



COLEGIO DE POSTGRADUADOS
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GANADERÍA

**“EXTRACTOS FIBROLÍTICOS FÚNGICOS COMO MODIFICADORES DE
LA FERMENTACIÓN RUMINAL *In vitro*”**

PAULINO SÁNCHEZ SANTILLÁN

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

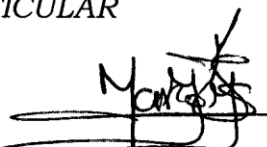
2010

La presente tesis titulada: **EXTRACTOS FIBROLÍTICOS FÚNGICOS COMO MODIFICADORES DE LA FERMENTACIÓN RUMINAL *In Vitro*** realizada por el estudiante **PAULINO SÁNCHEZ SANTILLÁN**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



DR. MARGOS MENESES MAYO

ASESOR



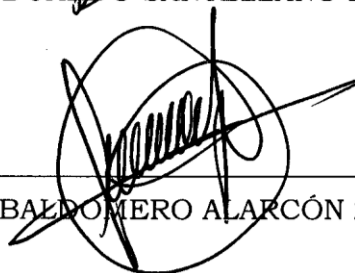
DR. LUIS ALBERTO MIRANDA ROMERO

ASESOR



DR. EDUARDO SANTELLANO ESTRADA

ASESOR



DR. BALDOMERO ALARCÓN ZÚÑIGA

Montecillo, Texcoco, México, julio de 2010

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca No. 211475 otorgada para la realización de mi maestría.

A la línea 7 de Inocuidad, Calidad de Alimentos y Bioseguridad del Colegio de Postgraduados por su financiamiento en la realización de esta tesis.

Al Colegio de Postgraduados por ser el alma mater que me brindo la oportunidad de estudiar un posgrado.

Al Dr. Marcos Meneses Mayo por su valiosa dirección durante mi formación académica y profesional, que sin sus consejos y puntos de vista, no habría sido utilizada al máximo la información de la investigación para realizar la presente tesis.

Al Dr. Luis A. Miranda Romero por el apoyo en las instalaciones para realizar el proceso de investigación, así como sus sabios consejos y opiniones respecto al tema abordado.

Al Dr. Eduardo Santellano Estrada por su valioso apoyo en la parte estadística de la presente tesis, además de sus consejos y opiniones brindadas.

Al Dr. Baldomero Alarcón Zúñiga por su fundamental participación en la revisión de la presente tesis.

A los profesores, técnicos y compañeros que se hicieron partícipes en mi enseñanza e investigación durante la maestría.

A todos, Gracias.

DEDICATORIA

Este trabajo de tesis está dedicado con amor a:

A Dios y a la memoria de mi viejo por darme la oportunidad de superarme.

Abi, sin duda alguna llegaste a mi vida para fortalecerla, porque estas incondicionalmente a mi lado, te agradezco el apoyo para lograr un objetivo más en mi vida, TE AMO.

Mi pequeña Alyn, por ser el motor que me impulsa para cumplir cada uno de mis objetivos planteados y aunque aun no entiendas el porqué de mis ausencias, siempre serás lo más importante en mi vida.

A ti madrecita por el apoyo que siempre me has brindado, te agradezco el darme la vida e inculcarme los valores que ahora me están ayudando a lograr mis objetivos.

Hilario, gracias por darme la oportunidad de saber lo que es tener a un hermano, con el que puedes contar en las buenas y en las malas.

Y a todo los seres que me rodean, y me han apoyado para lograr una meta más, GRACIAS.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1. JUSTIFICACIÓN.....	2
2. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivo general	3
2.2. Objetivos específicos.....	3
3. HIPÓTESIS	4
4. REVISIÓN DE LITERATURA	4
4.1. Bagazo de caña de azúcar.....	4
4.1.1. Producción nacional	4
4.1.2. Composición química	5
4.1.3. Su utilización en la alimentación de rumiantes.....	5
4.2. Estructura de la pared celular	7
4.3. Proceso de fermentación sólida.....	8
4.3.1. Microorganismos usados en la producción de enzimas.....	9
4.3.2. Sustratos usados en la producción de enzimas	9
4.3.3. Factores que afectan la producción de enzimas.....	10
4.3.4. Enzimas producidas	11
4.3.4.1. <i>Celulasas</i>	12
4.3.4.2. <i>Xilanasas</i>	13
4.3.4.3. <i>Lacasas</i>	14
4.3.5. Bagazo de caña de azúcar en fermentación sólida	15
4.4. Hongos de podredumbre blanca	16
4.4.1. <i>Pleurotus ostreatus</i>	17
4.4.2. <i>Fomes fomentarius</i>	18
5. LITERATURA CITADA.....	20

CAPÍTULO 1. ACTIVIDAD DE EXTRACTOS ENZIMÁTICOS DE <i>Pleurotus ostreatus</i> -IE8 y <i>Fomes fomentarius</i> -EUM1 CULTIVADOS EN BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR	29
1.1. INTRODUCCIÓN	29
1.2. MATERIALES Y MÉTODOS	30
1.2.1. Microorganismos experimentales	30
1.2.2. Medios de cultivo.....	30
1.2.4. Velocidad de crecimiento radial (Vcr) y biomasa.....	31
1.2.4.1. Análisis estadístico para Vcr y biomasa	32
1.2.5. Preparación del sustrato para fermentación sólida.....	32
1.2.6. Extracción de enzimas fibrolíticas fúngicas.....	33
1.2.6.1. Actividad enzimática de Xilanasas	33
1.2.6.2. Actividad enzimática de Lacasas	34
1.2.6.3. Actividad enzimática de Celulasas	34
1.2.6.4. Determinación de proteína extracelular	35
1.2.6.5. Análisis estadístico para evaluar actividad enzimática.....	35
1.3. RESULTADOS	35
1.3.1. Vcr y producción de biomasa.....	35
1.3.2. Producción de enzimas fibrolíticas y proteína extracelular	37
1.4. DISCUSIÓN.....	38
1.5. CONCLUSIONES	41
1.6. LITERATURA CITADA.....	42

CAPÍTULO 2. COMPOSICIÓN BROMATOLÓGICA DEL BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR FERMENTADO POR <i>Pleurotus ostreatus</i> -IE8	45
2.1. INTRODUCCIÓN	45
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS	46
2.2.1. Microorganismo experimental.....	46
2.2.2. Propagación de la cepa	46
2.2.3. Preparación del inóculo	47
2.2.4. Preparación del sustrato para FS.....	47
2.2.5. Extracción de enzimas fibrolíticas fúngicas y determinación de proteína extracelular	47
2.2.6. Análisis bromatológico.....	48
2.2.7. Análisis estadístico	48
2.3. RESULTADOS	48
2.3.1. Actividad enzimática y proteína extracelular	48
2.3.3. Análisis bromatológico.....	49
2.4. DISCUSIÓN.....	51
2.5. CONCLUSIONES	55
2.6. LITERATURA CITADA.....	56

CAPÍTULO 3. FERMENTACIÓN RUMINAL <i>IN VITRO</i> DE BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR TRATADO CON FIBROZYME® O EXTRACTO ENZIMÁTICO DE FERMENTADO SÓLIDO.....	61
3.1. INTRODUCCIÓN	61
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS	62
3.2.1. Tratamientos	62
3.2.2. Análisis bromatológico de los tratamientos	64
3.2.3. Cinética de producción de gas <i>in vitro</i>	64
3.2.3.1. Digestibilidad <i>in vitro</i>	64
3.2.3.2. Variables estimadas mediante modelos matemáticos	65
3.2.4. Análisis estadístico.....	65
3.3. RESULTADOS.....	66
3.3.1. Análisis bromatológico.....	66
3.3.2. Cinética de la producción de gas.....	67
3.4. DISCUSIÓN.....	71
3.5. CONCLUSIONES	74
3.6. LITERATURA CITADA.....	78
CONCLUSIONES GENERALES.....	81

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Comportamiento de la industrialización de la caña de azúcar de los 4 ciclos productivos anteriores en México.....	5
Cuadro 2. Principales grupos de microorganismos implicados en fermentación sólida.....	11
Cuadro 1.1. Medios de cultivo usados para la medición de Vcr y biomasa.....	31
Cuadro 1.2. Metodología para determinar xilanasas.....	33
Cuadro 1.3. Metodología para determinar lacasas.....	34
Cuadro 1.4. Producción de biomasa por hongo y medios de cultivo	36
Cuadro 1.5. Actividad enzimática y proteína extracelular en extractos de <i>P. ostreatus</i> -IE8 y <i>F. fomentarius</i> -EUM1 en bagazo de caña de azúcar.....	37
Cuadro 2.1. Actividad enzimática fibrolítica y proteína extracelular de <i>P. ostreatus</i> -IE8 sobre bagazo de caña de azúcar.....	49
Cuadro 2.2. Composición bromatológica durante la FS sobre bagazo de caña de azúcar en base seca	50
Cuadro 2.3. Coeficientes de correlación lineal entre componentes químicos y actividad enzimática fibrolítica fúngica	55
Cuadro 3.1. Actividad enzimática fibrolítica (UI) del extracto crudo enzimático y Fibrozyme®.....	63
Cuadro 3.2. Producción de gas (mL h ⁻¹) por hora del bagazo de caña de azúcar tratado con productos de la fermentación sólida y Fibrozyme® a distintos periodos de incubación	70

Cuadro 3.3. Análisis bromatológico de un fermentado sólido de caña de azúcar comparado con Fibrozyme® o extracto crudo enzimático.....	75
Cuadro 3.4. Parámetros de la cinética de producción de gas <i>in vitro</i> y digestibilidad de un fermentado sólido de caña de azúcar comparado con Fibrozyme® o extracto crudo enzimático.....	75
Cuadro 3.5. Parámetros estimados sobre modelos matemáticos a partir de la cinética de producción de gas <i>in vitro</i> y digestibilidad de un fermentado sólido de caña de azúcar comparado con Fibrozyme® o extracto crudo enzimático.	76
Cuadro 3.6. Coeficientes de correlación entre componentes químicos y producción de un fermentado sólido de caña de azúcar comparado con Fibrozyme® o extracto crudo enzimático.	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Vcr de <i>P. ostreatus</i> -IE8 y <i>F. fomentarius</i> en medios de cultivo con EB y peptona de caseína como fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente.	36
Figura 3.1. Tasa fraccional de producción de gas <i>in vitro</i> de un fermentado sólido de caña de azúcar comparado con Fibrozyme® y extracto crudo enzimático	68
Figura 3.2. Evolución de la producción de gas <i>in vitro</i> de un fermentado sólido de caña de azúcar comparado con Fibrozyme® y extracto crudo enzimático	69

LISTA DE ANEXOS

ANEXO I. CURVAS PATRÓN

I.I. Curva patrón para xilanasas y celulasas

I.II. Curva patrón para proteína extracelular

ANEXO II. RESULTADOS ESTADÍSTICOS

ANEXO III. CURVAS PATRÓN PARA LA CEPA IE8

ANEXO IV. CINÉTICA DE LA PRODUCCIÓN DE GAS *In vitro*

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS ANEXAS

Tabla I. Volumen de reactivos utilizados para las curvas patrón de xilanasas y celulosas

Tabla II. Volumen de reactivos utilizados para la curva patrón de proteína extracelular

Tabla III. Análisis de varianza de Vcr

Tabla IV. Análisis de varianza de la producción de biomasa

Figura I. Curva patrón de xilosa

Figura II. Curva patrón de glucosa

Figura III. Curva patrón de seroalbumina bovina

Figura IV. Curva patrón de xilosa

Figura V. Curva patrón de glucosa

Figura VI. Curva patrón de seroalbumina bovina

Figura VII. Curva patrón de aire

Extractos fibrolíticos fúngicos como modificadores de la fermentación ruminal *In vitro*

