacionales por gramo de sustrato sólido en buffer de citratos con pH 4.8 y buffer de citratos pH5.3.

2.9 Curva de calibración.

La curva de calibración se realizó mediante la técnica reportada por Pickering (21), se obtuvo la fórmula de la pendiente que se encuentra en el anexo, misma que se empleó para la determinación de xilano y CMC consumidos por el extracto enzimático.

2.10 Biodegradabilidad enzimática.

Para la biodegradabilidad enzimática se emplearon las enzimas extracelulares generados por el hongo *Pleurotus djamor* en los días de mayor actividad correspondientes al día 11 con buffer de citratos pH 4.8 que favorece la estabilidad de celulasas (18) producidas en el sustrato con tamaño de partícula 0.841 – 2 mm y del día 14 con buffer de citratos de pH 5.3 que favorece la estabilidad de xilanasas (18) producidas en el sustrato con tamaño de partícula 0.420 – 0.841 mm. En lo que respecta a la preparación del sustrato, el procedimiento fue el mismo que el empleado en la sección 2.1.13 de este mismo capítulo.

Las enzimas fueron diluidas en buffer de citratos en una proporción 1:1 e incubadas con base al método descrito por Dagnino (22) agregando 20 mL de solución enzimática y variando las condiciones a 90 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se dejaron actuar en una estufa microbiológica y se realizó determinación de lignina los días 5, 10 y 15 de ambos tamaños de partícula siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 2.1.8

2.11 EQUIPOS.

2.11.1 DRX.

La torta extracción de aceite de ricino fue analizada en un difractómetro de rayos X marca Bruker C8 Discover, que trabaja con un haz de electrones que provienen de un filamento de cobre cuya longitud de onda es 1.5418 Å. Las condiciones de análisis fueron 0.6 segundos de tiempo de paso, 0.04° de tamaño de paso en un intervalo de 2 theta de 5 a 70°.

Aprovechando que se realizó la deconvolución, se llevó a cabo el cálculo del índice de celulosa cristalina, la cual se obtiene mediante la fórmula 10:

$$C = 100 \times \frac{I_{cr\ pico1} + I_{cr\ pico\ 3} + I_{cr\ pico\ 4}}{I_{cr\ pico1} + I_{cr\ pico\ 3} + I_{cr\ pico\ 4} + I_{no-crist}} [\%] \quad [10]$$

C es índice de celulosa cristalina

I_{cr pico1} representa el área bajo la curva de la reflexión centrada en 15 grados de 2θ

I_{cr pico2} la reflexión centrada en 16.5 grados de 2θ

I_{cr pico3} la reflexión centrada en 22.8 grados de 2θ.

I_{no-crist} es el área bajo la curva del pico asignado a la sección no cristalina de la celulosa (23).

Para la determinación del tamaño de cristal se empleó la ecuación de Scherrer que se presenta en la fórmula 11.

$$\beta = \frac{k \times \lambda}{FWHM(S) \times \cos\theta} \quad [11]$$

Donde:

β es el tamaño promedio de cristal

K es el factor de forma del cristal y su valor es de 1.0 15

λ es la Longitud de onda de la radiación utilizada (λCu)

θ es la posición del pico de difracción.

FWHM (S) es el ancho a la altura media del pico de difracción de la muestra

2.11.2 Microscopía electrónica de barrido.

Se empleó un equipo JEOL JSM-6610 LV para realizar la microscopía electrónica de barrido SEM (por sus siglas en inglés *Scanning Electron Microscope*) y el análisis elemental. Para lo cual se adhirió la muestra en una cinta de carbono doble cara; posteriormente, se recubrió con oro empleando electrones secundarios en el caso de la microscopía y para el análisis elemental por Espectroscopia de Dispersión de Energía (EDS, por sus siglas en inglés), se analizó la muestra empleando electrones retrodispersados sin haber recubierto la torta.

2.11.3 Determinación de área específica.

Con el fin de comparar el área específica de la torta y de la paja se realizaron mediciones pesando 0.5012 g de torta de prensado y 0.5015 g de paja para lo cual se utilizó N_2 a $-196^\circ C$ en el equipo Chemisorb 2750 sin llevar a degasificación. La determinación del área específica se realizó utilizando el método desarrollado por Brunauer, Emmet y Teller (BET) (24).

Bibliografía.

1. **Sanz I., Raigón D., Llorens J. A., Llopis R.** *Prácticas de química orgánica: experimentación y desarrollo.* España : UPV, 2002. págs. 48-49.
2. **Skoog D., Donald M. West F., Holler J.** *Fundamentos de química analítica.* 4a. España : Reverté, 2001. págs. 800-850. Vol. 2.
3. **Armaregon, W. L. y Perrin, D. D.** *Purification of laboratory chemicals.* Reino Unido : Heinmman, 1999. pág. 6.
4. **E., Dobislaw.** *Formulario de licorería.* España : Reverté, 1959. págs. 45-47.
5. **Hidalgo, J.** *Tratado de Enología.* México : Grupo Mundi-Prensa, 2002. págs. 789-792. Vol. 2.
6. **Agriculture and consumer protection department.** Food and agriculture organization of the united nations. [En línea] <http://www.fao.org/docrep/010/ah833s/ah833s17.htm>.
7. **pesca, Departamento de.** Depósito de documentos de la FAO. *Nutricion y alimentacion de peces y camarones cultivados. Manual de capacitacion.* [En línea] <http://www.fao.org/docrep/field/003/ab492s/ab492s06.htm>.
8. **Agricultura, Departamento de.** Depósito de documentos de la FAO. *Producción y manejo de datos de composición química de alimentos en nutrición.* [En línea] <http://www.fao.org/docrep/010/ah833s/Ah833s16.htm>.
9. **NORMAS, DIRECCION GENERAL DE.** Diario oficial. [En línea] http://www.dof.gob.mx/nota_detalle_popup.php?codigo=698579.
10. **FAO.** Manual de métodos. [En línea] <http://www.ciens.ucv.ve:8080/generador/sites/mmedina/archivos/Manual%20metodos%20deLabFao.pdf>.
11. —. *Los carbohidratos en la nutrición humana.* ROMA : FAO, 1997. pág. 83.
12. —. *Los Carbohidratos en la nutrición humana: informe de una Consulta mixta FAO/OMS de expertos.* Italia : FAO, 1999. pág. 81.

13. **Soledad B., Adames J., Luzaedo M.** *Estudio nutricional de las hojas de Grifo Negro (Maculobium Bicuspidatum) Tekhne.* Venezuela : UCAB, 2004. pág. 43.
14. **Brautigan, I. M.** *Nutrición animal. Universidad estatal a distancia.* Costa Rica : San José, 2007. pág. 17.
15. **Primo, E.** *Química orgánica básica y aplicada: de la molécula a la industria.* España : Reverté, 2007. pág. 895. Vol. 2.
16. **Normas Mexicana.** NMX-F-317-S-1978. [En línea]
<http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-317-S-1978.PDF>.
17. **Carrillo, L.** *Los Hongos de los Alimentos y Forrajes.* Argentina : UNSA, 2003.
18. *Enzimas fibrolíticas producidas por fermentación en estado sólido para mejorar los ensilajes de caña de azúcar.* **Peláez-Acero, A., y otros.** s.l. : Agrocienza, 2011, Vol. 45, págs. 675-685.
19. *Efecto del pH y del líquido Ruinal Clarificado.* **Meraz-Romero, E., y otros.** México : Agrocienza, 2012, Vol. 46, págs. 347-358.
20. *Selección de hongos aislados de bagazo de caña con actividad celulasa sobre celulosa cristalina para posibles aplicaciones industriales.* **Ferrer-Marcelo, Y., y otros.** 1, s.l. : ICIDCA, 2011, Vol. 45, págs. 3-12.
21. **Pickering, W. F.** *Química analítica moderna.* España : Reverté, 1980. pág. 187.
22. **Dagnino, R. P., y otros.** Hidrólisis enzimática de cascarilla de arroz pretratada con ácido diluido para evaluar la eficacia de la etapa de pretratamiento. *UTN.* [En línea]
<http://frre.utn.edu.ar/IIJCyT/clean/files/get/item/2151>.
23. *Overview on native cellulose and microcrystalline cellulose I structure studied by X-ray diffraction (WAXD) comparison between measurement techniques.* **Terinte, N., Ibbett, R. y Schuster, K. C.** s.l. : Lenzinger Berichte, 2011, Vol. 89, págs. 118-131.
24. **Ghosh, P.** *Colloid And Interface Science.* India : PHI learnin, 2009. págs. 224-225.

CAPÍTULO III

DISCUSIÓN DE

RESULTADOS.

En éste capítulo se planteará la importancia de la determinación del análisis químico proximal y los resultados obtenidos. Así mismo se encuentran reportados los resultados de la medición del área superficial de la torta de extracción de semilla de higuera y la paja utilizada en la fase previa y del ensayo preliminar al cultivo del hongo, con concentraciones de 70%, 80% y 100% torta de extracción. También se muestran los resultados obtenidos en el DRX, la microscopía electrónica de barrido, la actividad enzimática de celulasas y xilanasas y por último la biodegradabilidad enzimática con pH 4.8 y 5.3.

3.1 Obtención de residuo.

El proceso de extracción de aceite elegido para este trabajo de investigación fue el de prensado térmico debido a que es común su uso en la industria por su bajo costo y la rapidez del proceso (1).

En la extracción realizada se obtuvo un 54% de torta y un 44% de aceite crudo, es decir, aceite con sólidos. En la figura 3.1 se observa el aceite obtenido mediante éste método y la torta de extracción. El aceite tienen una consistencia muy espesa al enfriarse y color café como se aprecia en el inciso a. En lo que respecta al inciso b, es visible la apariencia de la torta en forma de hojuelas delgadas de color oscuro.



Figura 3.1. a) Aceite crudo y b) Torta de prensado.

En la figura 3.2 se observa el balance de materia de la extracción de la semilla de higuera. Se puede apreciar que se obtiene 5.4 Kg de aceite crudo, al que posteriormente se le debieron eliminar los sólidos para su empleo y 4.4 kg de torta que equivale al 44%

de residuos en esta etapa. Dichos residuos son la materia prima de este trabajo de investigación y a los que se les busca dar un valor agregado.

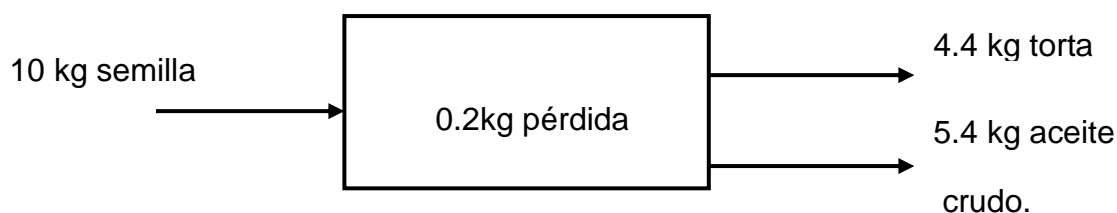


Figura 3.2 Balance de materia de semilla prensada.