Sánchez Santillán Paulino, MC

Se midió la velocidad de crecimiento radial (Vcr) y biomasa en 2 medios de cultivo del extracto de bagazo de caña (EB) adicionado o no con peptona de caseína y se evaluó la actividad enzimática fibrolítica (lacasas, xilanasas y celulasas) a 0, 7 y 15 d en fermentación sólida (FS) de *Pleurotus ostreatus*-IE8 y *Fomes fomentarius*-EUM1 para producir extractos fúngicos. El cambio químico del bagazo de caña de azúcar y la cinética de producción de gas *in vitro* se estudiaron al adicionar Fibrozyme® y productos de la FS (cultivos sólido y extracto crudo enzimático (ECE)) a través de 6 tratamientos que consideraron variaciones en el origen y complejo de las enzimas fibrolíticas. La adición de peptona al medio no afectó la Vcr de *F. fomentarius*-EUM1, mientras que en *P. ostreatus*-IE8 la redujo. La adición de peptona al medio no promovió una mayor producción de biomasa y la cepa *F. fomentarius*-EUM1 (51.0 mg) produjo mayor cantidad de biomasa que *P. ostreatus*-IE8 (35.6 mg). La mayor actividad de xilanasas se presentó al 7 d de FS para ambas cepas sin diferencias ($p>0.05$); en lacasas la mejor productividad fue al 7 d con *P. ostreatus*-IE8 (10.65 UI g SSi⁻¹), y en celulasas fue *F. fomentarius*-EUM1 al 7d (1.90 UI g SSi⁻¹). Los tratamientos donde se aplicaron enzimas fibrolíticas (T4 y T5) no tuvieron diferencias en FDN, FDA, LDA, PT, cenizas, MO, MS, S, L y DIGV; T1, T2, T3, T4 y T5 modificaron negativamente Vm, DIGMS, DIGV, EM y DMO; T3 tuvo la menor L (5.37 h); T1, T5 y T6 obtuvieron la mayor AM (0.042 g); T1 (36.80 mg) y T2 (33.56 mg) cuantificaron la mayor BM. Las principales conclusiones del estudio son: el EB proporciona los nutrientes necesarios para el crecimiento micelial de *P. ostreatus*-IE8 y *F. fomentarius*-EUM1; la mejor actividad enzimática fibrolítica en bagazo de caña de azúcar se obtuvo al 7 d de FS; y el ECE obtenido generó efectos similares en las fracciones de la fibra, PT y parámetros de la producción de gas *in vitro* al producto comercial Fibrozyme®.

Fibrolytic fungal extracts as modifiers of in vitro fermentation

Sánchez Santillán Paulino, MC

With the main task to determine the fungal extract production of two strains, *Pleurotus ostreatus*-IE8 and *Fomes fomentarius*-EUM1, radial growth rate (Vcr) and biomass were measured in two culture media added or not with casein peptone and fibrolytic enzymes activities (laccases, xylanases and cellulases) evaluated at 0, 7 and 15 d of solid fermentation (SF). The chemical change of sugarcane bagasse and kinetics of *in vitro* gas production were studied by adding Fibrozyme® and products the SF (solid crops and crude enzyme extract) through 6 treatments than considered variations in origin and complexity of fibrolytic enzymes. The addition of peptone to both mediums did not affect Vcr for *F. fomentarius*-EUM1, while the reduced to *P. ostreatus*-IE8. The addition of peptone to both mediums did not promote increase production of biomass the *F. fomentarius*-EUM1 (51.0 mg) produced higher amount of biomass than *P. ostreatus*-IE8 (35.6 mg). The major activity of xylanases was present at 7 d of SF for both strains with no differences ($p>0.05$); the highest laccase concentration was at 7d with strain *P. ostreatus*-IE8 (10.65 UI g SSi⁻¹), and cellulases was in *F. fomentarius*-EUM1 at 7 d (1.90 UI g SSi⁻¹). The treatments with added fibrolytic enzymes (T4 and T5), were not different in NDF, ADF, ADL, TP, ash, OM, DM, S, L and DIGV; T1, T2, T3, T4 and T5 were different for Vm, DIGMS, DIGV, EM and DMO; T3 had lowest L (5.37 h); T1, T5 and T6 obtained greatest AM (0.042 g); T1 (36.80 mg) and T2 (33.56 mg) quantified more BM. The main conclusions of the study are: the EB provides the nutrients needed for mycelial growth of *F. fomentarius*-EUM1 and *P. ostreatus*-IE8; the best activity fibrolytic enzyme in sugarcane bagasse was obtained at 7 d of SF; and the ECE got the similar effects in fractions of fiber, PT and *in vitro* gas production than commercial product Fibrozyme®.

INTRODUCCIÓN GENERAL

La humanidad genera grandes volúmenes de residuos de todo tipo y crea uno de los mayores problemas del planeta. A partir de la década de 1970's surgieron normativas basadas fundamentalmente en el reciclado y reutilización de los materiales (Higueras y Oyarzun, 2009). Las actividades agropecuarias y agroindustriales generan una variedad de esquilmos y subproductos que pueden emplearse en la alimentación de rumiantes (SAGARPA, 2009). El bagazo del tallo de la caña de azúcar, es un residuo fibroso que se obtiene de la extracción del jugo. La producción mundial de bagazo de caña es de 234 millones de toneladas anuales, de las cuales 50% es usado en los ingenios como combustible para las calderas (Liu *et al.*, 2008).

Los subproductos agroindustriales utilizados en la alimentación animal son de bajo costo, pero también es bajo su valor nutritivo, por lo que se pueden emplear procedimientos químicos, físicos y biológicos para mejorar su digestibilidad. El método químico ha mostrado mejores resultados, especialmente a base de sustancias alcalinas (hidróxido de sodio y amoníaco; Martínez, 1985). Los métodos físicos más usados son el picado (Church, 1993) y la molienda (Van Soest, 1994). En el procesamiento biológico se emplean principalmente hongos de pudrición blanca (*Pleurotus ostreatus* y *Fomes fomentarius*), los cuales solubilizan los enlaces de lignina y mejoran la digestibilidad de la fibra y de componentes lignocelulósicos de la pared celular de tejidos vegetales (SAGARPA, 2009).

Un método para hidrolizar y oxidar la pared celular es la producción de enzimas fibrolíticas fúngicas mediante fermentación sólida (FS). La FS se define como el proceso en el que se hacen crecer microorganismos en sustrato sólido con baja concentración de agua, y durante su crecimiento

producen enzimas. La producción enzimática mediante FS ha recibido atención en estudios de biotecnología, para la obtención de lipasas, inulinasas, proteasas, xilanasas, lacasas, celulasas, etc. Entre las ventajas de la FS están: el uso de subproductos agrícolas y agroindustriales de bajo costo, alta productividad de enzimas, bajos requerimientos de energía para la producción de enzimas, el sistema tiene pérdidas mínimas de agua durante el proceso, extensa estabilidad de las enzimas obtenidas y bajos costos de producción (Mazutti *et al.*, 2006).

1. JUSTIFICACIÓN

En México la producción de caña de azúcar está ampliamente difundida en 15 regiones cañeras (Flores, 1986) donde se producen 47.8 millones de ton anuales de caña de azúcar para la molienda, lo que genera 13.6 millones de ton anuales de bagazo (UNC, 2009). Por la alta disponibilidad y precio, el bagazo de caña de azúcar es importante en la alimentación de rumiantes en México; ya que contribuye a la reducción de costos en las unidades de producción pecuaria. Sin embargo, su baja digestibilidad y bajo contenido de nitrógeno limitan su uso. Diversas investigaciones se han enfocado a determinar el efecto de tratamientos químicos y físicos para mejorar su calidad nutritiva encontrando una gran variabilidad de resultados (Randel, 1970; Martín, 1986; Ortega *et al.*, 1991; Pandey *et al.*, 2000)

Con el propósito de incrementar el valor nutritivo y productividad del bagazo de caña, se propone el uso de enzimas fibrolíticas fúngicas. El crecimiento de hongos lignocelulósicos mediante fermentación sólida (FS) pretende enriquecer el contenido de proteína del sustrato y reducir la concentración de fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente ácido (FDA) y hemicelulosa contenida en la fibra lignocelulósica, e incrementar

la biodisponibilidad de nutrientes (Graminha *et al.*, 2008). La aplicación de enzimas fibrolíticas exógenas (xilanasas, lacasas y celulasas) busca aumentar la biodisponibilidad de los componentes de la fibra para mejorar la eficiencia productiva de los rumiantes (Colombatto *et al.*, 2003) al permitirles aprovechar los nutrientes potencialmente digestibles contenidos en los subproductos fibrosos (Yescas-Yescas *et al.*, 2004).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Caracterizar la actividad enzimática fibrolítica, composición nutrimental y la fermentación ruminal *in vitro*, esta última mediante la técnica de producción de gas de los extractos fúngicos del fermentado sólido sobre bagazo de caña de azúcar de *Pleurotus ostreatus*-IE8 y *F. fomentarius*-EUM1.

2.2. Objetivos específicos

- Caracterizar las enzimas fibrolíticas fúngicas obtenidas mediante FS de *P. ostreatus*-IE8 y *F. fomentarius*-EUM1.
- Cuantificar la actividad enzimática fibrolítica obtenida de la cepa IE8 de *P. ostreatus* sobre bagazo de caña de azúcar.
- Evaluar la composición bromatológica del bagazo de caña de azúcar fermentado con IE8 de *P. ostreatus*.
- Determinar la cinética de producción de gas, cambios químicos y digestibilidad verdadera *in vitro* del bagazo de caña de azúcar tratado con una enzima fibrolítica comercial (Fibrozyme®) y las obtenidas por FS con IE8 de *P. ostreatus* (xilanasas, lacasas y celulasas).

3. HIPÓTESIS

La producción y acción de enzimas fibrolíticas fúngicas (xilanasas, lacasas y celulasas) obtenidas mediante FS de *P. ostreatus*-IE8 y *F. fomentarius*-EUM1, afectan la composición química de la fibra y proteína total del bagazo de la caña de azúcar, además se modifica la cinética de la producción de gas *in vitro* al tratar el bagazo de caña de azúcar con dichas enzimas o procesarlo con FS.

4. REVISIÓN DE LITERATURA

Los residuos agropecuarios y agroindustriales son considerados como abundantes, baratos y de fácil disponibilidad, mismos que pueden incluirse en la alimentación de rumiantes (Loehr, 1986). Actualmente, las agroindustrias utilizan menos de 10% de la biomasa generada, propiciando su quema en campo o carreteras provocando contaminación al ambiente (Liu *et al.*, 2008).

4.1. Bagazo de caña de azúcar

El bagazo es un residuo fibroso de la caña de azúcar obtenido después de la trituración y extracción del jugo, caracterizado por ser un material lignocelulolítico. Es utilizado como combustible para las calderas de la fábrica de azúcar o como materia prima para la fabricación de pasta de papel, productos de papel, paneles de construcción y ciertos productos químicos (Liu *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2008).

4.1.1. Producción nacional

La producción de caña de azúcar en México está distribuida en la Costa del Pacífico, Golfo de México y la Península de Yucatán (Flores, 1986). En promedio existen 54 ingenios azucareros, con una superficie sembrada en 2008 de 738,403 ha, una producción total de 51.1 millones ton,

promediando 73.89 ton ha⁻¹ y un valor de la producción cercano a 20,391 millones de pesos. Veracruz es el principal estado productor de caña de azúcar con 268,122 ha, seguido de Jalisco con 71,549 ha, San Luis Potosí con 67,081 ha, Tamaulipas con 58,409 ha, entre otros (SIAP-SAGARPA, 2009). En el periodo 2006-2009 se molieron aproximadamente 46'784,583 ton anuales de caña que generaron 13'621,853 ton de bagazo (Cuadro 1).

4.1.2. Composición química

Una característica atractiva del bagazo es su composición química por la cantidad de grupos hidroxilo contenidos en la pared celular (Liu *et al.*, 2008), ya que se compone de aproximadamente 50% de celulosa, 25% de hemicelulosa y lignina. Químicamente contiene alrededor de 50% de α -celulosa, 30% pentosas, 2.4% de cenizas (Pandey *et al.*, 2000).

Cuadro 1. Comportamiento de la industrialización de la caña de azúcar de los 4 ciclos productivos anteriores en México

Concepto	Ciclo productivo				Promedio
	2008/09	2007/08	2006/07	2005/06	
Superficie industrializada (ha)	663,057	683,008	675,416	658,776	670,064
Caña por ha (ton)	64.06	70.72	72.59	71.78	69.79
Caña molida bruta (ton)	42'516,838	48'305,474	49'025,604	47,290,415	46'784,583
Caña molida neta (ton)	40'944,741	46'518,988	47'273,294	45'673,625	45'102,662
Bagazo obtenido (ton)	12'576,430	14'051,635	14'113,420	13'745,927	13'621,853
Bagazo en caña (%)	29.58	29.09	28.79	29.06	29.13
Humedad en bagazo (%)	51.06	51.06	51.08	51.04	51.06

Fuente: UNC, 2009.