Por otra parte, se realizó la determinación de aceite contenido en una muestra de la torta de extracción y se encontró que contenía el 6% en peso de aceite y 94% de residuo lignocelulósico. Lo cual coincide con lo reportado en bibliografía; en donde se reporta que en la torta llegan a quedar de 4 a 7% residual en la torta (2).

Posteriormente se realizó la disminución de aceite contenido en la torta mediante la técnica de maceración reportada en el apartado 2.1.3 del capítulo dos. El contenido de aceite restante posterior a la maceración se encuentra reportado en el apartado 3.2 correspondiente al análisis químico proximal.

3.2 Análisis Químico Proximal

La importancia del análisis químico proximal recae en que sus resultados sirven para determinar la composición química que sirve como referente del posible éxito en la proliferación del hongo en la torta, así como en la cuantificación de azúcares disponibles en el residuo. Su determinación consiste en calcular la humedad, cenizas, proteínas, grasas y la fibra cruda repitiendo los experimentos tres veces como mínimo.

Este análisis se ha empleado en diversas investigaciones para la caracterización de la biomasa; como es el caso Satyanarayan Naik, quien lo empleó para la caracterización en la producción de biocombustibles de origen renovable (3); por Ayan Demirbaş, que lo usó para caracterizar biomasa para su utilizarla en biocombustibles y

químicos (4) y en el análisis de paja de arroz para elaboración de bioetanol por Parameswaran (5), por mencionar algunas.

La tabla 3.1 expone los resultados obtenidos en el análisis químico proximal de la torta de extracción de la semilla de higuera base húmeda. Se puede observar que está compuesto mayormente por fibra cruda y en menor cantidad por lípidos.

Tabla 3.1. Análisis Químico proximal de la torta de extracción de la semilla de higuera.

COMPUESTO	g/100gTorta
Agua	6.78±1.08
Lípidos	4.36±0.47
Carbohidratos	16.1±
Fibra Cruda	51.15±1.31
Proteínas	16.92±3.43
Cenizas	5.28±0.35

La fibra cruda es “el residuo orgánico insoluble, remanente después de extraer un material libre de grasa con ácido y álcali diluidos, bajo condiciones controladas” (6). Cuantifica el contenido de lignina y celulosa existente en una muestra (7).

Existen dos puntos fundamentalmente que le brindan la importancia a la cuantificación de la fibra cruda en este trabajo.

El primero es que la celulosa y la lignina son indispensables para el crecimiento de los hongos pertenecientes al género *Pleurotus* debido a que estas sustancias son su fuente de energía (8).

La propagación del hongo es posible gracias a su eficaz batería enzimática, capaz de degradar grandes polímeros como la lignina y la celulosa (9). Esto da origen al segundo punto que consiste en la alta expectativa de que al haber alto contenido de lignina y celulosa exista la producción de enzimas extracelulares producidas por el hongo capaces de degradar el sustrato.

En la tabla 3.1 se observa que el contenido de fibra cruda corresponde al 51.15% de fibra cruda en la torta de higuera, lo cual es benéfico dada la explicación anterior. Al comparar este resultado con el reportado por Lacerda de 28.84% se encuentra que es 1.8 veces mayor, casi el doble (10), esto se puede atribuir a las diferencias que pueden existir entre variedades y en las condiciones de cultivo; tales como precipitaciones, suelo y temperatura, que influyen en el crecimiento y composición del reino vegetal (11), y/o al proceso de extracción empleado en la torta estudiada por Lacerda ya que la torta de extracción con la que trabajó fue donada por la industria y es probable que se hayan realizado prácticas comunes en la extracción de aceites como el re-uso de la torta, el precalentado de la semilla a temperaturas desconocidas, el triturado de la semilla o eliminación de la testa.

En lo que respecta al contenido de grasa, aunque bajo, llama la atención debido a que los hongos del género *Pleurotus* crecen en sustratos libres de grasa por lo que podría esperarse que su presencia fuera perjudicial; sin embargo, se ha reportado que el crecimiento del hongo no se ve interferido y que al contrario, la presencia de lípidos en el sustrato contribuye al crecimiento del micelio y estimula el crecimiento de carpóforos o cuerpos fructíferos (12). En consecuencia el aceite contenido en la torta no es impedimento para el cultivo y desarrollo del micelio del hongo.

Como se puede apreciar en la tabla 3.1, el resultado de este estudio fue de 4.36% de aceite. Este contenido concuerda con la caracterización reportada por Lacerda, que reporta un porcentaje de aceite de 3.05% (10).

En segunda posición se encuentran las proteínas, las cuales se encuentran compuestas mayormente por nitrógeno, el nitrógeno cuantificado en una muestra se multiplica por un factor reportado en bibliografía y que puede variar según la naturaleza de la muestra. Razón por la cual el método inicialmente cuantifica el nitrógeno, mismo que, aunque en pequeños porcentajes, es requerido para el crecimiento del hongo *Pleurotus spp* (13). Pardo reporta que se requiere un porcentaje de 0.6 a 1.5% sobre materia seca (14).

En la determinación de nitrógeno se encontró un porcentaje de 2.96%, mismo que resulta ligeramente superior al requerido, que al ser multiplicado por el factor de conversión correspondiente a semillas y oleaginosas reportado por la FAO (6) se obtuvo un porcentaje de proteína de 16.92%,

El contenido de proteínas es seguido del contenido de carbohidratos, que se llevó a cabo por diferencia empleando la fórmula 6 apartado 2.2.5 del capítulo dos (15) (16). El porcentaje de carbohidratos obtenido fue de 16.1%. Al comparar el contenido de proteínas y carbohidratos reportados por Annongu de 35.43% y 24.88 (17), se encontró que superan 2 y 1.5 veces a los obtenidos en esta investigación. Esto se atribuye al método de extracción, debido a que Annongu realizó la extracción por solvente y la semilla no presentó pérdida alguna de sólidos correspondientes sobre todo al endospermo formado por almidón y dextrinas y otras sustancias que en el método de prensado se van con el aceite crudo (aceite con sólidos). Dichas sustancias contribuyen al aumento en el contenido de proteínas y carbohidratos. A este hecho se le agrega la diferencia en variedades de semillas, ya que en el estudio realizado en este trabajo se hizo uso de semilla silvestre mientras que Annongu empleó una semilla comercial de alto rendimiento.

Respecto a la humedad, es un dato de vital importancia a pesar de ser bajo, esto debido a que el sustrato de cultivo de hongos debe mantener una humedad que oscila entre 70 y 85% para su desarrollo eficaz (18), en la tabla 3.1 se reporta que la humedad determinada fue de 6.78%, que triplica el contenido de agua con respecto a la analizada de Annongu de 2% (17), esto se atribuye a que su muestra fue triturada previo a la extracción, lo cual propició pérdida de humedad.

La determinación de humedad fue crucial debido a que permitió realizar los cálculos necesarios para concluir que a cada 100 gramos de muestra se debe agregar 67.79 mL de agua para conseguir una humedad de 80%.

En cuanto a la determinación de cenizas, proporciona información acerca de la calidad del alimento (en este caso residuo) a evaluar ya que indica el residuo inorgánico que queda después de que la materia orgánica se ha quemado. Este porcentaje ayuda a hacer una cuantificación acertada y a completar el balance total (19). La torta de extracción presentó el 5.28% de cenizas, que al ser comparado con el porcentaje obtenido por Annongu de 7.14% se puede observar que el contenido de cenizas es muy similar con una variación de 2% entre uno y otro, lo cual indica que su residuo inorgánico es prácticamente el mismo. Este resultado se empleó para calcular el porcentaje de carbohidratos contenidos en la muestra.

3.3 Caracterización fisicoquímica.

En otro orden, la caracterización fisicoquímica corresponde a la determinación de azúcares reductores directos, azúcares reductores totales, lignina, celulosa y pH. En la tabla 3.2 se exponen los resultados obtenidos en dicho estudio.

Tabla 3.2. Caracterización fisicoquímica de la torta de higuera.

CONTENIDO	%
Azúcares reductores directos.	4.61±0.12
Azúcares totales.	24.56±4.06
Lignina.	41.1±1.50
Celulosa	10.05
pH	5.8

Se puede observar en la tabla 3.2 que el porcentaje de azúcares reductores totales es 5.3 veces mayor que el porcentaje de azúcares reductores directos. Siendo esto de vital importancia debido a que hay una mayor cantidad de azúcares totales disponibles en la etapa de fermentación. Esto se debe a que la técnica de determinación de azúcares totales consiste en la degradación de todas las fuentes potenciales de azúcares como la celulosa, hemicelulosa y el almidón dando como resultado los azúcares que son cuantificados finalmente (20) (21) de la torta de extracción del aceite de ricino.

Por otro lado, la lignina es una de las sustancias más abundantes en el reino vegetal, como ya se había mencionado en el capítulo uno su función es dar estructura y soporte a la planta (22). En la planta las paredes celulares de la lignina forman una matriz que rodea la celulosa y la hemicelulosa, sin embargo, debido a su hidrofobicidad y a la estructura tan compleja y aleatoria que carece de enlaces hidrolizables regulares, ya que se varía su concentración e incluso ubicación entre cada especie y variedad vegetal que hace imposible una estandarización de su estructura y comportamiento (23). Razón por la cual la degradación de la lignina es un requisito previo a la hidrólisis de celulosa y hemicelulosa.

Es por esto que la determinación de la lignina es crucial en esta investigación. Se determinó que el contenido de lignina en la torta corresponde al 41.1%. Recordando que

la existencia de lignina en el sustrato es un factor primordial para el crecimiento de los hongos del género *pleurotus* si se compara el porcentaje de lignina encontrado con el de las coníferas, que es una especie en las que suele crecer este hongo, con un porcentaje de lignina de 3 a 27% se encuentra que el contenido en la torta de extracción es superior (24). Por lo que la torta de extracción de semilla de higuera es un sustrato potencial para el cultivo del hongo *Pleurotus djamor*.

En cuanto al contenido de celulosa se calculó por diferencia empleando la fórmula 9 del apartado 2.3.3 capítulo dos. El resultado obtenido fue de 10.05%, que al ser comparado con el de las coníferas de 58 a 60% (25) y con el de la caña de azúcar de 51.67 (26) resulta ser menos de la quinta parte, sin embargo a diferencia de las coníferas y el bagazo de caña que pueden ser empleados como madera y alimento animal respectivamente la torta de extracción es un residuo muy económico. La existencia de celulosa indica la posibilidad de degradación enzimática en donde los enlaces de la molécula de celulosa son destruidos por acción de las enzimas hasta obtener como producto final moléculas de celulosa (25).

En lo que respecta a la determinación de pH en la torta, su determinación es de vital importancia debido a que para el crecimiento del micelio se requiere un pH neutro o ligeramente ácido (5.5 a 6.5) (27), la medición del pH en la torta de prensado se midió en 5.8, es evidente que entra en el intervalo requerido para el desarrollo del hongo *Pleurotus djamor*.

3.4 DRX.

Este análisis se realizó con el fin de identificar si la muestra poseía naturaleza cristalina o amorfa, debido a que las fases cristalinas de celulosa y hemicelulosa son las que buscan degradarse mediante la acción de las enzimas extracelulares producidas por el hongo. Además, de llevar a cabo la identificación de las fases cristalinas presentes en esta.

En la figura 3.3 se observan las partes de la semilla de higuera con el fin de conocer los términos a los que se hacen mención en esta sección. Se distingue que la parte que recubre a la semilla de color oscuro se le denomina testa y la parte de adentro de color blanco es el endospermo.

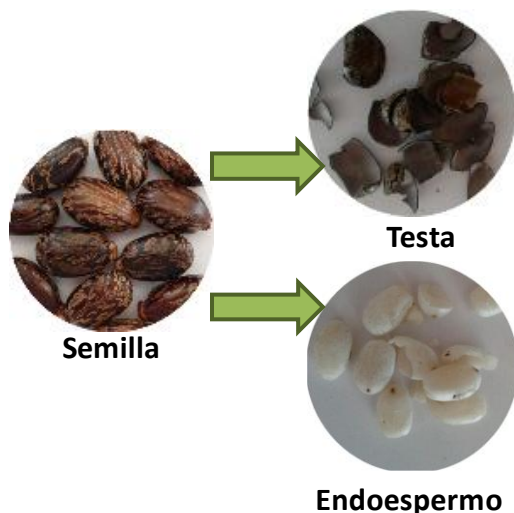


Figura 3.3 Partes de la semilla.

Se hizo la separación de las partes de la semilla y se analizaron testa y endospermo por separado mediante la técnica de DRX (28), con el fin de constatar su contribución a la torta de extracción. El xilano fue incluido debido a que es el principal componente de la hemicelulosa (29). Por otro lado, la lignina no fue analizada debido a que es un compuesto polifenólico que no presenta forma cristalina (30).

La figura 3.4. presenta los análisis de rayos X correspondientes al xilano, endospermo, testa y la torta de prensado de la semilla de higuera. La muestra xilano exhibió una señal ancha centrada a $19,5^\circ 2\theta$ de que concuerda con los informes anteriores (31). Por otro lado, el endospermo presenta sólo la señal característica de xilano lo cual indica que está compuesta principalmente de hemicelulosa cristalina. Por el contrario, la testa está formada por compuestos inorgánicos y orgánicos ya que exhibió las reflexiones características de los carbonatos de magnesio y calcio, $Mg_{0.129}Ca_{0.871}CO_3$ (PDF # 86 a 2336), $Mg_{0.03}Ca_{0.97}CO_3$ (PDF # 89-1304) y carbonato de calcio en su forma de calcita (PDF # 88-1807). Vale la pena mencionar que la presencia de estos compuestos de magnesio y calcio que contienen ha sido también identificado en otros residuos de extracción de aceite tal como el del aceite de olivo (32).

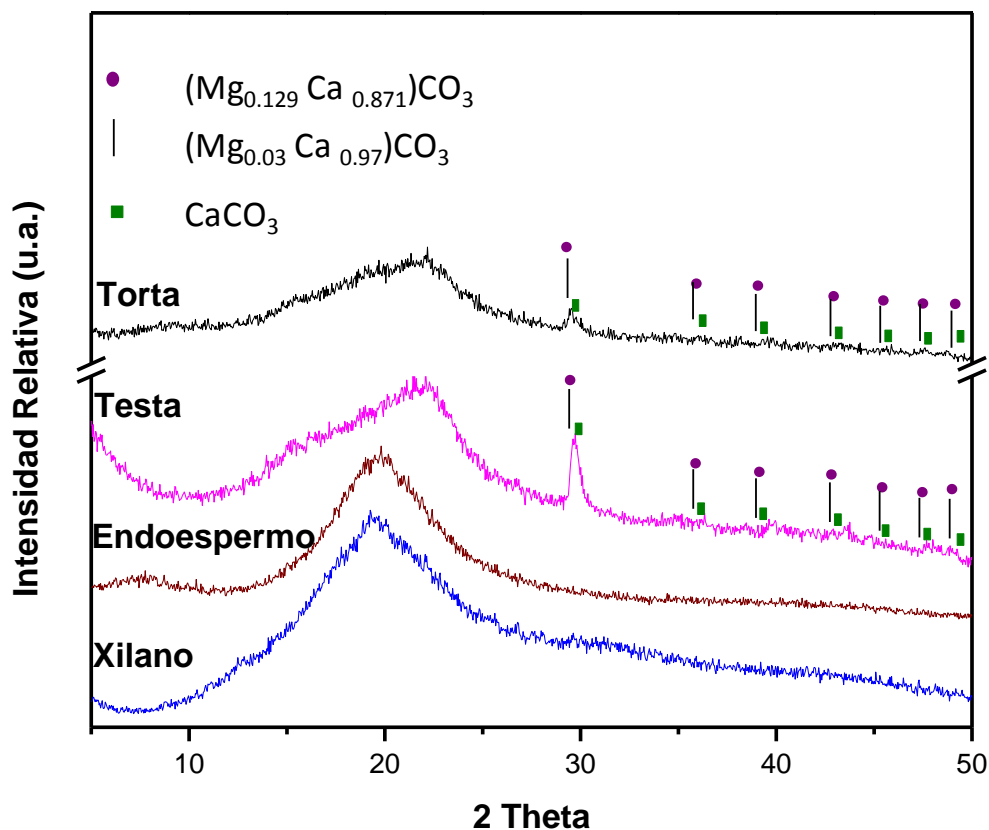


Figura 3.4 DRX de torta, testa, endoespermo y xilano.

En el mismo contexto, la muestra de la torta de extracción también presenta las reflexiones características de celulosa y un "hombro" continuo entre 16 y 22 grados theta. Es notable que la torta de ricino exhibió un patrón de polvo de rayos X muy similares en comparación con la testa, excepto por el atribuido a la señal de xilano el cual aparece más intenso en la torta de ricino.

Para evidenciar que la señal apreciada entre 16 y 22 grados de 2-theta pertenece efectivamente al xilano se realizó una deconvolución de las señales correspondientes a la celulosa (JCPDS #03-0289). La Figura 3.5 exhibe la posición de 2-theta y los índices de Miller de las reflexiones características de la celulosa nativa.

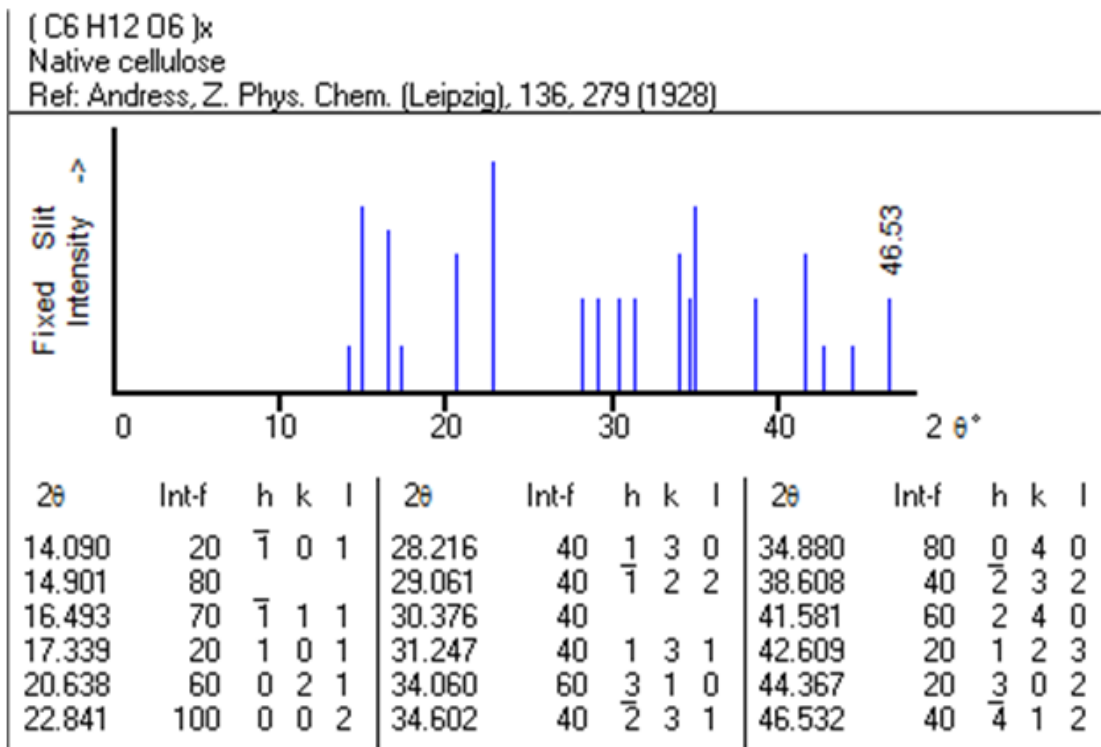


Figura 3.5 Ficha JCPDS de la celulosa nativa.

Para llevar a cabo la deconvolución de las señales se empleó el método de deconvolución de los picos (33).

El método de ajuste se basa en la convolución de las señales de las reflexiones centradas en 15, 16.5 y 22.8 grados de 2-theta, respectivamente. Además, se considera una señal correspondiente a la reflexión de la sección amorfa (~21 de 2θ). Las formas de las reflexiones se ajustaron con perfiles tipo Pearson VII ajustando libremente la intensidad, posición y anchura. La Figura 3.6 presenta el patrón de difracción de la celulosa donde se ilustra el método de deconvolución de los picos.