4.1.3. Su utilización en la alimentación de rumiantes

A partir de la década de los 50's se ha utilizado el bagazo en raciones para rumiantes. Su aporte nutrimental resulta insignificante a pesar del contenido de carbohidratos potencialmente digestibles (alrededor 70%) (Martín, 1986), esto debido a su alto contenido de fibra especialmente

celulosa y lignina, así como su bajo contenido de nitrógeno (Ortega *et al.*, 1991).

El pre-tratamiento del bagazo permite mejorar su digestibilidad y aumenta la superficie de contacto para los microorganismos del rumen, ya que amplía la superficie interna de contacto de las partículas por la degradación parcial de la hemicelulosa y lignina. Existen varios métodos físicos y químicos que se emplean: explosión a vapor, rayos gamma, tratamiento con álcalis, peróxido de hidrogeno, disolventes, etc. (Pandey *et al.*, 2000).

Randel *et al.* (1972) utilizaron 40% de bagazo en 2 raciones para vacas lecheras, en una el bagazo se procesó 24 h en una solución al 2% de NaOH y la otra no tuvo tratamiento, encontrando incremento en la producción de leche y grasa con el bagazo tratado. Marshall y Van Horn (1975) compararon pellets de bagazo de caña de azúcar y cascarilla de algodón en raciones para vacas lecheras (25% de la dieta), obteniendo resultados similares en consumo y producción diaria de leche. Roman-Ponce *et al.* (1975) estudiaron la interacción entre cantidad y tipos de tratamiento del bagazo con harina de soya y urea, encontrando mejoramiento productivo si lo utilizaban en menor cantidad y lo fermentaban. Además se han realizado otros estudios donde el bagazo se trató con hidróxido de sodio y presión a vapor (Harris *et al.*, 1983), ácido peroxiacético (Kamstra *et al.*, 1980) comparándolo con otros subproductos en diferentes parámetros productivos.

Randel (1970), Hassoun *et al.* (1990) y Ortega *et al.* (1991) utilizaron la urea sobre bagazo para mejorar su digestibilidad, ya que por medio de la ureasa se hidroliza a amoníaco causando la disociación del complejo lignina-polisacárido estructural de la pared celular. No obstante, se ha

usado el bagazo junto con otras fuentes de nitrógeno y carbohidratos solubles generando aumentos en la ganancia diaria de peso en rumiantes (Randel, 1970).

4.2. Estructura de la pared celular

La composición química de las plantas varía considerablemente y está influenciada por factores genéticos y ambientales; donde la celulosa, hemicelulosa y lignina son los principales constituyentes de los materiales lignocelulósicos; aparte de estos polímeros primarios, las plantas incorporan otros polímeros estructurales como ceras, proteínas, etc (Malherbe y Cloete, 2002). La fibra es un componente heterogéneo de las plantas cuya estructura tridimensional es variable y poco conocida, entre 35 y 80% de la materia orgánica de los tejidos vegetales está en la pared celular proporcionando rigidez estructural y protección (Jung y Allen, 1995).

La celulosa es el mayor polisacárido en vegetales y más abundante en la biosfera. Se encuentra combinada con lignina formando una mezcla de polímeros de ácido fenólico no aprovechables biológicamente (Church *et al.*, 2004), tiene estructura lineal no ramificada constituida de 10,000 a 15,000 unidades de D-glucosa unidas por enlaces β -1,4 llegando a formar cadenas de 14,000 residuos (Lehninger, 1994; Mathews y Van Holde, 1996; Özköse *et al.*, 2001; Malherbe y Cloete, 2002).

La hemicelulosa es un polisacárido insoluble en agua compuesto por moléculas D-glucosa, D-galactosa, D-manosa, D-xilosa, L-arabinosa y ácido glucorónico. Es el principal componente de las paredes celulares, pero no el más abundante. Es más soluble que la celulosa y con frecuencia presenta ramificaciones; su principal desventaja es su unión a lignina que evita la acción de los microorganismos (Maynard *et al.*, 1981;

McAllister *et al.*, 1994; Malherbe y Cloete, 2002). La hemicelulosa contiene dos tipos diferentes de polisacáridos: *a)* celulosanas polisacáridos de cadena corta que forman parte de la propia estructura de la celulosa y están orientadas en la estructura micelar y *b)* polisacáridos amorfos incrustados y asociados íntimamente a la lignina de la membrana celular (Church, 1993).

Aunque no es un carbohidrato, la lignina está relacionada con polisacáridos estructurales, confiere resistencia química y biológica a la pared celular, así como soporte a las plantas. Está formada de tres derivados de fenilpropano: alcohol coniferílico, alcohol sinapílico y alcohol p-cumaril. Se constituye de numerosas unidades de fenilpropano agrupadas en una compleja estructura entrecruzada. La incrustación física de lignina en fibras vegetales las hace inaccesibles a las enzimas. Los aminoácidos fenilalanina y tirosina son considerados los precursores de polímeros fenólicos que dan origen a lignina en la pared celular (Mc Donald *et al.*, 1993; Lehninger, 1994; Jung y Allen, 1995; Mathews y Van Holde, 1996).

4.3. Proceso de fermentación sólida

La fermentación en estado sólido puede definirse como un proceso de fermentación donde los microorganismos crecen en sustratos sólidos inertes o naturales con baja concentración de agua (Pandey *et al.*, 1999; Krishna, 2005; Mazutti *et al.*, 2006). Su utilización es para mejorar el valor nutritivo de los subproductos agrícolas y residuos industriales, así como la producción de enzimas (celulasas, xilanasas, lacasas, lipasas, inulinasas, proteasas, etc). Actualmente, el uso del procedimiento se incrementó por la cantidad de residuos producidos anualmente (Kumar *et al.*, 2003; Mazutti *et al.*, 2006; Graminha *et al.*, 2008).

4.3.1. Microorganismos usados en la producción de enzimas

La selección del microorganismo es un aspecto importante de la FS para la producción de enzimas, debe ser capaz de crecer a baja actividad de agua, ser generalmente reconocido como seguros y aceptado por la administración internacional de fármacos y comida (Mazutti *et al.*, 2006). Un gran número de microorganismos, incluidos bacterias, levaduras y hongos producen diferentes grupos de enzimas fibrolíticas (Pandey *et al.*, 1999; Krishna, 2005). Las bacterias están implicadas principalmente en el compostaje, ensilados y procesos de comida. Las levaduras son usadas para producción de etanol, producción de alimentos y piensos. Sin embargo, los hongos filamentosos son el grupo más importante de los microorganismos utilizados debido a sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y enzimológicas, ya que el modo de crecimiento de sus hifas y tolerancia a la baja actividad de agua, los hace eficientes y competitivos en la microflora natural de bioconversión de sustratos sólidos (Raimbault, 1998; Graminha *et al.*, 2008).

El crecimiento de las hifas de los hongos filamentosos les permite crecer en la superficie y penetrar entre los espacios de partículas (Graminha *et al.*, 2008). Las enzimas hidrolíticas se excretan en las puntas de las hifas, permitiéndoles accionar de forma eficiente y penetrar en la mayoría de sustratos sólidos aumentando la accesibilidad a los nutrientes disponibles dentro de las partículas (Raimbault, 1998).

4.3.2. Sustratos usados en la producción de enzimas

En general los residuos agroindustriales se consideran los mejores sustratos en los procesos de FS para la producción de enzimas a partir del cultivo de microorganismos. Su selección depende de varios factores relacionados principalmente con el costo, disponibilidad, tamaño de partícula y nivel de humedad (Raimbault, 1998; Pandey *et al.*, 1999;

Graminha *et al.*, 2008). Algunos de los más usados son bagazo de caña de azúcar, salvado de trigo, salvado de arroz, salvado de maíz, salvado de grano, paja de trigo, paja de arroz, cáscara de arroz, aserrín, mazorcas de maíz, fibra de coco, médula de los desechos de plátano, etc. También ha sido práctica realizar pre-tratamiento químico y/o mecánico para hacerlos más accesibles al crecimiento microbiano (Pandey *et al.*, 1999; Singhania *et al.*, 2008).

4.3.3. Factores que afectan la producción de enzimas

Los factores que pueden influir en la FS se pueden dividir en dos: *a) biológicos* relacionados con procesos metabólicos y reproducción del microorganismo, determinando su comportamiento de manera específica y; *b) físico-químicos* relacionados con los fenómenos de transporte, energía, masa y demás consideraciones termodinámicas. Dichos factores están íntimamente relacionados y no pueden considerarse uno independiente de otro; no obstante, se puede distinguir cuando un factor está alterando alguna respuesta en particular. Los factores incidentes en FS tendrán impacto sobre la cepa de selección, acondicionamiento del sustrato, diseño y características del medio, etc (Rodríguez-León *et al.*, 2008).

Los principales factores que afectan la síntesis de enzimas microbianas en procesos de FS son: selección del sustrato adecuado, selección del microorganismo, pre-tratamiento del sustrato, tamaño de partícula del sustrato, contenido de agua, actividad del agua en el sustrato, humedad relativa, tipo y tamaño de inóculo, temperatura del proceso fermentativo, remoción del calor metabólico y período del cultivo e intercambio gaseoso (Pandey *et al.*, 1999; Rodríguez-León *et al.*, 2008).

Cuadro 2. Principales grupos de microorganismos implicados en fermentación sólida

Microorganismo	Proceso de FS
Bacteria	
<i>Bacillus</i> sp.	Composta, amilasas
<i>Pseudomonas</i> sp. <i>Serratia</i> sp. <i>Streptococcus</i> sp.	Composta
<i>Lactobacillus</i> sp. <i>Clostridium</i> sp.	Ensilado, Alimentos
Levaduras	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Alimentos, Etanol
<i>Schwanniomyces castelli</i>	Etanol, Amilasas
Hongos	
<i>Aspergillus</i> sp.	Composta, Industrialmente, Alimentación
<i>Fusarium</i> sp.	Composta, giberinas
<i>Rhizopus</i> sp.	Composta, alimentación, enzimas, ácidos orgánicos
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Composta, degradación de lignina
<i>Trichoderma</i> sp.	Composta, control biológico, bioinsecticidas
<i>Beauveria</i> sp., <i>Metharizium</i> sp.	Control biológico, bioinsecticidas
<i>Aspergillus oryzae</i>	Alimentación, ácido cítrico
<i>Rhizopus oligosporus</i>	Amilasas, lipasas
<i>Aspergillus niger</i>	Alimentación, proteínas, amilasas, ácido cítrico
<i>Pleurotus oestreatus</i> , <i>sajor-caju</i>	Enzimas
<i>Penicillium notatum</i> , <i>roquefortii</i>	Penicilina, quesos

Fuente: Adaptado de Raimbault (1998).

4.3.4. Enzimas producidas

Casi todas las enzimas microbianas conocidas se pueden producir mediante procedimientos de FS. La mayoría de las enzimas producidas son de importancia industrial como proteasas, celulasas, ligninasas, xilanasas, pectinasas, amilasas, etc. Sin embargo, se han obtenido otro tipo de enzimas (inulinasas, fitasas, etc) que se obtienen mediante fermentación sumergida (FSm) (Pandey *et al.*, 1999; Kumar *et al.*, 2008). La producción de enzimas extracelulares a partir de hongos filamentosos ha sido desarrollada extensivamente por FSm y FS; no obstante, la FS es

la alternativa más adecuada para la producción de enzimas, dadas las características fisiológicas y morfológicas de los hongos filamentosos (García y Torres, 2003). A continuación se describen brevemente las enzimas fibrolíticas celulasas, xilanasas y lacasas.