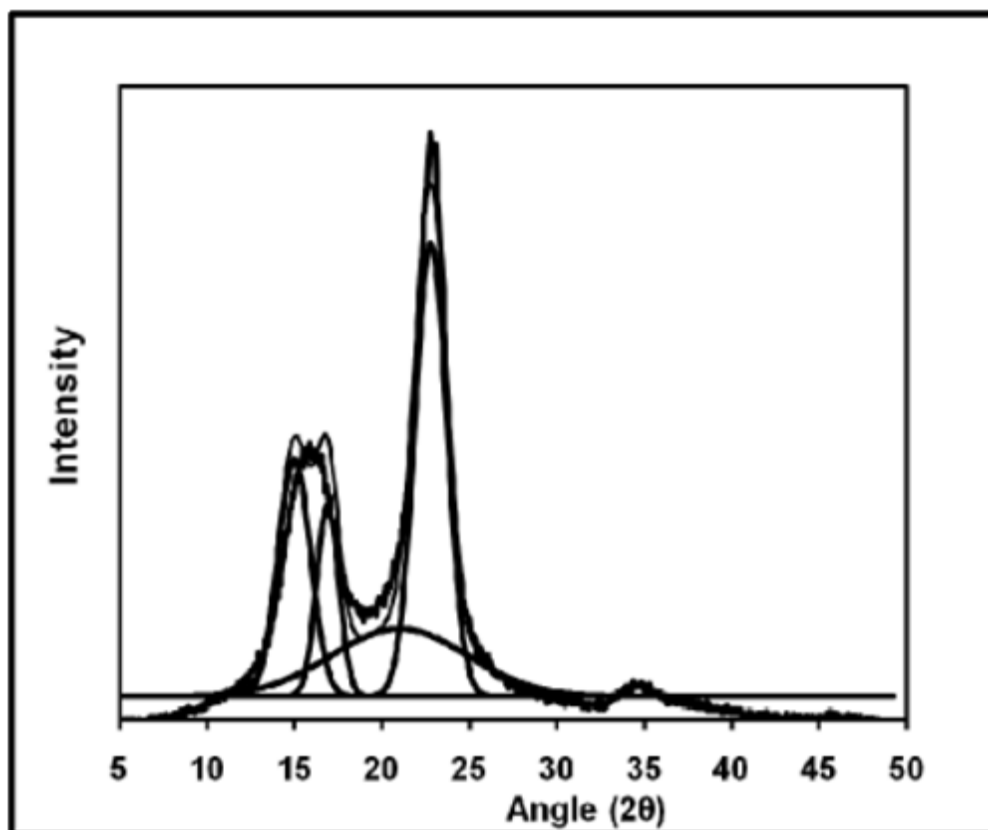


Figura 3.6 Ilustración del método de deconvolución de los picos.

La figura 3.7 muestra las señales obtenidas al realizar una deconvolución de las señales localizadas entre 11 y 29° de 2-theta. En el inserto de la Figura 3.7 se identifican los datos experimentales como triángulos negros, el ajuste como una línea continua azul, las líneas verdes como aquellas correspondientes a la celulosa, la línea roja como la señal asignada a la sección amorfa y, finalmente, la azul oscuro atribuida al xilano. Como puede apreciarse, la deconvolución concuerda perfectamente al ajuste realizado por lo que, de acuerdo a la Figura 3.7 puede indicarse que la torta de extracción contiene mayor cantidad de xilano que la testa.

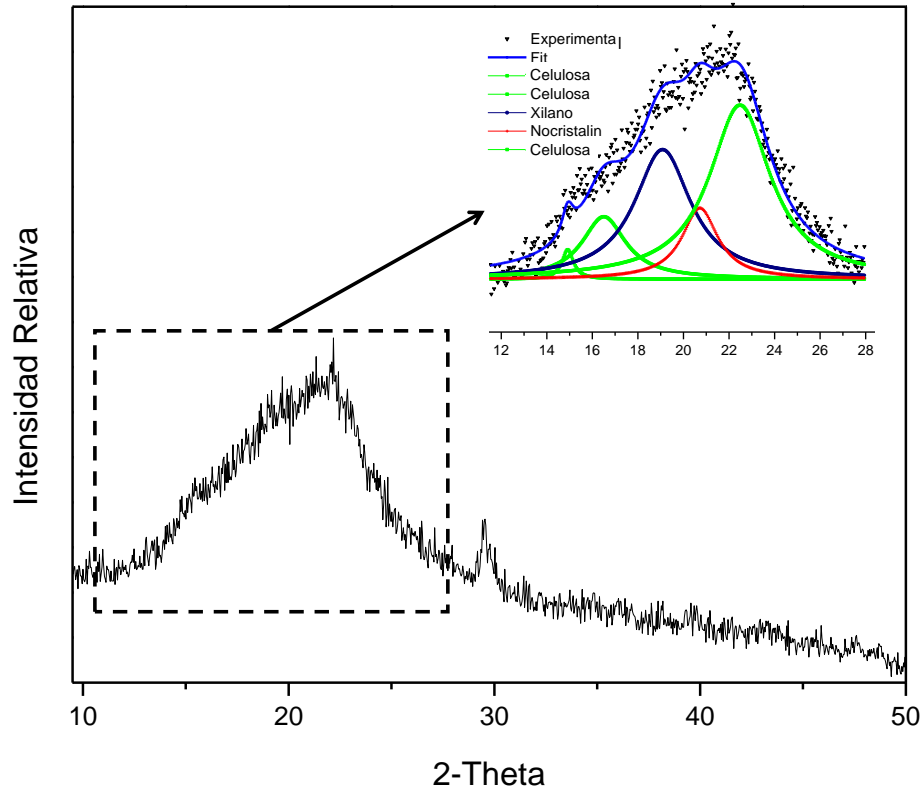


Figura 3.7 Deconvolución de torta de ricino.

Según los expertos, el aceite de ricino está contenido en el endospermo y no en la testa. Durante la extracción de aceite mecánica, la semilla pasa a través del sistema de prensado expeller, el aceite se extraído al romper las paredes celulares. Entonces, el aceite crudo, que contiene también restos de la testa y el endospermo se recoge en una cubeta debajo de la máquina, mientras que la torta de aceite sale del extremo del eje expulsor (34). Como la torta de extracción de aceite de ricino está compuesta por la testa y restos de endospermo (que según el análisis DRX, sólo exhibió las reflexiones características de xilano) es comprensible que la contribución de xilano al patrón difracción de rayos X haya generado un incremento en la intensidad de la sección atribuida a este compuesto.

Los valores del índice de celulosa cristalina indicaron una disminución en la torta de ricino (0.799) en comparación con la testa (0.862), lo cual se atribuyó a una pérdida de cristalinidad debido al proceso de extracción mecánica. Esto también fue corroborado por los valores del tamaño promedio de los cristales de celulosa obtenidos del plano (002) (23 y 21 Å para testa y torta, respectivamente).

3.4 Microscopía y EDS.

Las imágenes de SEM de la torta se exhiben en la figura 3.8. Los resultados revelaron que la muestra presenta dos microestructuras diferentes: la primera de ellas, que representan la mayoría de la muestra, se exhibe la figura 3.8 inciso a y fue identificado como la contribución de la testa a la torta de ricino que concuerda con resultados anteriores (35). Se ha reportado que la testa se compone de tres capas: tegumento, células de Malpighi y la epidermis. En este sentido sólo el tegumento se identificó claramente ya que las otras secciones fueron destruidas durante la extracción de aceite. La segunda microestructura presenta una forma esférica (ver figura 3.8 inciso b) que correspondía a los órganos de lípidos y proteínas (35). Como estos órganos de lípidos y proteínas se han identificado como parte del endospermo es reconocible que durante la extracción de aceite del endospermo se mantuvo en la torta de extracción de aceite.

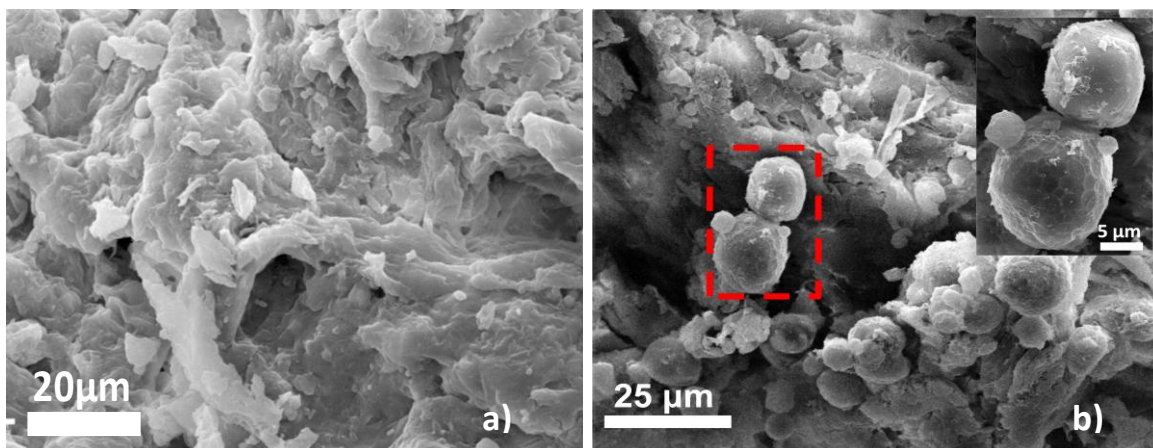


Figura 3.8 Microestructuras de la torta de ricino.

En este contexto, las imágenes SEM están en buen acuerdo con los resultados de DRX. El análisis EDS reveló que la torta de ricino contenía mayormente C, O, K, P, Mg y S como lo muestra la tabla 3.3, lo que se debe a que las plantas están compuestas mayormente por carbono, oxígeno e hidrógeno y en menor proporción por elementos conocidos como macronutrientes que entran en la planta en forma de iones disueltos en el

agua que la planta absorbe por la raíz como el nitrógeno, el potasio, magnesio, fósforo, calcio y azufre (36).

Tabla 3.3 % en peso de elementos en la torta de extracción.

Elemento	% peso
Carbono	42.64±14.81
Oxígeno	41.69±8.77
Potasio	1.51±2.13
Fósforo	3.34±5.61
Magnesio	1.94±2.94
Azufre	0.40±0.59

3.3 Inoculación de *Pleurotus djamor* en la torta de extracción.

Debido a que en otros estudios con piña se ha empleado la paja para aumentar el área de contacto (37) se propuso inicialmente combinar el residuo lignocelulósico obtenido de la extracción de aceite de semilla de higuera con paja debido a que al no haber estudios anteriores del empleo de la torta de extracción como sustrato del hongo *Pleurotus* se desconocía si sería apto para el crecimiento del micelio, caso contrario de la paja, la cual ha mostrado ser un excelente sustrato para el cultivo de *Pleurotus* (38).

Con el fin de comparar el área de contacto de la torta de higuera y compararla contra la de la paja se realizó la determinación del área superficial específica. Se encontró que la paja tiene un área específica de 3.41m²/g mientras que la torta de 3.19m²/g, por lo que se encontró que el área específica no llegó a variar ni un 10%.

Razón por la cual, con el fin de aprovechar al máximo la torta de prensado y no aumentar el costo de producción se decidió determinar si el crecimiento del micelio era posible en la torta sin necesidad de ser mezclada. Por tal motivo se prepararon las muestras descritas en el apartado 2.5, capítulo dos; etiquetadas como 100T, 90T, 80T y 70T, que se presentan etiquetadas en la figura 3.9.

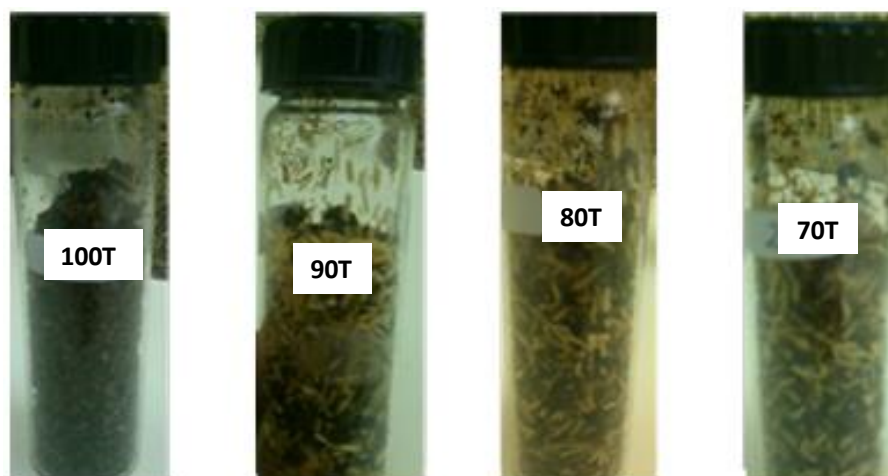


Figura 3.9. Cultivo de *Pleurotus djamor* día 1.

La figura 3.10 corresponde a los 5 días, en donde se puede apreciar en todas las muestras un crecimiento radial característico de los hongos. En la muestra 70T se presentó un crecimiento radial amplio, en donde las hifas se han desplazado con mayor longitud, dando como resultado una invasión más agresiva en comparación con el resto de las muestras. La muestra 80T por su parte mostró una invasión agresiva, sólo un poco menor a la de la muestra 70T. La muestra 90T y 100T presentan un crecimiento ligeramente más lento que la muestra 80T.

Lo interesante de estos resultados es que la muestra 100T presentó un desarrollo favorable, ya que como se observa en la imagen 3.10 el crecimiento en la muestra 100T es menor a la 70T aproximadamente por un 30%.

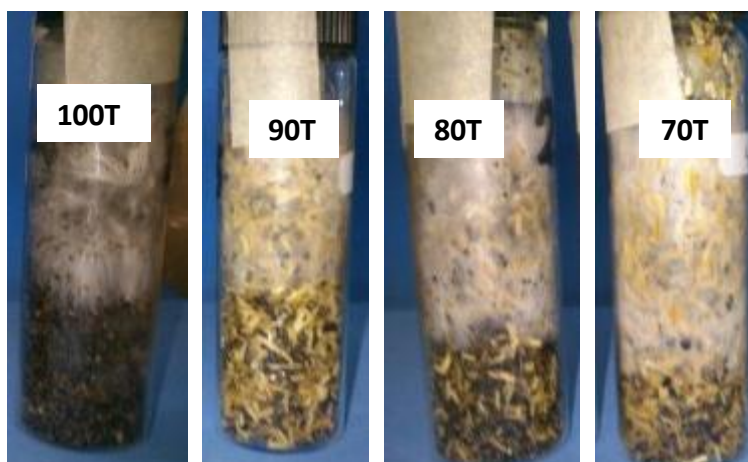


Figura 3.10 Crecimiento del hongo *Pleurotus djamor* 5 días.

En este mismo sentido, los resultados obtenidos en el día 8 se presentan en la figura 3.11. Se observa que todas las muestras han sido invadidas, sin embargo la 70T siguió mostrando mayor avance, pues se aprecia que las hifas han invadido por completo el sustrato al grado de no permitir ver el sustrato. Por otro lado las muestras 80T y 90T mostraron una invasión menos agresiva pues el sustrato aún es visible. Por su parte la muestra 100T presentó una invasión ligeramente menor, ya que a pesar de que no es visible el sustrato, se observa claramente que el crecimiento no se desplazó hasta los extremos superior e inferior a diferencia de las muestras 90T, 80T y 70T.

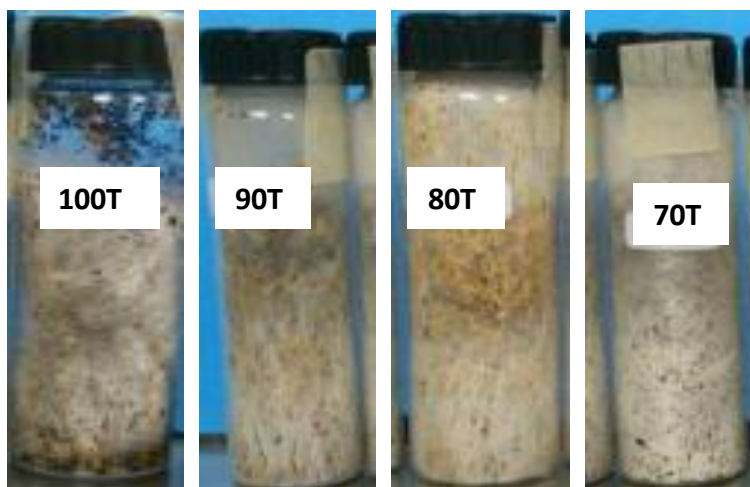


Figura 3.11 Crecimiento del hongo *Pleurotus djamor*, 8 días.

Este resultado aunado a las diferencias mínimas en las áreas de los sustratos llevó a la decisión de utilizar la torta de extracción pura, es decir la muestra 100T con dos tamaños de partícula; etiquetada como A el intervalo 0.420 – 0.841 mm y como B el intervalo de 0.841 – 2mm.

3.6 Determinación de la actividad enzimática.

La determinación de la actividad enzimática exhibe el potencial de degradación de determinada sustancia en un periodo de incubación (39). En donde la enzima cumple una función de degradación específica. En este caso se determinaron celulasas y xilanasas que son capaces de degradar celulosa y xilano respectivamente. Para la determinación de la misma es necesario realizar una curva de calibración de celulosa y xilano a fin de

conocer la absorbancia de dicha sustancia a diferentes concentraciones y cuyos resultados se localizan en el anexo.

3.6.1 Actividad enzimática de xilanasas.

La determinación de actividad de xilanasas es posible gracias a que se emplea una solución de xilano a la que se le agrega el extracto enzimático, el reactivo DNS y se incuba propiciando que las enzimas xilanasas degraden el xilano específicamente. Es por esta razón que fue necesario realizar la curva de calibración de xilano para su cuantificación posterior.

En la Tabla 3.4 se muestran las actividades enzimáticas de xilanasas en el sustrato con tamaño de partícula en el intervalo 0.420 – 0.841 mm y 0.841 – 2 mm. La primera determinación se realizó en el día 8 debido a que en este día el hongo cubrió en su totalidad al sustrato; actividad enzimática de xilanasas en el día ocho se cuantificó en 64.1 UI/gss, posteriormente se observa una ligera baja en el día 11, para posteriormente alcanzar su mayor actividad el día 14 con 65.98 UI/gss y volver a descender el día 17. La máxima actividad se refiere a un estado de alta concentración de xilano, es decir, que a mayor contenido de xilano la actividad enzimática de xilanasas es mayor, ya que la concentración es uno de los factores que contribuyen a la actividad enzimática tal como se menciona en la tabla 1.4 apartado 1.7. Mientras que el descenso dramático se atribuye a una disminución en la concentración de xilano (40), esto es que debido a que se agota el xilano las xilanasas disminuyen su actividad.

Tabla 3.4 Actividad enzimática de xilanasas UI/g ss.

Día	0.420 – 0.841 mm	0.841 – 2.00 mm
	Xilano UI/gss	Xilano UI/gss
8	64.1±0.06	54.14±0.03
11	62.18±0.09	60.55±0.08
14	65.98±0.02	60.12±0.04
17	64.48±0.06	62.43±0.02
20	62.29±0.03	45.92±0.02
23	52.01±0.08	16.25±0.09

En la figura 3.12 se muestra la comparación de la actividad enzimática de 0.420 – 0.841mm contra la de 0.841 – 2.00mm, como se puede observar la actividad enzimática de xilanasas en términos generales fue mayor en la muestra con menor tamaño de partícula (0.420 – 0.841mm) que en la muestra de tamaño de partícula 0.841 – 2.00mm. Esto se atribuye directamente al tamaño de partícula de la muestra debido a que reporta la bibliografía que influye directamente en la cantidad de extracto de hemicelulosa. De manera que a menor tamaño de partícula mayor disponibilidad de hemicelulosa (41) misma que está compuesta por xilano razón por la cual hay mayor concentración de xilano y por lo tanto mayor actividad enzimática de xilanasas.

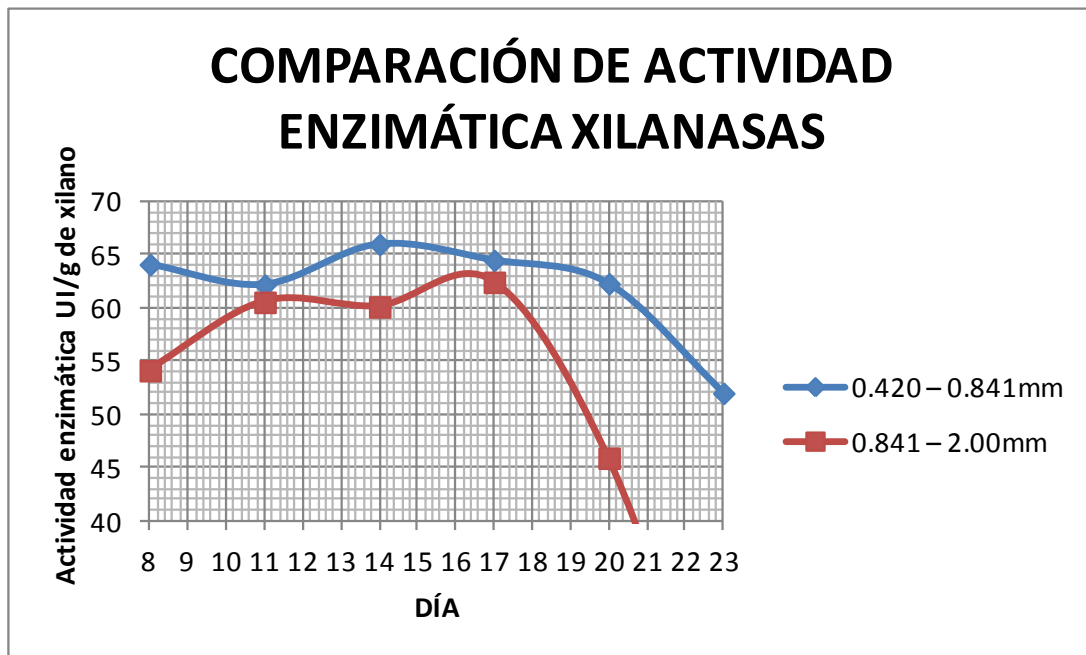


Figura 3.12 Gráfica comparativa de actividades enzimáticas de xiladasas por tamaño de partícula.