4.3.4.1. Celulasas

Las celulasas son enzimas hidrolíticas que participan en el rompimiento de los enlaces glucosídicos β -1,4 presentes en los polisacáridos de la celulosa. La hidrólisis y utilización eficiente de la celulosa requiere la acción concertada de tres enzimas diferentes: *endo- β -1,4-glucanasas* (EC 3.2.1.4) las cuales rompen al azar los enlaces internos de la molécula en regiones amorfas, produciendo un rápido decremento en la longitud de la cadena y lento incremento de los grupos reductores libres. Las *exo- β -1,4-glucanasas* o celobiohidrolasas (EC 3.2.1.91) remueven unidades de glucosa o celobiosa a partir del extremo libre no reductor de la cadena de celulosa. Finalmente *β -glucosidasas* o celobiasas (EC 3.2.1.21) hidrolizan celobiosa producida por las actividades anteriores, dando como resultado glucosa que sirve como fuente de carbono (Malherbe y Cloete, 2002; Ponce y Pérez, 2002; Aro *et al.*, 2005; Valáskova y Baldrian, 2006; Kumar *et al.*, 2008).

Diversas bacterias y hongos pueden sintetizarla. Los géneros que las producen principalmente son *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* (Cen y Xia, 1999). Su producción parece estar controlada por la inducción y los mecanismos de represión, ya que en la mayoría de los microorganismos su biosíntesis es inducida por los productos de degradación de la celulosa (Chander *et al.*, 1997). Actualmente, existen disponibles numerosos complejos enzimáticos comerciales que contienen actividad celulolítica obtenidos de microorganismos de origen fúngico y

bacteriano como *Trichoderma* sp., *Aspergillus niger* y *Bacillus subtilis* (Ovando-Chacón y Waliszewski, 2005).

Las celulasas tienen varias aplicaciones: extracción y/o clarificación de jugos de frutas y hortalizas, cocción, elaboración de cerveza, biotificación de la mezclilla, uso en la pulpa y reciclado de papel (Kumar *et al.*, 2008), extracción de leche, almidón, aceite, colorantes y antioxidantes (Ovando-Chacón y Waliszewski, 2005), adición a forrajes para aumentar la digestibilidad, hidrólisis de celulosas para producir etanol, así mismo se encuentran en detergentes para quitar fibras dañadas en tejidos de algodón (Wilson and Irwin, 1999).

4.3.4.2. Xilanasas

Las xilanasas (EC 3.2.1.8) son un conjunto de enzimas producidas por microorganismos que actúan de manera sinérgica y secuencial sobre la estructura del xilano para degradarlo y convertirlo en azúcares constitutivos; pero debido a su heterogeneidad estructural requiere la acción sinérgica de diferentes enzimas xilanolíticas para su hidrólisis: endoxilanasas β -1,4; β -xilosidasas; α -arabinofuranosidasas, α -glucuronidasas, acetilxilan esterasas (Loera y Villaseñor-Ortega, 2006; Asha y Prema, 2007; Kumar *et al.*, 2008).

Las xilanasas han sido producidas por una gran variedad de organismos vivos: bacterias marinas y terrestres, bacterias del rumen, hongos, algas marinas, protozoos, caracoles, crustáceos, insectos, plantas terrestres y sus semillas. Sin embargo, sobresalen los hongos filamentosos por las cantidades producidas, generando mayor interés por parte de la industria a la fecha; además al excretar las enzimas al medio eliminan la necesidad de interrumpir la célula para purificar la enzima producida. En FS la elección del sustrato es de gran importancia para el éxito de producir xilanasas. El mejor inductor son xilanos purificados de bajo

peso molecular; no obstante, se tiene la alternativa de sustratos lignocelulolíticos como la cascara de cebada, mazorcas de maíz, salvado o paja de trigo, ya que existen estudios donde se han obteniendo mejores resultados (Loera y Villaseñor-Ortega, 2006).

A nivel comercial, la producción de xilanasas se limita a las cepas *Trichoderma* sp. y *Aspergillus* sp. (Loera y Villaseñor-Ortega, 2006) limitándose su producción por los altos costos de los sustratos utilizados (Bocchini *et al.*, 2005). Las xilanasas tienen diversas utilidades: aplicación en materiales lignocelulolíticos para producir combustibles y otros productos químicos, modificación en productos de panadería, mejoramiento de dietas para aves de corral, elaboración de cerveza, (Loera y Villaseñor-Ortega, 2006), producción de oligosacáridos y bicarbonato, extracción y clarificación de zumos de frutas (Kumar *et al.*, 2008), blanqueo de reactivos químicos disminuyendo la producción de contaminantes durante el proceso (Valls y Roncero, 2009).

4.3.4.3. Lacasas

Las lacasas (EC 1.10.3.2) pertenecen al grupo de enzimas polifenol-oxidases, contienen cuatro átomos de cobre en su sitio catalítico, de los cuales uno le da color azul (Mayer y Staples, 2002; Suzuki *et al.*, 2003; Baldrian, 2006; Pozdnyakova *et al.*, 2006). Oxidan una gran variedad de compuestos fenólicos, así como diaminas y aminas aromáticas (Loera *et al.*, 2006).

Están presentes en hongos, plantas superiores y algunas bacterias. En plantas superiores están involucrados en la lignificación de los tejidos del xilema (Loera *et al.*, 2006). Los hongos de pudrición blanca (*Trametes versicolor*, *Lentinus edodes* y *Pleurotus ostreatus*) degradan lignina y forman pigmentos y se ha propuesto una función en la oxidación de

ácidos húmicos y del Mn^{+2} a Mn^{+3} . En sistemas bacteriológicos se incluye la producción de melanina y participación en la morfogénesis (Mayer y Staples, 2002; Baldrian, 2006; Loera *et al.*, 2006).

La actividad lacasa se ha demostrado en muchas especies de hongos y purificada en decenas de especies. Erróneamente se concluye que las lacasas son enzimas extracelulares presentes en la mayoría de las especies de hongos, porque existen grupos taxonómicos de hongos que normalmente no producen cantidades significativas o no se ha demostrado su producción (*Zygomycetes* y *Chytriodionictes*). Los basidiomicetos (hongos de pudrición blanca) y su sistema ligninolítico permiten concluir que la madera descompuesta es el entorno típico para la producción de lacasas (Baldrian, 2006).

4.3.5. Bagazo de caña de azúcar en fermentación sólida

El bagazo ha sido utilizado *a)* en la producción de proteína mediante FS para la alimentación animal, empleando levaduras y hongos; *b)* como fuente de carbono o energía para producir lacasas, ligninasas, Mn-peroxidasas, fenol oxidasas, xilanasas, pigmentos, aromas frutales; *c)* como soporte inerte impregnado de medio líquido para la obtención de ácido glutámico, ácido láctico, ácido cítrico, pectinasas, penicilina, etanol y pigmentos (Pandey *et al.*, 2000; Singhanian *et al.*, 2008).

A través del tiempo se han cultivado gran variedad de microorganismos (bacterias, levaduras y hongos) sobre el bagazo de caña de azúcar. Los hongos filamentosos, en especial los basidiomicetos son preferidos para la producción de enzimas y enriquecimiento de proteína. Entre los microorganismos más cultivados en el bagazo están *Acinetobacter calcoaceticus*, *Agrocybe aegarita*, *Aspergillus ellipticus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. phoenicis*, *Athelia* sp., *Brevibacterium* sp., *Candida*

blankii, *C. tropicalis*, *C. utilis*, *Cellulomonas flavigena*, *Cephalosporium* sp., *Ceratocystis fimbriata*, *Penicillium chrysogenum*, *Pleurotus* sp., *P. cornucopiae*, *P. eryngii*, *P. ostreatus*, *P. sajor-caju*, *Trametes versicolor*, etc (Singhania *et al.*, 2008).

4.4. Hongos de podredumbre blanca

El termino podredumbre o pudrición blanca hace referencia a la celulosa blanca expuesta después de la degradación selectiva de la lignina por parte del microorganismo (Rodríguez *et al.*, 2006). Los sistemas de enzima oxidativa empleados por los hongos de podredumbre blanca no son específicos y han sido implicados en la degradación de una gran variedad de xenobióticos aromáticos, incluidos los hidrocarburos aromáticos policíclicos, bifenilos policlorados, pentaclorofenol y diversos grupos de plaguicidas (Bending *et al.*, 2002). Se ubican entre los mejores degradadores de lignocelulosa y son los únicos capaces de descomponer completamente la lignina a dióxido de carbono y agua (Lekounougou *et al.*, 2008).

En la década de los 80's se comenzaron a emplear los hongos de pudrición blanca en la decoloración de aguas residuales por su capacidad de degradar compuestos de compleja estructura molecular (Rodríguez *et al.*, 2006). La mayoría de los hongos capaces de producir enzimas necesarias para la degradación de los materiales lignocelulósicos pertenecen a basidiomicetos, ascomicetos o deuteromicetos (Chander *et al.*, 1997). Los basidiomicetos producen una amplia gama de productos naturales que abarca desde componentes estructurales con actividad antitumoral e inmunológicamente activos hasta agentes antimicrobianos, antifúngicos, antivirales, citostáticos, enzimas, reguladores de crecimiento y aromas (Brizuela *et al.*, 1998).

Su aplicación tecnológica en la limpieza de los contaminantes se inició en 1985 cuando se encontró que la especie *Phanerochaete chrysosporium* es capaz de metabolizar un número importante de contaminantes ambientales, a partir se están utilizando en sistemas de biorremediación (Fragoerio y Magan, 2008).

4.4.1. *Pleurotus ostreatus*

El género *Pleurotus* no requiere de un sustrato con selectividad química, ya que pueden crecer en medios nutritivos con una relación carbono:nitrógeno de amplio rango, pero si necesitan cierta selectividad biológica. La flora acompañante cuando existe debe ser protectora y no competitiva (Pardo *et al.*, 2008), porque un problema importante en la industria al momento de cultivarlo es la presencia de mohos antagonistas, los cuales avanzan rápidamente durante la colonización del sustrato, produciendo metabólicos que limitan o anulan el desarrollo del hongo (Salmones y Mata, 2007). Son un grupo con importantes propiedades medicinales y aplicaciones biotecnológicas en el medio ambiente (Mikiashvili *et al.*, 2006).

P. ostreatus ha sido consumido desde la antigüedad en diversas regiones de Europa, pero su cultivo industrial comenzó al final de la Segunda Guerra Mundial (Job, 2004). En México comenzó a cultivarse en 1974, en 1997 la producción se estimaba en 1,825 ton anuales (León-Monzón *et al.*, 2004), incrementándose a más de 5,000 ton anuales desde el año 2005 (Sánchez *et al.*, 2008).

La cepa ha mostrado excelentes resultados en el tratamiento y mejoramiento de residuos agroindustriales, porque reduce los niveles de lignina permitiendo usarlos eficientemente en la alimentación de rumiantes (Escalona *et al.*, 2001). Algunos estudios indican que el

tratamiento de materiales lignocelulósicos con *Pleurotus* ocasionan cambios en la composición química, reduciendo las fracciones de FDN, FDA, celulosa y hemicelulosa asociado a la producción de enzimas fibrolíticas (Marquez *et al.*, 2007). Las cinéticas de FS con *P. ostreatus* se han investigado básicamente para la caracterización de la delignificación, producción de fertilizantes orgánicos, mejoramiento de concentrados para rumiantes (Ramírez *et al.* 2003), capacidad de decolorar efluentes y degradar compuestos xenobióticos (Rodríguez *et al.*, 2006).

El género *Pleurotus* tiene la facilidad de crecer sobre una gran diversidad de residuos agroindustriales y sus cuerpos fructíferos tienen óptimas cualidades nutrimentales y organolépticas (Rodríguez *et al.*, 2006). El cuerpo fructífero del hongo contiene tiamina, riboflavina, niacina, ácido ascórbico, calcio, fósforo, de 8.9 a 38.7% de proteína, todos los aminoácidos esenciales y es bajo en ácidos grasos (Sánchez *et al.*, 2008). Por tanto, ha sido preferido por los productores de setas y se estima una producción mundial de 900,000 ton anuales, donde China produce 800,000 ton anuales (Ragunathan *et al.*, 1996).

4.4.2. *Fomes fomentarius*

Fomes fomentarius es un hongo basidiomiceto, generalmente se localiza en madera perenne en descomposición provocando la pudrición blanca. Es considerado como un patógeno que causa graves daños económicos en las explotaciones forestales. Es uno de los primeros hongos conocidos y explotados por el hombre. El hongo ha sido objeto de varias investigaciones: un estudio bajo condiciones de laboratorio en presencia de metales pesados, cuerpos fructíferos utilizados para la absorción de elementos, y bioabsorción de varios tintes de soluciones acuosas (Zizka y Gabriel, 2006).