Cabe mencionar que la producción de enzimas xilanasas no presenta un comportamiento uniforme entre sustratos diferentes. Tal es el caso de estudios realizados a tiempos similares a los trabajados en esta investigación con diferentes sustratos; como la realizada por Luna que empleó *P. Ostreatus* en rastrojo de cebada y reportó una actividad máxima a los 12 días de 80.5 U/gss con un tamaño de partícula de 2cm (42), en residuos agroindustriales de plátano reporta Reddy 0.14U/mg ss a los 20 días con un tamaño de partícula de 0.5 cm (43).

3.6.2 Actividad enzimática de celulasas.

Por otra parte al realizar la determinación de celulasas se empleó el reactivo CMC, el extracto enzimático, el reactivo DNS y se incubó a fin de que las celulasas degradaran el CMC y así poder cuantificar la actividad enzimática de las celulasas haciendo uso de la curva de calibración de dicho reactivo.

En la tabla 3.5 se aprecia la actividad enzimática determinada cada tres días a partir del día 8 en tamaños de partícula correspondientes a los intervalos de 0.429-0.841 mm y 0.841-2.00 mm. Se puede advertir que ambos tamaños de partícula muestran actividades enzimáticas aproximadamente 25% menores en el día 8. Esto se atribuye a que al inicio de la propagación del hongo en el sustrato la concentración de lignina y hemicelulosa que protege a las microfibrillas de celulosa no han sido degradadas (ver figura 1.6 apartado 1.1), por lo que la muestra se comporta como si tuviera baja concentración de celulosa, es decir, con actividad enzimática baja. Por su parte en el día 11 se encuentra el punto máximo de ambos tamaños de partícula, para posteriormente ir descendiendo los días 14, 17 y 20 sin llegar a tener un aumento considerable. La mayor actividad corresponde a elevadas concentraciones de celulosa, debido a que provoca una activación proporcional, es decir, a mayor concentración de celulosa mayor actividad enzimática de celulasas, mientras que bajas concentraciones corresponden a menor actividad enzimática (40).

Tabla 3.5 Actividad enzimática de celulasas UI/gss.

Día	0.420 – 0.841 mm	0.841 – 2.00 mm
	CMC UI/gss	CMC UI/gss
8	84.1±0.06	91.00±0.04
11	125.39±0.05	140.25±0.06
14	110.80±0.03	114.92±0.07
17	113.66±0.13	108.42±0.05
20	85.53±0.06	77.52±0.03
23	89.42±0.03	80.22±0.02

En la figura 3.13 se aprecia claramente que la mayor actividad enzimática de celulasas se da en el sustrato con mayor tamaño de partícula. Esto se atribuye a que a mayor tamaño de partícula el extracto de hemicelulosa disminuye según Krogueell (41), lo cual permite el acceso a la celulosa y una mayor actividad enzimática de celulasas debido a que concentración es uno de los factores que aumenta o disminuye la actividad enzimática proporcionalmente (40).

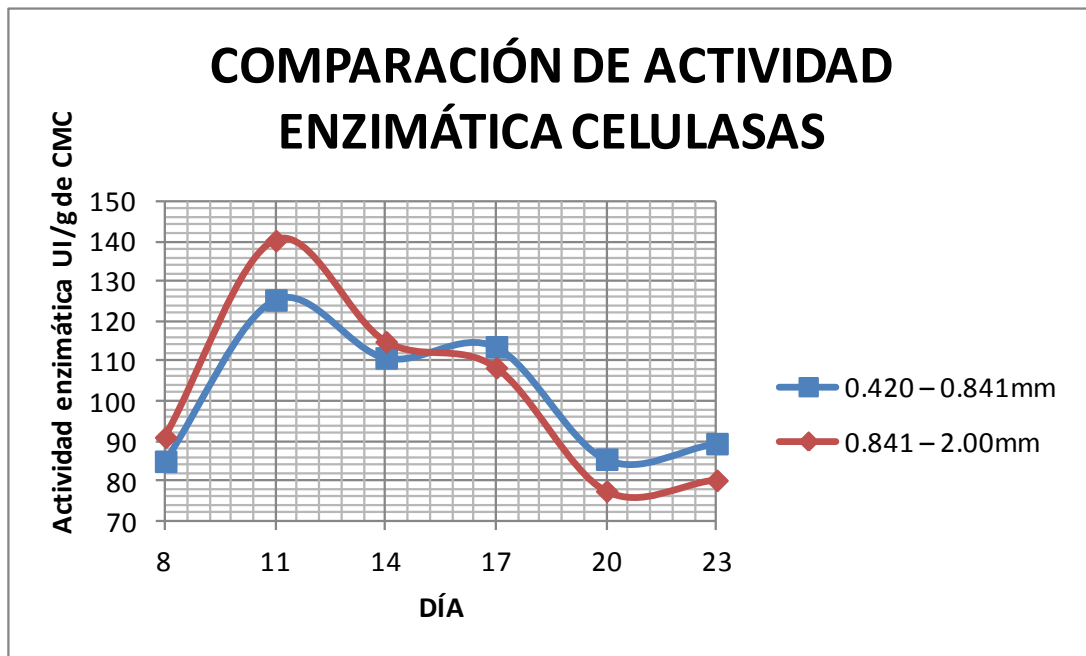


Figura 3.13 Gráfica comparativa de actividad enzimática de celulasas por tamaño de partícula.

Al igual que con las xilanasas los reportes de mayor actividad enzimática de celulasas se reportan a diferentes días en diferentes tipos de sustratos como los reportados por Ávila de 0.073 UI/g ss en rastrojo de maíz a los 12 días (44) y Amare de 12.5 UI/g ss en salvado de trigo (45). Por lo que se hace evidente que la actividad enzimática varía considerablemente entre cada sustrato y no se encuentran similitudes con otros trabajos.

3.7 Determinación de lignina y celulosa posterior a la biodegradabilidad enzimática.

Una vez encontrados los días de mayor actividad enzimática de xilanasas con pH 5.3 y un tamaño de partícula en el intervalo de 0.420 – 0.841 mm y de celulasas con pH 4.8 y un tamaño de partícula en el intervalo de 0.841 – 2 mm; se procedió a extraer las enzimas extracelulares producidas por el hongo *Pleurotus djamor* y diluirlas en soluciones buffer de citratos con pH 5.3 y 4.8 en una proporción 1:1 a fin de cuantificar la degradación de lignina y cuantificar la celulosa en la torta de extracción de semilla de higuera tratada con dichos extractos.

Los resultados obtenidos de la determinación de lignina tienen una gran importancia debido a que es la sustancia que se pretende degradar en el pretratamiento. La tabla 3.6 muestra el porcentaje de lignina contenido en la torta de extracción biodegradada con las enzimas extracelulares del *Pleurotus djamor* resultante de la biodegradabilidad enzimática empleando las enzimas producidas por el hongo *Pleurotus djamor* con buffer de citratos con pH de 4.8 y 5.3.

Se puede observar que en ambos casos hay una disminución de lignina con relación directa al tiempo de tratamiento. Al comparar los resultados con la caracterización inicial de 41.1% que contenía la torta de extracción se encuentra que disminuyó en un 42.2% el contenido de lignina en la muestra con tamaño de partícula de 0.841 – 2 mm y pH 4.8; mientras que en la muestra con tamaño de partícula 0.420 – 0.841 y pH 5.3 disminuyó 46.33%, lo cual concuerda con los resultados reportados por Salvachúa en el empleo de *Pleurotus alveolaris* en paja húmeda, la cual disminuyó 43% del contenido inicial y *Pleurotus radiata*, que disminuyó en 40% (46)

Tabla 3.6 Porcentaje de lignina en torta de extracción de semilla de higuera posterior a aplicación de enzimas.

Día	pH 4.8	pH 5.3
	% lignina	% lignina
5	37.86 ±1.36	38.92 ±7.72
10	34.71 ±1.22	27.39 ±2.35
15	23.76 ±2.37	22.06 ±2.89

En la figura 3.14 se presenta una gráfica comparativa de la degradación de lignina empleando sustrato con tamaño de partícula 0.420 – 0.841 mm y pH 5.3 contra tamaño de partícula 0.841 – 2 mm y pH 4.8. Se aprecia que el pH 5.3 presenta una degradación de lignina más veloz que el de pH 4.8, esto se atribuye a dos factores. El primero es que al tratarse de un menor tamaño de partícula al igual que la hemicelulosa la lignina se encuentra más accesible y por lo tanto más degradable y en segundo lugar a que las hemicelulosas que también dan soporte a la estructura vegetal son degradadas por las enzimas xilanasas, a las que favorece su estabilidad el pH 5.3. Aunque cabe mencionar que se recomienda un análisis con tiempos más prolongados para observar el comportamiento durante un periodo de tiempo más extenso.

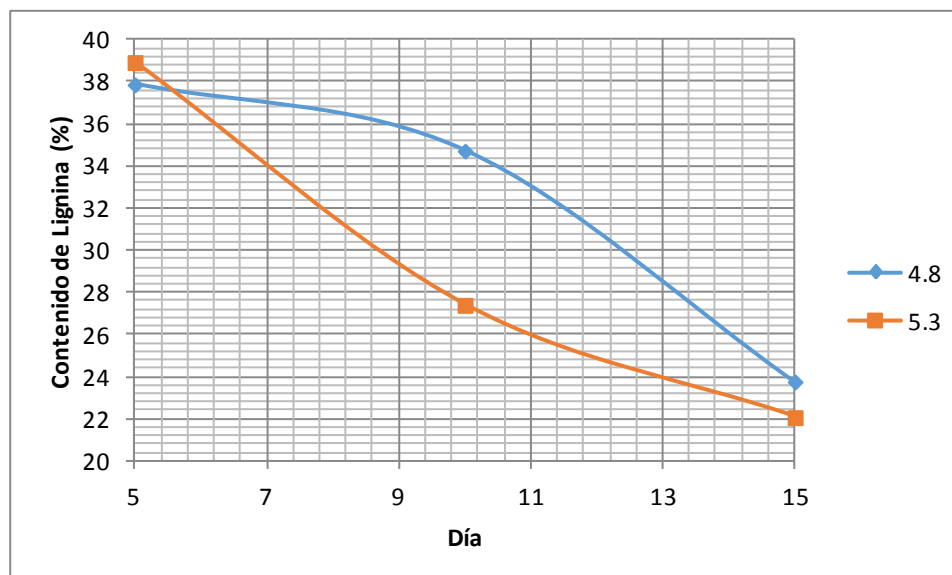


Figura 3.14 Comparación de pérdida de lignina.