Es un hongo de podredumbre blanca con aplicación en procesos biotecnológicos por su capacidad de degradar lignina (Jean-Marc y Andrzej, 1984; Reh *et al.*, 1986) dada su producción de lacasas en cultivos sumergidos (Neifar *et al.*, 2009). Así mismo la estructura química de la quinona es un factor de estrés oxidativo porque los metabolitos producidos durante la despolimerización de lignina incluyen compuestos fenólicos que son enzimáticamente convertidos en las quinonas correspondientes (Jaszek *et al.*, 2006).

El hongo *F. fomentarius* tiene amplia distribución, reportando su presencia en África, Asia, Europa y América del Norte. En Europa muestra variación morfológica intraespecífica y preferencias en la especialidad del hospedador (Schwarze, 1994), por lo que tiene una amplia gama de huéspedes *angiospermous* como abedules, robles, álamos, arces, calpes, olmos, etc (Ingold, 1965; Schwarze, 1994). Sus características macroscópicas son: cuerpos fructíferos perennes, sésiles, solitarios, adheridos al sustrato, la base tiene un basidiocarpo con base blanca y suave micelial moteado, olor agradable y sabor amargo. Por otro lado, sus características microscópicas son: basidioesoras oblongo-elipsoide, esporulación de los basidiocarpos de finales de primavera hasta principios del verano, basidios en forma de maza, urna con cuatro esterigmas, sin pinza basal, hifas generativas de paredes delgadas y septos con pinzas (Schwarze, 1994).

El cuerpo fructífero de *F. fomentarius* se denomina “mudi” en chino, quienes lo usan como medicina tradicional china desde hace siglos para el tratamiento de varias enfermedades: úlcera bucal, trastornos gastrointestinales, hepatocirrosis, inflamación y varios tipos de cáncer, además de efectos antioxidantes, antiinflamatorio, antitumoral y antidiabéticos (Wei *et al.*, 2008).

5. LITERATURA CITADA

- Aro N, Pakula T and Penttilä. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiol Rev.* 2005. 29:719-739.
- Asha P C and Prema P. Production of cellulose-free endoxylanase from novel alkalophilic thermotolerant *Bacillus pumilus* by solid-state fermentation and its application in wastepaper recycling. *Bioresour Technol.* 2007. 98: 485-490.
- Avando-Chacón S L y Waliszewski K N. Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. *Universidad y Ciencia.* 2005. 21(42):111-120.
- Baldrian P. Fungal laccases-occurrence and properties. *FEMS Microbiol Rev.* 2006. 30:215-242.
- Bending D G, Friloux M and Walker A. Degradation of contrasting pesticides by white rot fungi and its relationship with ligninolytic potential. *FEMS Microbiol Lett.* 2002. 212: 59-63.
- Bocchini D A, Oliveira O M M F, Gomes E and Da Silva R. Use of sugarcane bagasse and grass hydrolysates as carbon sources for xylanase production by *Bacillus circulans* D1 in submerged fermentation. *Process Biochem.* 2005. 40:3653-3659.
- Brizuela M A, García L, Pérez L y Mansur M. Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios. *Rev Iberoam Micol.* 1998. 15: 69-74.
- Cen P and Xia Liming. Production of cellulose by solid-state fermentation. *In: Recent Progress in bioconversion of lignocellulosics.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York. 1999: 70-92.
- Chander K R, Singh A and Eriksson K L. Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls. *Adv Biochem Eng/Biotechnol.* 1997. 57: 45-125.

- Church D C. El Rumiante: Fisiología Digestiva y Nutrición. Zaragoza, España. Ed. Acribia.1993. 309-312.
- Church D C, Pond K R y Pond W G. Fundamentos de Nutrición y Alimentación de Animales. 2ª Edición. México, D.F. Limusa. 2004:50-60.
- Colombatto D, Mould F L, Bhat M K and Owen E. Use de fibrolytic enzymes to improve the nutritive value of ruminant diets. A biochemical and *in vitro* rumen degradation assessment. Anim Feed Sci Technol. 2003. 107:201-209.
- Escalona C L, Ponce P I, Estrada M A, Solano S G, Ricardo S O y Cutiño E M. Cambios en la composición bromatológica del GANVER inoculado con una cepa de *Pleurotus ostreatus*. Rev Prod Anim. 2001. 13(1): 21-24.
- Flores F J A. Experiencia con la caña de azúcar integral en la alimentación animal en México. In: Memorias de una consulta de expertos de la FAO en Santo Domingo, República Dominicana. 1986. Revisado el 10/09/2009.
- Fragoero S and Magan N. Impact of *Trametes versicolor* and *Phanerochaete chrysosporium* on differential breakdown of pesticide mixtures in soil microcosms at two water potentials and associated respiration and enzyme activity. Int Biodeterior Biodegradation. 2008. 62: 376-383.
- Graminha E B N, Goncalves A Z L, Pirota R D P B, Balsalobre M A A, Da Silva R and Gomes E. Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. Anim Feed Sci Technol. 2008. 144:1-22.
- García T M A y Torres S R G. Producción de enzimas lignolíticas por basidiomicetes mediante la técnica de fermentación en sustrato sólido. Rev. Col. Biotech. 2003. V (001):56-64.

- Harris Jr B, Van Horn H H, Manookian K E, Marshall S P, Taylor M J and Wilcox C J. Sugarcane silage, sodium hydroxide and steam pressure-treated sugarcane bagasse, corns silage, cottonseed hulls, sodium bicarbonate and *Aspergillus oryzae* product in complete rations for lactating cows. J Dairy Sci. 1983. 66:1474-1485.
- Hassoun P, Geoffroy F, Saminadin G, Prior P and Beramis M. Studies on the ammoniation of sugarcane bagasse by urea. Effects of moisture, urea levels, urease source and treatment periods on composition, in vitro dry matter digestibility and evolution of ureolytic bacteria. Anim Feed Sci Technol. 1990. 29:113-129.
- Higueras P y Oyarzun R. Almacenamiento de residuos. 2009. Revisado el 14/09/09. <http://www.uclm.es>
- Ingold C T. *Fomes fomentarius* on beech in kent. Trans Brit Mycol Soc. 1965. 48(1): 81-82.
- Jaszek M, Zuchowski J, Dajczak E, Cimek K, Graz M and Grzywnowicz K. Ligninolytic enzymes can participate in a multiple response system to oxidative stress in white-rot basidiomycetes: *Fomes fomentarius* and *Tyromyces pubescens*. Int Biodeterior Biodegradation. 2006. 58: 168 – 175.
- Jean-Marc B and Andrzej L. Comparative studies of extracellular fungal laccases. Appl Environ Microbiol. 1984. 48:849-854.
- Job D. La utilización de la borra de café como substrato de base para el cultivo de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.:Fr.) Kummer. Rev Iberoam Micol. 2004. 21: 195-197.
- Jung H G and Allen M S. Characteristics of plant cell walls affecting intake and digestibility of forages by ruminants. J Anim Sci. 1995 73:2774-2790.
- Kamstra L D, Ronning D, Walker H G, Kohler G O and Wayman O. Delignification of fibrous wastes by peroxyacetic acid treatments. Anim Sci J. 1980. 50(1):153-159.

- Krishna C. Solid-state fermentation systems-An overview. *Crit Rev Biotechnol.* 2005. 25:1-30.
- Kumar D, Jain V K, Shanker G and Srivastava A. Citric acid production by solid state fermentation using sugarcane bagasse. *Process Biochem.* 2003. 38:1731-1738.
- Kumar S S, Sczakas G, Soccol C R & Pandey A. Production of enzymes by solid-state fermentation. *In: Current developments in solid-state fermentation.* Asiatech publishers, INC. 2008. 183-204.
- Lehninger A L. *Bioquímica. Las Bases Fundamentales de la Estructura y Función Celular.* 2ª edición. Barcelona, España. Omega. 1994. 298-323.
- Lekounnougou S, MOUNGUENGUI S, DUMARCAY S, ROSE C, COURTY PE, Garbaye J, *et al.* Initial stages of *Fagus sylvatica* wood colonization by the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor*: Enzymatic characterization. *Int Biodeterior Biodegradation.* 2008. 61: 287-293.
- León-Monzón J H, Sánchez J E y Nahed-Toral J. El cultivo de *Pleurotus ostreatus* en los altos de Chiapas, México. *Rev Mex Micol.* 2004. 18: 31-38.
- Liu C F, Sun R C, Qin M H, Zhang A P, Ren J L, Xu F, *et al.* Chemical modification of ultrasound-pretreated sugarcane bagasse with maleic anhydride. *Ind Crop Prod.* 2007. 26:212-219.
- Liu C F, Sun R C, Qin M H, Zhang A P, Ren J L, Ye J, *et al.* Succinylation of sugarcane bagasse under ultrasound irradiation. *Bioresour Technol.* 2008. 99:1465-1473.
- Loehr R C. Utilización de residuos agrícolas y agroindustriales. *In: Memorias de la utilización de residuos agrícola y agroindustriales en América Latina y el Caribe.* 1986. 23-32.
- Loera C O, Pérez P M C I, Barbosa R J R and Villaseñor O F. Laccases. *Adv Agric Food Biotechnol.* 2006:323-340.

- Loera C O and Villaseñor-Ortega F. Xylanases. *Adv Agric Food Biotechnol.* 2006: 305-322.
- Malherbe S & Cloete T E. Lignocellulose biodegradation: fundamentals and applications. *Rev Environ Sci Biotechnol.* 2002. 1:105-114.
- Márquez A A T, Mendoza M G D, González M S S, Buntins D S E y Loera C O. Actividad fibrolítica de enzimas producidas por *Trametes sp* EUM1, *Pleurotus ostreatus* IE8 y *Aspergillus niger* AD96.4 en fermentación sólida. *Interciencia.* 2007. 32(11):780-785.
- Marshall S P and Van Horn H H. Complete rations for dairy cattle. II. Sugarcane bagasse pellets as roughage in blended rations for lactating cows. *J Dairy Sci.* 1975. 58(6): 896-900.
- Martín P C. Bagazo como alimento para rumiantes. *In: Memorias de una consulta de expertos de la FAO en Santo Domingo, República Dominicana.* 1986. Revisado el 28/08/2009 (www.fao.org)
- Martínez A A. Crecimiento de borregos Pelibuey alimentados con rastrojo de maíz tratado con amoniaco anhidro. *Tec. Pec. Méx.* 1985. 48:54-59.
- Mathews C K and Van Holde K E. *Biochemistry.* USA. The Benjamin/Cummings Pub. 1996:60-90.
- Mayer A M and Staples R C. Laccase: new functions for and old enzyme. *Phytochemistry.* 2002. 60: 551-565.
- Maynard L A, Loosli J K, Hintz H F y Warner R G. *Nutrición Animal.* 4^a ed. Naucalpan, Estado de México. McGraw-Hill. 1981:35-45
- Mazutti M, Bender J P, Treichel H and Di Luccio M. Optimization of inulinase production by solid-state fermentation using sugarcane bagasse as substrate. *Enzyme Microb Technol.* 2006. 39:56-59.
- McAllister B H D, Jones G A and Cheng K J. Microbial attachment and feed digestion in the rumen. *J Anim Sci.* 1994. 72:3004-3018.
- Mc Donald P, Edwards R A y Greenhlgh J F D. *Nutrición Animal.* 4a edición. Zaragoza, España. Acribia. 1993.9-28.

- Mikiashvili N, Wasser S P, Nevo E and Elisashvili V. Effects of carbon and nitrogen sources on *Pleurotus ostreatus* ligninolytic enzyme activity. World J Microbiol Biotechnol. 2006. 22: 999-1002.
- Neifar M, Jaouani A, Ellouze-Ghorbel R, Ellouze-Chaabouni S and Penninckx M J. Effect of culturing processes and copper addition on laccase production by the white-rot fungus *Fomes fomentarius* MUCL 35117. Lett Appl Microbiol. 2009. 49: 73-78.
- Ortega M E, Serrano R y Ochoa P. Efecto del tratamiento con urea en la digestibilidad y composición química del bagazo de caña de azúcar. Rev cubana Cienc Agric. 1991. 25:269-273.
- Ovando-Chacon S L y Waliszewski K N. Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. Universidad y Ciencia. 2005. 21 (42): 111-120.
- Özköse E, Ekinci M S and Özcan N. Physiological studies on the plant cell wall degrading enzymes of the rumen bacterium *Ruminococcus flavefaciens*. Turk J Biol. 2001. 25: 113-122.
- Pandey A, Soccol C R, Nigam P and Soccol V T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. Bioresour Technol. 2000. 74: 69-80.
- Pandey A, Selvakumar P, Soccol C R and Nigam P. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. Curr Sci. 1999. 77 (1).
- Pardo G A, Perona Z M A y Pardo N J. Utilización de fibra de kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) en la elaboración de sustratos específicos para cultivo de *Pleurotus ostreatus* (Jacq. Ex Fr.) Kummer. Rev Iberam Micol. 2008. 25: 57-61.
- Ponce N T y Pérez A O. Celulasas y xilanasas en la industria. In: XXX Aniversario de Biotecnología y bioingeniería. Avance y Perspectiva. 2002. 21: 273-277.