Por otro lado, la tabla 3.7 presenta el porcentaje de celulosa contenido en el sustrato con tamaño de partícula 0.420 – 0.841 mm y 0.841 – 2 mm posterior al tratamiento enzimático con pH de 5,3 y 4.8 respectivamente. Estos resultados son interesantes debido a que son fluctuantes e incluso se llega a tener mayor porcentaje al cuantificado inicialmente considerando que fue de 10.05%. Esto se debe a que la lignina y la celulosa forman parte de un porcentaje total (47). De tal forma que el hecho de ser degradadas lignina y celulosa al mismo tiempo hace posible que se llegue a tener

porcentajes de celulosa fluctuantes e incluso mayores a los cuantificados inicialmente debido a que la degradación de lignina se traduce en mayor disponibilidad de celulosa., Esto significa que al disminuir el porcentaje de lignina tan eficientemente el contenido de celulosa aumenta.

Tabla 3.7 Determinación de celulosa posterior a la biodegradabilidad enzimática

Día	pH 4.8	pH 5.3
	% celulosa	% celulosa
5	9.86±1.15	8.94±0.75
10	12.91±1.21	8.95±1.71
15	11.49±0.75	11.18±1.38

La figura 3.15 exhibe una gráfica comparativa de la variación en el porcentaje de celulosa en los sustratos con tamaño de partícula 0.420 – 0.841 mm y 0.841 – 2mm al ser biodegradadas por acción del extracto enzimático a pH 5.3 y 4.8 respectivamente. Se puede observar que hay un aumento de celulosa del 43% de celulosa en el sustrato con tamaño de partícula de 0.841 – 2 mm en el día 10 que se atribuye a que con el pH 4.8 se demora la eliminación de lignina y xilano por lo que se degrada menor porcentaje de celulosa al día 10.

Al mismo tiempo se observa un porcentaje de celulosa más constante con el pH de 5.3, a pesar de que se esperaba que al favorecer la degradación de xilano y de lignina el porcentaje de celulosa aumentara. Esto significa que el pH 5.3 no sólo favorece la degradación de xilano si no también la de celulosa por acción de aumento de concentración de celulosa, recordando que el aumento de concentración contribuye a la actividad enzimática y por ende a la degradación del sustrato.

En lo que respecta al día 15 se presenta una concentración de celulosa similar en ambos tamaños de partícula y pH, además de un porcentaje mayor al cuantificado inicialmente. Este comportamiento lo presentan otros hongos, agresivos con la lignina y en menor medida con la celulosa, característica general de los *Pleurotus*; tales como el *P. radiata* y *P. tigrinus* (46).

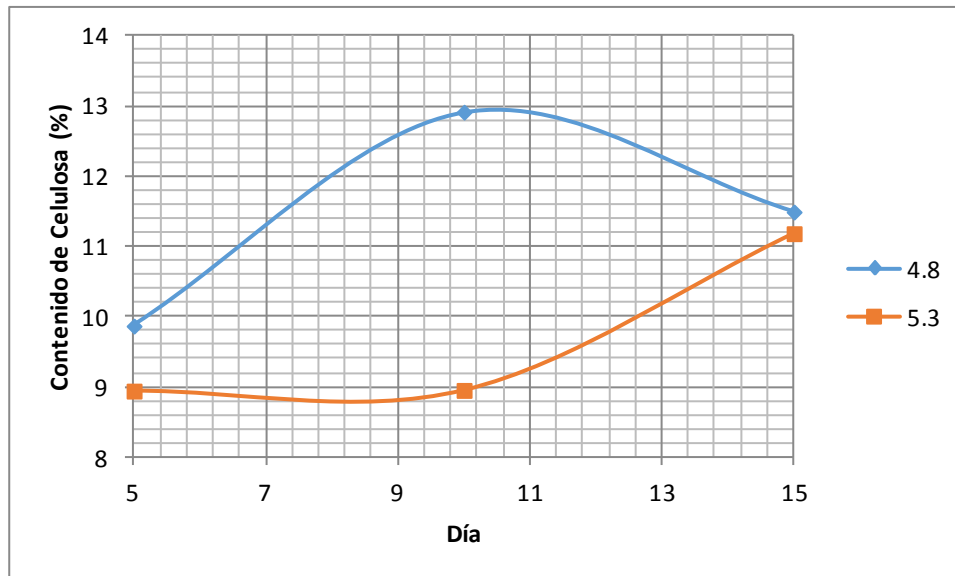


Figura 3.15 Comparación en el porcentaje de celulosa posterior a la biodegradabilidad enzimática.

Bibliografía.

1. *Industrialización de la higuera o planta de ricino parte II: extracción de aceite.* **Valderrama, J. O., Mery, A. y Aravena, F.** 3, s.l. : Información tecnológica, 1994, Vol. 5, págs. 91-95.
2. **Bailey, A. E.** *Aceites y grasas industriales.* España : Reverté, 1984. págs. 438 – 442.
3. *Characterization of Canadian biomass for alternative renewable biofuel.* **Naik, S., y otros.** s.l. : Renewable Energy, Vol. 35, págs. 1624–1631.
4. *Biomass resource facilities and biomass conversion processing for fuel and chemicals.* **Demirbaş, A.** s.l. : Energy conversion and Management, 2001, Vol. 42, págs. 1357-1378.
5. *Bioethanol production from rice straw: An overview.* **Binodi, P., y otros.** s.l. : Bioresource Technology, 2010, Vol. 101, págs. 4767–4774.
6. **FAO.** Nutrición y alimentación de peces y camarones cultivados. Manual de capacitación. [En línea] Nutrición y alimentación de peces y camarones cultivados. Manual de capacitación.
7. **Matissek, R., Schnepel, F. y Steiner, G.** *Análisis de los alimentos.* España : Acribia, 1998.
8. **González, R., y otros.** *Cultivo de Agaricus bisporus usando un sistema a pequeña escala para el compostado de mezclas a base de cáscara de semilla de girasol. Hacia un desarrollo sostenible del sistema de producción-Consumo de los hongos comestibles y medicinales en Latinoamérica.* México : COLPOS, 2010. pág. 115.
9. **Herrera, T. y Ulloa, M.** *El reino de los hongos.* México : UNAM y Fondo de cultura económica, 1990.
10. **Lacerda, R. S., Bittante, A. y Chambi, H.** Castor bean cake as raw material for biodegradable material. [En línea] www.icef11.org/content/papers/fms/FMS174.pdf.
11. **Mares, V.** *Bases fisiológicas para el manejo de praderas tropicales. Aspectos en la utilización y producción de forrajes en el trópico.* Costa Rica : CATIE, 1983. págs. 8, 9.

12. *Evaluación del crecimiento y producción de Pleurotus ostreatus sobre diferentes residuos agroindustriales del departamento de Cundinamarca.* **López-Rodríguez, C., y otros.** 2, s.l. : Revista Javeriana, 2008, Vol. 13.
13. *Evaluación in vitro del hongo comestible Pleurotus eryngii: Efecto de diferentes suplementos orgánicos en el crecimiento micelial y producción de cuerpos fructíferos.* **Gaitán-Hernández, R.** 21, s.l. : Revista Mexicana de Micología, 2005, págs. 77-84.
14. **Pardo, J., Perona, M. A. y Pardo, A.** CIES BOLETIN. [En línea] 2008. <http://www.dipucuenca.es/pdp/cies/docs/Boletin%2028.pdf>.
15. **Soledad, B. R., Adames, M. y Luzaedo, M.** *Estudio nutricional de las hojas de Grifo Negro (Macrolobium Bicuspidatum).* Venezuela : UCAB, 2004. pág. 43.
16. **Mora, I.** *Nutrición animal.* Costa Rica : UED, 2007. pág. 17.
17. *Proximate analysis of castor seeds and cake.* **Annongu, A. A. y Joseph, J.k.** 1, s.l. : Journal of Applied Sciences and Environmental Management, 2008, Vol. 12, págs. 39 – 41.
18. **Barbado, J. L.** *Hongos comestibles: Su empresa de fungicultura.* Argentina : Albatros, 2003. pág. 121.
19. **Matissek, R., Schnepel, F y Steiner, G.** *Análisis de los alimentos.* España : Acribia, 1998.
20. **Melo, V. y Óscar, C.** *Bioquímica de los procesos metabólicos.* México : Reverté, 2006. pág. 67.
21. **Qureshi, N., Hughes, S. y Ezeji, T. C.** Production of liquid biofuels from Biomass: Emerging Technologies. [aut. libro] H. Blasheck, T. C. Ezeji y Scheffran J. *Biofuels from Agricultural Wastes and Byproducts.* E.U.A. : Wiley-Blackwell, 2010, 2, pág. 12.
22. **Taiz L., Zeiger E.** *Plant physiology.* E.U.A. : Sinauer, 1998. págs. 361-363, 392.
23. *Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fung.* **Aro, N., Pakula, T. y Penttilä, M.** 4, s.l. : FEMS Microbiology Reviews, 2005, Vol. 29, págs. 719-739.

24. **López, E. y Llera, E.** Características de los biocombustibles sólidos. [aut. libro] F. S. Nogues, D. García-Galindo y A. Rezeau. *Energía de la Biomasa*. España : Pressas universitarias de Zaragoza, 2010, Vol. 1, pág. 128.
25. **Caneva, G., Nugari, M. P. y Salvadori, O.** *La biología en la restauración*. España : Narea, 2000. pág. 71.
26. *Fraccionamiento del bagazo de caña de azúcar mediante tratamiento amoniacal: efecto de la humedad del bagazo y la carga de amoníaco.* **Pernalet, Z., y otros.** 1, s.l. : Bioagro, 2008, Vol. 20, págs. 3-10.
27. **Zaragoza, S.** *Prontuario de agricultura*. Madrid : Grupo mundi, 2005. pág. 464.
28. **Merino, J. G.** Caracterización fisicoquímica de 4 tipos de frutos de higuera procedente de la región de Atlixco, Puebla para dar una propuesta de uso. México : BUAP, 2013.
29. *Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review.* **Balat, M.** s.l. : Energy Conversion and Management, 2011, Vol. 52, págs. 858–875.
30. *Biomass pretreatment: Fundamentals toward application.* **Agbor, V. B., y otros.** s.l. : Biotechnology Advances, 2011, Vol. 29, págs. 675–685.
31. *Xylan-type hemicellulose supported palladium nanoparticles: a highly efficient and reusable catalyst for the carbon–carbon coupling reactions.* **Chen, W., y otros.** 5, s.l. : Catalysis Science & Technology, 2014, págs. 1426-1435.
32. *Inorganic matter characterization in vegetable biomass feedstocks.* **Suarez-Garcia, F., y otros.** 81, s.l. : Fuel, 2002, págs. 1161–1169.
33. *Overview on native cellulose and microcrystalline cellulose I structure studied by X-ray diffraction (WAXD) comparison between measurement techniques.* **Terinte, N., Ibbett, R. y Schuster, K. C.** s.l. : Lenzinger Berichte, 2011, Vol. 89, págs. 118-131.
34. **Anugraha, Apartments.** Castor Oil.in. *Comprehensive Castor Oil Report A report on castor oil & castor oil derivatives.* 2010. [En línea] http://www.renewable-energyeilat.org/sites/default/files/Castor_Oil_Report%20Nov%202010.pdf.