- Pozdnyakova N N, Turkovskaya O V, Yudina E N and Radakiewicz-Nowak Y. Yellow laccase from the fungus *Pleurotus ostreatus* D1: purification and characterization. *Appl Biochem Microbiol.* 2006. 42(1):56-61.
- Ragunathan R, Gurusamy R, Palaniswamy M & Swaminathan K. Cultivation of *Pleurotus spp.* on various agro-residues. *Food Chem.* 1996. 55(2): 139-144.
- Raimbault M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electron J Biotechnol.* 1998. Revisado en septiembre de 2009.
- Ramírez N E, Vargas M C, Ariza J C y Martínez C. Caracterización de la lacasa obtenida por dos métodos de producción con *Pleurotus ostreatus*. *Rev Colombiana de Biotecnología.* 2003. 5(2): 64-72.
- Randel P F, Ramírez A, Carrero R and Valencia I. Alkali-treated and raw sugarcane bagasse as roughages in complete rations for lactating cows. *J Dairy Sci.* 1972. 55(10). 1492-1495.
- Randel P F. Bagasse complete rations employing urea or urea plus fishmeal as supplemental nitrogen sources. *J Dairy Sci.* 1970. 52(12):1722-1726.
- Reh U, Kraepelin G and Lamprecht I. Use of differential scanning calorimetry for structural analysis of fungally degraded wood. *Appl Environ Microbiol.* 1986. 52: 1101-1106.
- Rodríguez-Leon J A, Soccol C R, Pandey A & Rodríguez E D. Factor affecting solid-state fermentation. *In: Current developments in solid-state fermentation.* Asiatech publishers, INC. 2008. 26-47.
- Rodríguez C S, Rodríguez A, Paterson R R M, Lima N and Teixeira J A. Laccase activity from the fungus *Trametes hirsute* using an air-lift bioreactor. *Lett Appl Microbiol.* 2006. 42:612-616.
- Rodríguez P S, Bermúdez S R C, Serrat D M y Kourouma A. Selección de cepas de *Pleurotus ostreatus* para la decoloración de efluentes industriales. *Rev Mex Micol.* 2006. 23: 9-15.

- Roman-Ponce H, Van Horn H H, Marshall S P, Wilcox C J and Randel P F. Complete rations for dairy cattle. V. Interaction of sugarcane bagasse quantity and form with soybean meal, urea and starea. J Dairy Sci. 1975. 58(9): 1320-1327.
- SAGARPA. Aprovechamiento de esquilmos y subproductos en la alimentación del ganado. Subsecretaria de Desarrollo Rural. Consultado el 03/08/09. www.sagarpa.gob.mx
- Salmones D y Mata G. Determinación de la variabilidad de respuesta de micelios de *Pleurotus* vs *Trichoderma* en medios de cultivo con derivados solubles de lignina y pulpa de café. Rev Mex Micol. 2007. 25: 77-81.
- Sánchez A, Esqueda M, Gaitán-Hernández R, Córdova A y Coronado M L. Uso potencial de rastrojo de tomate como sustrato para el cultivo de *Pleurotus spp.* Rev Mex Micol. 2008. 28: 17-24.
- Schwarze F. Wood rotting fungi: *Fomes fomentarius* (L.: Fr.) Fr. 1994. 8(1): 32-34.
- SIAP_SAGARPA. Anuario de producción agrícola. 2009. Consultado el 23/12/2009. www.siap.gob.mx
- Singhanian R R, Soccol C R and Pandey A. Application of tropical agro-industrial residues as substrate for solid-state fermentation processes. In: Current developments in solid-state fermentation. Asiatech publishers, INC. 2008. 413:442.
- Suzuki T, Endo K, Ito M, Tsujibo H, Miyamoto K and Inamori Y. A thermostable laccase from *Streptomyces lavendulae* REN-7: Purification, characterization, nucleotide sequence and expression. Biosci Biotechnol Biochem. 2003. 67(10):2167-2175.
- UNC. Estadísticas de la caña de azúcar 2000-2009. Unión Nacional de Cañeros, A C- CNPR. 2009. Consultado el 14/09/09. www.caneros.org.mx

- Valáskova V and Baldrian P. Degradation of cellulose and hemicelluloses by the brown rot fungus *Piptoporus betulinus* production of extracellular enzymes and characterization of the major cellulases. *Microbiology*. 2006. 152: 3613-3622.
- Valls C and Roncero B M. Using both xylanase and laccase enzymes for pulp bleaching. *Bioresour Technol*. 2009. 100:2032-2039.
- Van Soest, P. J. *Nutritional Ecology of the ruminant*, 2^a. Ed., O & B Books, Corvallis, Oregon. 1994: 40-45.
- Wei C, Zhao Z, Shi-Fei C and Yong-Quan L. Optimization for the production of exopolysaccharide from *Fomes fomentarius* in submerged culture and its antitumor effect *in vitro*. *Bioresour Technol*. 2008. 99:3187-3194.
- Wilson D B and Irwin D C. Genetics and properties of cellulases. *In: Recent progress in bioconversion of lignocellulosics*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York. 1999: 2-21
- Yescas-Yescas R, Bárcena-Gama R, Mendoza-Martínez G D, González-Muñoz S S, Cobos-Peralta M y Ortega-Cerrilla M E. Digestibilidad *in situ* de dietas con rastrojo de maíz o paja de avena con enzimas fibrolíticas. *Agrociencia*. 2004. 38:23-31.
- Zizka Z and Gabriel J. Primary Fluorescence (Autofluorescence) of fruiting bodies of the wood-rotting fungus *Fomes fomentarius*. *Folia Microbiol*. 2006. 51(2): 109-113.

CAPÍTULO 1. ACTIVIDAD DE EXTRACTOS ENZIMÁTICOS DE *Pleurotus ostreatus*-IE8 y *Fomes fomentarius*-EUM1 CULTIVADOS EN BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR

1.1. INTRODUCCIÓN

La reducción de los costos por concepto de alimentación es un aspecto fundamental para incrementar la viabilidad de las unidades de producción pecuaria. El uso de subproductos agroindustriales de bajo precio y que cumplan con los requerimientos nutricionales mínimos es una alternativa. El bagazo de caña de azúcar es un subproducto obtenido tras la extracción del jugo. De la producción mundial de caña se obtienen aproximadamente 234 millones de toneladas anuales de bagazo (Chuan-Fu *et al.*, 2007). La composición del bagazo (base seca) es: 42% celulosa, 22% lignina, 28% hemicelulosa y 8% entre ácidos orgánicos y otros compuestos (Beukes *et al.*, 2008). Químicamente contiene alrededor de 50% α -celulosa, 30% pentosas y 2.4% cenizas. Por su bajo contenido de cenizas ofrece ventajas en comparación de otros residuos como pajas de arroz y trigo (17.5 y 11.0 por ciento de cenizas, respectivamente) en procesos de bioconversión usando bacterias, levaduras y hongos (Pandey *et al.*, 2000).

Un método de bioconversión es la fermentación sólida (FS), definida como el cultivo de microorganismos en sustrato sólido húmedo, en soportes sólidos inertes o insolubles que aportan fuente de carbono y energía (Hölker *et al.*, 2004). El bagazo de caña de azúcar en procesos de FS se usa como fuente de carbono de donde se han obtenido enzimas celulasas y xilanasas a partir de basidiomicetos, lacasas y Mn-peroxidasas de *Trametes versicolor*, xilanasas de *Aspergillus niger* o *A. phoenicis* y fenoloxidasas de *Flammulina velutipes* y hongos de pudrición blanca. El bagazo de caña de azúcar también se emplea como material inerte y

puede impregnarse de nutrientes solubles (medio líquido) para obtener: ácidos orgánicos (glutámico, láctico y cítrico), penicilina y etanol (Pandey *et al.*, 2000).

El objetivo del presente estudio fue producir extractos fúngicos fibrolíticos obtenidos por FS en bagazo de caña de azúcar, evaluar la actividad enzimática fibrolítica de los extractos de *Pleurotus ostreatus*-IE8 y *Fomes fomentarius*-EUM1 y seleccionar la mejor cepa productora de xilanasas y lacasas.

1.2. MATERIALES Y MÉTODOS

1.2.1. Microorganismos experimentales

Se utilizaron las especies de *Pleurotus ostreatus*-IE8 donada por el Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada de Puebla; y *Fomes fomentarius*-EUM1 proporcionada por la Universidad Autónoma Metropolitana.

El estudio se realizó en el Laboratorio de Microbiología Pecuaria del Departamento de Zootecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, Km. 38.5 carretera México-Texcoco, Chapingo, Estado de México. C.P. 56230.

1.2.2. Medios de cultivo

Para la reactivación y propagación de las especies fúngicas se uso el medio de cultivo agar-extracto de malta (CINVESTAV, 2009), disolviendo 20 g de extracto de malta, 5 g de peptona de caseína y 15 g de agar-agar en 1 L de agua destilada.

Para determinar la velocidad de crecimiento radial (V_{cr} ; mm h⁻¹) y biomasa de los hongos, se elaboraron dos medios de cultivo (Cuadro 1.1)

a base de extracto de bagazo de caña de azúcar (EB). El EB se obtuvo hirviendo 100 g de bagazo de caña de azúcar en 1 L de agua destilada durante 30 min, en un recipiente con tapa para reducir la pérdida de agua por evaporación. El extracto se filtró y el material fibroso se desechó.

Cuadro 1.1. Medios de cultivo usados para la medición de Vcr y biomasa.

Medio	Fuente de carbono	Fuente de nitrógeno
Medio con proteína	Extracto de bagazo	Peptona de caseína (5 gL ⁻¹)
Medio sin proteína	de caña de azúcar	Sin Peptona de caseína

Nota: Se le adicionó 15 gL⁻¹ de agar-agar a cada medio.

1.2.4. Velocidad de crecimiento radial (Vcr) y biomasa

Se colocó micelio de cada microorganismo (1 cm de diámetro) obtenido de un disco con medio de cultivo agar-extracto de malta en el centro de una caja petri con medio de cultivo con o sin peptona de caseína (Cuadro 1.1). Las cajas inoculadas se incubaron a 25 °C (\pm 0.5) para *P. ostreatus*-IE8 (Lang *et al.*, 1997) o 36 °C (\pm 0.5) para *F. fomentarius*-EUM1. La Vcr de las cepas se midió con un vernier cada 24 h a partir del día 2 hasta el día 7 de incubación, tomando al menos 2 medidas en diferente dirección. Con los datos de tiempo y diámetro se obtuvo la regresión y la pendiente representó la Vcr (Trinci, 1969).

Transcurridos 7 d de incubación, el contenido de la caja petri se colocó en un vaso de precipitados conteniendo 200 mL de agua corriente, se calentó durante 4 minutos en un horno de microondas domestico (LG MS-1742DP), y se filtró en papel filtro Whatman (No. 541) con una bomba de vacío. El residuo se lavó con 100 mL de agua potable caliente para eliminar los posibles residuos de agar que estuviesen adheridos al

micelio. Finalmente la biomasa obtenida se secó por 24 h a 60 °C y se pesó.

1.2.4.1. Análisis estadístico para Vcr y biomasa

Se utilizó un arreglo factorial 2² en un diseño completamente al azar con 10 muestras independientes en cada interacción. Para el análisis de la varianza se usó el procedimiento GLM de SAS® (2000) y para la comparación múltiple de medias la prueba de Tukey con $\alpha=0.05$ como nivel para establecer una diferencia mínima significativa. El modelo estadístico fue:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + AB_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = Variable de respuesta en el i-ésimo nivel de A y j-ésimo nivel de B, en la repetición k

μ = Media general.

A_i =Efecto del i-ésimo tipo de hongo.

B_j = Efecto del j-ésimo medio de cultivo.

AB_{ij} = Efecto de la interacción entre tipo de hongo y medio de cultivo.

ε_{ijk} = Error aleatorio, el cual se supone normalmente distribuido con media 0 y varianza σ^2 .

1.2.5. Preparación del sustrato para fermentación sólida

Se usó el bagazo de caña de azúcar como sustrato para la FS, molido en molino convencional con malla de 0.5 cm Ø. En un matraz Erlenmeyer se colocaron 6.5 g de bagazo y se adicionaron 33.5 g de agua destilada, la cual se esparció y agitó para obtener una humedad homogénea de 85% en el contenido del matraz, éste fue tapado con algodón y papel aluminio, y se esterilizó durante 15 min a 15 PSI y 121 °C.

Posteriormente, cada matraz fue inoculado con 10 cilindros de agar-extracto de malta con micelio (1 cm diámetro) y se incubaron a 25 °C (\pm 0.5) los matraces inoculados con *P. ostreatus*-IE8 (Lang *et al.*, 1997) o 36 °C (\pm 0.5) los inoculados con *F. fomentarius*-EUM1. Cuatro matraces por hongo se retiraron de la incubadora a los 0, 7 y 15 d.

1.2.6. Extracción de enzimas fibrolíticas fúngicas

Para cada tiempo de FS (0, 7 y 15 d) el contenido de cada matraz se extrajo y depositó en un mortero con agua destilada en relación 1:1.5, se maceró por 20 min, se filtró a través de gasa y se prensó manualmente para obtener el extracto crudo enzimático (ECE). El ECE se centrifugó a 12,000 rpm y 4 °C durante 20 min. Al sobrenadante se le cuantificó la actividad enzimática de xilanasas, celulasas, lacasas y proteína extracelular.

1.2.6.1. Actividad enzimática de Xilanasas

La actividad de xilanasas se determinó por el método de detección de azúcares reductores utilizando el reactivo DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) como agente reductor (Miller, 1959). Cada muestra se cuantificó por duplicado (Cuadro 1.2).

Cuadro 1.2. Metodología para determinar xilanasas.

Reactivo	Muestra	Blanco individual	Blanco general
Agua destilada (mL)	0.0	0.0	1.0
Solución xilan 0.5% (mL)	0.9	0.9	0.0
ECE (mL)	0.1	0.0	0.0
Incubación por 5 min/ 50 °C en baño maría			
DNS (mL)	1.5	1.5	1.5
ECE	0.0	0.1	0.0
Ebullición por 5 min en baño maría e inmediatamente se colocó en hielo			

El color desarrollado por la reacción se midió por absorbancia a 540 nm, con un espectrofotómetro (Perkin Elmer UV/VIS). La curva patrón de xilosa se muestra en anexo I. La actividad enzimática se expresó en unidades internacionales (UI) por gramo de sustrato seco inicial (SSi), donde una UI se definió como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de xilosa por min en las condiciones de reacción indicadas.

1.2.6.2. Actividad enzimática de Lacasas

La cuantificación de la actividad enzimática lacasa se determinó usando como sustrato ABTS (2,2' azino-bis [3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico], $\epsilon_{420\text{nm}}=36,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) según Bressler *et al.* (2000) (Cuadro 1.3). La absorbancia se midió cada 30 segundos durante 5 min a 420 nm con un espectrofotómetro (Perkin Elmer UV/VIS).

Cuadro 1.3. Metodología para determinar lacasas.

Reactivo	Muestra	Blanco general
ECE (mL)	0.2	0.0
Agua destilada (mL)	1.6	1.8
Incubación por 1 min/40 °C en baño maría		
ABTS	0.2	0.2

1.2.6.3. Actividad enzimática de Celulasas

La metodología para determinar la actividad celulásica fue la descrita en el apartado de xilanasas (1.2.6.1), pero a 50 °C durante 60 min y el sustrato usado fue carboximetilcelulosa (0.5%) disuelto en amortiguador de citratos (pH 4.8-50 mM). La curva patrón de glucosa se presenta en anexo I. Los resultados se expresaron en unidades internacionales por gramo de sustrato seco inicial (UI/g SSi), donde UI se definió como la cantidad de enzima que libera 1 $\mu\text{mol min}^{-1}$ de glucosa en las condiciones de reacción mencionadas.

1.2.6.4. Determinación de proteína extracelular

Se utilizó el método de Bradford (1976) para lo cual a 1.6 mL de ECE se le adicionaron 0.4 mL de reactivo de Bradford (Sigma Aldrich). El color desarrollado se midió por absorbancia a 595 nm con un espectrofotómetro (Perkin Elmer UV/VIS). La curva patrón se presenta en anexo I.

1.2.6.5. Análisis estadístico para evaluar actividad enzimática

Para el análisis estadístico de xilanasas, lacasas, celulasas y proteína extracelular se utilizó un diseño en parcelas divididas en el tiempo, con cepa como parcela grande y tiempo de fermentación como parcela chica, usando el procedimiento GLM de SAS® (2000). El modelo estadístico fue:

$$Y_{ijk} = \mu + C_i + \delta_{ij} + D_k + (CB)_{ik} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = Variable de respuesta

μ = Media general

A_i = Efecto de la Cepa en su nivel i

δ_{ij} = Error asociado con Cepa, $E(C)$.

B_k = Efecto del Día al nivel k

$(AB)_{ik}$ = Efecto de la interacción Cepa*Día al nivel i, k

ε_{ijk} = Error aleatorio asociado con Día, $E(D)$.

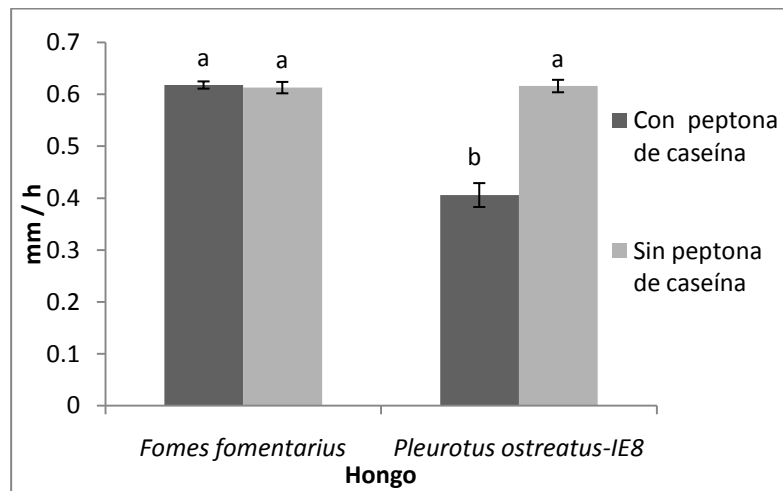
1.3. RESULTADOS

1.3.1. Vcr y producción de biomasa

La Vcr se esquematiza en la Figura 1.1. Se encontró interacción entre medio de cultivo y tipo de hongo ($p \leq 0.05$) en la Vcr. La Vcr dependió del hongo y la adición de peptona de caseína al medio de cultivo. *F. fomentarius*-EUM1 no modificó ($p > 0.05$) su Vcr con la adición de

peptona, pero éste mismo sustrato causa que la Vcr de *P. ostreatus*-IE8 sea menor ($p \leq 0.05$).

La biomasa cosechada para cada hongo a los 7 d de incubación se muestra en el Cuadro 1.4. La producción de biomasa no presentó interacción ($p > 0.05$) hongo por peptona de caseína. No se encontró efecto de la peptona de caseína ($p > 0.05$) en la producción de biomasa. Por el contrario, la biomasa producida por *F. fomentarius*-EUM1 (51.0 mg) fue mayor ($p \leq 0.05$) a la producida por *P. ostreatus*-IE8 (35.6 mg).



Columnas con diferente literal son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$)

Figura 1.1. Vcr de *P. ostreatus*-IE8 y *F. fomentarius*-EUM1 en medios de cultivo con EB y peptona de caseína como fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente.

Cuadro 1.4. Producción de biomasa por hongo y medios de cultivo

Hongo	Biomasa (mg)	Medio	Biomasa (mg)
<i>P. ostreatus</i> - IE8	35.6 ^a (8.95)*	EB	41.7 ^a (10.28)
<i>F. fomentarius</i> - EUM1	51.0 ^b (10.56)	EB + peptona de caseína	43.4 ^a (14.14)

Medias con diferente literal por columna son diferentes ($p \leq 0.05$); * desviación estándar

1.3.2. Producción de enzimas fibrolíticas y proteína extracelular

Se encontró interacción ($p \leq 0.05$) entre cepa y tiempo de fermentación en actividad enzimática (xilanasas, celulasas y lacasas) y proteína extracelular, por lo que su producción dependió del tipo de cepa y tiempo de fermentación sólida. En el Cuadro 1.5 se muestran las UI de actividad de xilanasas, celulasas y lacasas, además los mg de proteína extracelular en el ECE del cultivo en bagazo de caña, de *P. ostreatus*-IE8 y *F. fomentarius*-EUM1. La actividad xilanásica mostró una tendencia cuadrática con respecto al tiempo de incubación, y fue mayor ($p \leq 0.05$) al día 7 de fermentación. En el día 15 de crecimiento la actividad disminuyó, pero la disminución fue más drástica para *P. ostreatus*-IE8 de manera que hubo diferencia entre cepas ($p \leq 0.05$).

En la actividad de celulasas, *P. ostreatus*-IE8 no mostro diferencia ($p \leq 0.05$) respecto al tiempo de incubación y en general su actividad celulolítica fue menor a *F. fomentarius*-EUM1 (Cuadro 1.5). El ECE de este hongo mostró la mayor actividad celulolítica ($1.90 \text{ UI g SSi}^{-1}$) al día 7 de FS.

Cuadro 1.5. Actividad enzimática y proteína extracelular en extractos de *P. ostreatus*-IE8 y *F. fomentarius*-EUM1 en bagazo de caña de azúcar

Cepa	Día FS	Xilanasas	Lacasas (UI/ g SSi)	Celulasas	Proteína (mg / g SSi)
<i>F. fomentarius</i> - EUM1	0	4.24 ^{cd} (0.328)*	0.70 ^c (0.544)	0.43 ^c (0.062)	0.18 ^{cd} (0.027)
	7	5.50 ^{ab} (0.670)	0.96 ^c (0.096)	1.90 ^a (0.126)	0.39 ^b (0.052)
	15	4.85 ^{bc} (0.340)	4.52 ^b (0.612)	1.33 ^b (0.284)	0.38 ^b (0.080)
<i>P. ostreatus</i> - IE8	0	4.05 ^{cd} (0.127)	0.00 ^c (0.000)	0.39 ^c (0.007)	0.23 ^c (0.005)
	7	6.32 ^a (0.199)	10.65 ^a (0.982)	0.55 ^c (0.015)	0.52 ^a (0.012)
	15	3.53 ^d (0.428)	0.17 ^c (0.005)	0.30 ^c (0.056)	0.11 ^d (0.004)

Medias con diferente literal dentro de columnas son diferentes ($p \leq 0.05$); * desviación estándar

La mayor ($p \leq 0.05$) actividad de lacasas se obtuvo con ECE de *P. ostreatus*-IE8 (10.65 UI g SSi⁻¹) al día 7 de FS. *F. fomentarius*-EUM1 mostró su mayor actividad lacasa (4.52 UI g SSi⁻¹) al día 15 de fermentación, aunque menor a *P. ostreatus*-IE8.

La mayor producción de proteína extracelular se dio al 7 d de FS para ambos hongos ($p \leq 0.05$), coincidiendo con la mayor producción enzimática, ya que las enzimas son proteínas. El comportamiento de *P. ostreatus*-IE8 en el tiempo de FS presentó un incremento al 7 d (0.52 mg g SSi⁻¹) disminuyendo drásticamente al 15 d (0.41 mg g SSi⁻¹); y *F. fomentarius*-EUM1 cuantificó la mayor producción al 7d (0.39 mg g SSi⁻¹), pero manteniéndose durante los siguientes días de FS ($p > 0.05$), concordando con la actividad enzimática de cada hongo.