35. *Microscopy techniques and image analysis for evaluation of some chemical and physical properties and morphological features for seeds of the castor oil plant (Ricinus communis)*. **Perea-Flores, M. J., y otros.** s.l. : Industrial Crops and Products, 2011, Vol. 34, págs. 1057– 1065.
36. **García, F. J., Roselló, J. y Satamarina, P.** *Introducción al funcionamiento de las plantas*. España : UPV, 2006. pág. 61.
37. **Hernández–González, M. E. y Bautista, M.** VALOR NUTRICIO DE SETAS (*Pleurotus ostreatus*) CULTIVADAS EN PAJA DE TRIGO Y BAGAZO DE AGAVE (Agave Tequilana Weber, var. azul) ENRIQUECIDO CON COL. *VIII congreso nacional de los alimentos*. [En línea] <http://www.respyn.uanl.mx/especiales/2006/ee-14-2006/>.
38. **Biswas, S., Datta, M. y Ngachan, V.** *Mushrooms: a manual for cultivation*. New Delhi : PHI, 2012. pág. 61.
39. **Grajales, O.** *Apuntes de Bioquímica Vegetal. Bases Para Su Aplicación Fisiológica*. México : UNAM, 2005. pág. 45.
40. **Champe P., Harvey R.** *Biochemistry*. 2a. E.U.A. : Lippincott Williams and Wilkins, 1994. pág. 49.
41. *Intensification of hemicellulose hot-water extraction from spruce Wood in a batch extractor – Effects of wood particle size*. **Krogell, J., y otros.** s.l. : Bioresource Technology, 2013, Vol. 143, págs. 212–220.
42. **Luna, L., y otros.** Efecto y actividad enzimática de *Pleurotus ostreatus* en pared celular de rastrojo de cebada. COLPOS. [En línea] <http://www.lrrd.org/lrrd25/12/luna25223.html>.
43. *Utilization of banana wastes for the production of lignolytic and cellulolytic enzymes by substrate fermentation using two Pleurotus species (P. ostreatus and P. sajor-caju)*. **Reddy, G., y otros.** s.l. : Process Biochemistry, 2003, Vol. 38, págs. 1457-1464.
44. **Ávila, M. H.** Enzimas fibrolíticas de *Pleurotus ostreatus* y su actividad en rastrojo de maíz. Tesis de Maestría en ciencias, Especialidad Ganadería,. [En línea] http://www.biblio.colpos.mx:8080/jspui/bitstream/handle/10521/1903/Torres_Salado_N_D_C_Ganaderia_2013.pdf?sequence=1.

45. *High-level xylanase production by an alkaliphilic Bacillus sp. by using solid-state fermentation.* **Amare, G. y Gashaw, M.** s.l. : Enzyme and Microbial Technology, 1999, Vol. 25, págs. 68-72.
46. *Fungal pretreatment: An alternative in second-generation ethanol from wheat straw.* **Salvachúa, D., y otros.** s.l. : Bioresource Technology, 201, Vol. 102, págs. 7500–7506.
47. **FAO.** *Los Carbohidratos en la nutrición humana: informe de una Consulta mixta FAO/OMS de expertos.* Roma : FAO, 1999. pág. 81.

CONCLUSIONES.

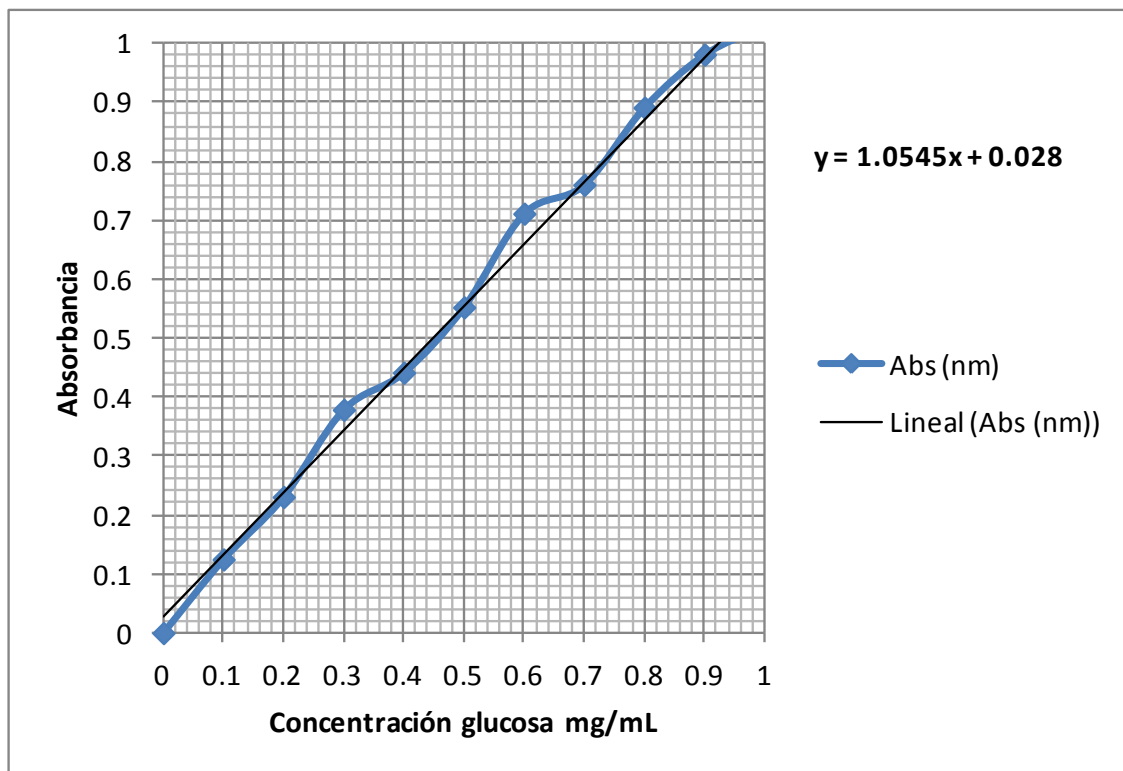
Conclusiones.

De acuerdo a lo analizado en este trabajo de investigación se puede llegar a las conclusiones siguientes:

1. Se redujo el aceite residual en la torta de extracción del 6% al 4.36%.
2. El análisis DRX mostró que las señales cristalinas en la torta provienen de la celulosa y xilano, sin que la lignina influya debido a que es amorfa
3. La torta de extracción de semilla de higuera presenta dos tipos de estructuras; una lisa y una tipo esférica.
4. El análisis químico proximal mostró un alto contenido de fibra cruda y , que implica altos porcentajes de lignina y celulosa.
5. Se concluyó que el hongo *Pleurotus djamor* es capaz de propagarse en la torta de higuera sin necesidad de agregar algún material de soporte.
6. La torta de extracción del aceite de ricino es apta para el cultivo del hongo *Pleurotus djamor*.
7. A pesar de que a diferente tamaño de partícula se determinaron actividades enzimáticas diferentes, las variaciones no son contundentes.
8. Se determinó el día 14 como el de mayor actividad enzimática de xilanasas. Mientras que para celulasas fue el 11.
9. El hongo *Pleurotus djamor* produce una batería enzimática eficiente para la delignificación de la torta de extracción de la semilla de higuera capaz de disminuir 42% de lignina en 20 días con pH 5.3.
10. Se propone ampliar el intervalo de aplicación de las enzimas extracelulares para definir la delignificación máxima alcanzada por las enzimas extracelulares del hongo *Pleurotus djamor*.

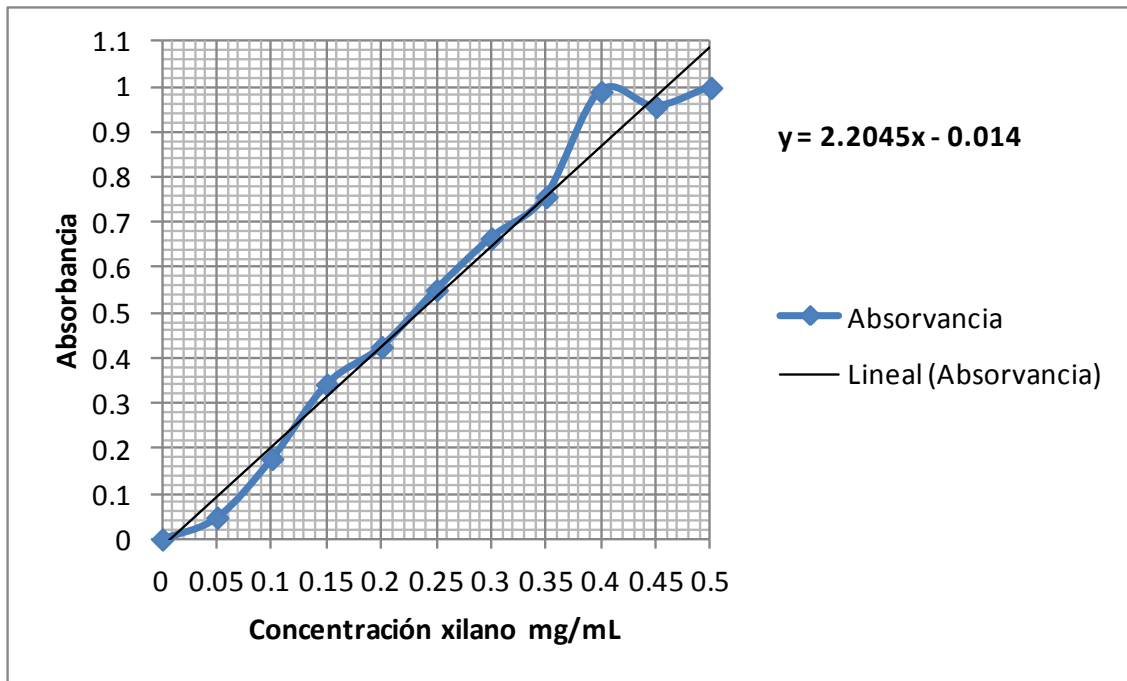
ANEXO.

La figura 3.7 muestra la curva de calibración de celulosa y la fórmula obtenida de la misma, mediante la cual se realizó el cálculo de la determinación enzimática de celulasas.



A.1 Curva de calibración de celulosa.

En tanto la figura 3.8 presenta la curva de calibración de xilano y la fórmula obtenida de la misma a partir de la cual se realizó el cálculo de la actividad enzimática de xilanasas.



A.2 Curva de calibración de xilano.