1.4. DISCUSIÓN

Probablemente la inhibición de la Vcr de *P. ostreatus*-IE8 en el medio EB con peptona de caseína se deba a que no requiere de una fuente externa de nitrógeno para su crecimiento en medios con fuente de carbono (Luna, 2007). Membrillo (2008) usando urea y sulfato de amonio en medios con extracto de malta reportó 0.234 y 0.308 mm h⁻¹, valores inferiores al presente estudio, mientras Luna (2007) no encontró diferencias entre las diversas fuentes de nitrógeno (urea y sulfato de amonio) y el testigo en medios con extracto de rastrojo de cebada.

La determinación de biomasa y Vcr en extractos de residuos agroindustriales y agrícolas han generado variación de resultados por el tipo de microorganismos, cepa, tipo de sustrato, temperatura, niveles y/o fuentes de nitrógeno, usados en las mediciones (Márquez *et al.*, 2007;

Luna, 2007; Membrillo, 2008; Ordaz, 2008). Las cepas de *P. ostreatus* tienen la cualidad de producir mayor cantidad de biomasa cuando el sustrato está esterilizado y aumenta la producción de biomasa conforme pasa el tiempo de incubación (Fountoulakis *et al.*, 2002; según Avila, 2005). Luna (2007) y Membrillo (2008) determinaron una biomasa de 328 y 8 mg gss⁻¹ y una Vcr de 0.610 y 0.043 mm h⁻¹, respectivamente, para *P. ostreatus*-IE8. Luna (2007) utilizó paja de cebada a temperatura ambiente, mientras Membrillo (2008) usó bagazo de caña de azúcar incubado a 29.5 °C.

La actividad enzimática encontrada al día 0 de FS puede deberse a que el micelio inoculado excreta las enzimas previamente sintetizadas durante su activación, esta actividad se consideró una expresión basal de las enzimas para iniciar la hidrólisis del sustrato (Ordaz, 2008). Por otro lado, los basidiomicetos (*P. ostreatus* y *F. fomentarius*) producen simultáneamente enzimas hidrolíticas y lignolíticas al cultivarlos en sustrato sólido (Elisashvili *et al.*, 2008).

Un aspecto importante en la producción de enzimas por hongos cultivados en FS, es el tamaño de partícula del sustrato, las partículas pequeñas favorecen la actividad de celulasas y xilanasas, mientras partículas grandes favorecen la de lacasas (Membrillo, 2008; Ordaz, 2008). Posiblemente, el tamaño de partícula de 0.5 cm Ø y la cantidad de lignina en el bagazo, usados en el presente estudio favoreció la producción de lacasas, seguido de xilanasas (Cuadro 1.5).

La actividad xilanásica de *Aspergillus* sp. en FS sobre una variedad de sustratos es superior a la actividad obtenida en el presente estudio (Shah y Madamwar, 2005; Park *et al.*, 2002; Loera y Córdova, 2003); aunque Membrillo (2008) cultivó *P. ostreatus*-IE8 en bagazo de caña de azúcar

(2.9 mm Ø, 80% humedad y 29.5 °C de incubación), reportando al día 8 de FS valores de 5.79 UI g SSi⁻¹ de actividad xilanásica, valor similar al determinado en el presente estudio. Por el contrario Luna (2007) encontró mayor actividad xilanásica (80.51 UI g SSi⁻¹) y celulásica (15.95 UI g SSi⁻¹) con el mismo hongo, aunque las condiciones de humedad fueron similares, el sustrato fue paja de cebada y el tiempo de fermentación fueron 12 y 8 días, respectivamente.

Respecto a *F. fomentarius*-EUM1 antes conocido como *Trametes* sp.-EUM1, Ordaz (2008) cuantificó actividad xilanásica (80.6 UI g SSi⁻¹), celulolítica (42.22 UI g SSi⁻¹) y lacásica (10.20 UI g SSi⁻¹) en rastrojo de maíz a 35 °C de incubación y 7 d de FS. Igualmente, Márquez *et al.* (2007) encontraron mayor actividad de xilanasas (147.27 UI g SSi⁻¹) y celulasas (8.51 UI g SSi⁻¹), que en la presente investigación (Cuadro 1.5), pero menor en lacasas (3.45 UI g SSi⁻¹) usando bagazo de caña de azúcar (0.5-1 cm Ø, 80% humedad y 34 °C) en 14 d de FS. La producción, tipo y actividad de enzimas fibrolíticas varían en función de la cepa microbiana, condiciones de cultivo y tiempo empleado en la FS (Park *et al.*, 2002; Nsereko *et al.*, 2000; Kurman *et al.*, 2008); además de las características nutritivas de los sustratos, ya que la paja de cebada y rastrojo de maíz son nutritivamente mejores que el bagazo de caña de azúcar (Luna, 2007; Ordaz, 2008).

Los resultados de la presente investigación muestran que la mayor actividad enzimática fibrolítica se presentó al 7 d de FS. *P. ostreatus*-IE8 fue mejor que *F. fomentarius*-EUM1 en la producción de lacasas y xilanasas, debido a que el bagazo de caña de azúcar tiene una fracción abundante de lignina en su superficie (Membrillo, 2008) que favoreció su producción.

1.5. CONCLUSIONES

- ❖ *Fomes fomentarius*-EUM1 no requiere de una fuente nitrogenada para acelerar su Vcr en un medio de cultivo de EB; mientras en *Pleurotus ostreatus*-IE8 al adicionar peptona de caseína a su medio de cultivo reduce su crecimiento, estimado a partir de biomasa y velocidad de crecimiento radial.
- ❖ La producción de biomasa en un medio de cultivo EB, no se afecta al agregar peptona de caseína como fuente de nitrógeno; por otra parte, *Fomes fomentarius*-EUM1 produce mayor biomasa seca que *Pleurotus ostreatus*-IE8.
- ❖ La mayor actividad enzimática para ambos hongos se observó el día 7 de fermentación sólida para las enzimas xilanasas y lacasas; con una mayor acumulación de proteína extracelular.
- ❖ Ambos hongos producen cantidades similares de xilanasas. *Pleurotus ostreatus*-IE8 fue mejor productor de lacasas y proteína extracelular, mientras que *Fomes fomentarius*-EUM1 produce mayor cantidad de celulasas.
- ❖ *Pleurotus ostreatus*-IE8 se eligió para el siguiente estudio porque presentó la mayor producción de lacasas y xilanasas en bagazo de caña de azúcar, mismo que presenta gran cantidad de componentes ligninocelulolíticos.

1.6. LITERATURA CITADA

- Avila Mayo H. Enzimas fibrolíticas de *Pleurotus ostreatus* y su actividad en rastrojo de maíz. Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Estado de México. 2005.
- Beukes N, Chan H, Doi R D and Pletschke B. I. Synergistic associations between *Clostridium cellulovorans* enzymes XynA, ManA EngE against sugarcane bagasse. *Enzyme Microb Technol.* 2008. 42: 492-498.
- Bradford M M. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976. 72: 248-254.
- Bressler D C, Fedorak P M and Pickerd M A. Oxidation of carbazole, N-ethylcarbazote, fluorine, and dibenzothiophene by the laccase of *Coriopsis gallica*. *Biotechnol Lett.* 2000. 22:1119-1125.
- Chuan-Fu L, Run-Cang S, Meg-Hua Q, Ai-Ping Z, Jui-Li R, Feng X, *et al.* Chemical modification of ultrasound-petreated sugarcane bagasse with maleic anhydride. *Ind Crop Prod.* 2007. 26: 212-219.
- CINVESTAV. 2009. Colección nacional de cepas microbianas y cultivos celulares. Consultado: 17/11/2009. En: <http://www.cinvestav.mx/cgse/uscncmcc/>
- Elisashvili V, Kachlishvili E and Penninckx M. Effect of growth substrate, method of fermentation, and nitrogen source on lignocelluloses-degrading enzymes production by white-rot basidiomycetes. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2008. 35:1531-1538.
- Hölker U, Höfer M and Lenz J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2004. 64:175-186.
- Kumar S S, Sczakas G, Soccol C. R & Padey A. Production of enzymes by solid-state fermentation *in* *Current Developments in solid-state fermentation.* Ed. Springer New York. 2008. Pp: 183-204.

- Lang E, Kleeberg I and Zadrazil F. Competition of *Pleurotus sp.* and *Dichomitus squalens* with soil microorganism during lignocelluloses decomposition. *Bioresour Technol.* 1997. 60: 95-99.
- Loera O and Córdova J. Improvement of xylanase production by a parasexual cross between *Aspergillus niger* strains. *Braz Arch Biol Technol.* 2003. 46(2):177-181.
- Luna Rodríguez L. Estudio de la actividad lignocelulósica del hongo *Pleurotus ostreatus* sobre el rastrojo de cebada. Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Estado de México. 2007.
- Márquez A A T, Mendoza M G D, González M S S, Buntins D S E y Loera C O. Actividad fibrolítica de enzimas producidas por *Trametes sp* EUM1, *Pleurotus ostreatus* IE8 y *Aspergillus niger* AD96.4 en fermentación sólida. *Interciencia.* 2007. 32(11):780-785.
- Membrillo Venegas I. Efecto de la tipificación del bagazo de caña sobre el perfil de producción de enzimas lignocelulolíticas de *Pleurotus ostreatus*. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana. Ciudad de México, México. 2008.
- Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Biochem.* 1959. 31 (3): 426-428.
- Nsereko V L, Morgavi D P, Rode L M, Beauchemin K A and McAllister T A. Effects of fungal enzyme preparations on hydrolysis and subsequent degradation of alfalfa hay fiber by mixed rumen microorganisms *in vitro*. *Anim Feed Sci Technol.* 2000. 88:153-170.
- Ordaz Hernández A. Efecto de la temperatura en la producción de enzimas lignocelulolíticas por *Trametes sp.* EUM1 en cultivo solido. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana. Ciudad de México, México. 2008.

- Pandey A, Soccol C R, Nigam P and Soccol V T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. *Bioresour Technol.* 2000. 74: 69-80.
- Park Y S, Kang S W, Lee J S, Hong S I and Kim S W. Xylanase Production in solid state fermentation by *Aspergillus niger* mutant using statistical experimental designs. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2002. 58:761-766.
- SAS. SAS/STAT Guide for personal computer. Vers. 8. SAS Institute Cary, NC. USA. 2000.
- Shah R A and Madamwar D. Xylanase production under solid-state fermentation and its characterization by an isolated strain of *Aspergillus foetidus* in India. *World J. Microbiol Biotechnol.* 2005. 21:233-243.
- Trinci A P J. A kinetic study of the growth of *Aspergillus nidulans* and other fungi. *J. Gen. Microbiol.* 1969. 57:11-24.

CAPÍTULO 2. COMPOSICIÓN BROMATOLÓGICA DEL BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR FERMENTADO POR *Pleurotus ostreatus*-IE8

2.1. INTRODUCCIÓN

El bagazo de caña se compone principalmente, entre otras sustancias, de celulosa, hemicelulosa y lignina, lo que repercute en una digestión ruminal relativamente lenta e incompleta, su valor nutritivo para rumiantes es bajo y su inclusión como ingrediente en dietas aumenta los costos de producción. Diversas investigaciones se han enfocado en elevar su digestibilidad usando tratamientos químicos y físicos, adición de ingredientes que eleven su degradación, y también con pre-tratamientos con hongos de pudrición blanca mediante fermentación sólida (FS) que sintetizan enzimas fibrolíticas fúngicas (Okano *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2002).

Las enzimas fibrolíticas producidas en FS son utilizadas en la despolimerización parcial de residuos fibrosos agroindustriales para la alimentación animal (Graminha *et al.*, 2008). Durante este proceso la celulosa y hemicelulosa son hidrolizados a azúcares solubles por acción de celulasas y xilanasas (Beauchemin *et al.*, 2003). La lignina es un polímero formado de tres derivados de fenilpropano (alcohol coniferílico, alcohol sinapílico y alcohol p-cumaril; Jung y Allen, 1995) y es hidrolizada por las lacasas (Liu *et al.*, 2008). Los principales cambios nutricionales de residuos fibrosos agroindustriales por FS son: aumento de 10-15% en la proporción de la proteína, incremento de digestibilidad, reducción de la concentración de FDN, FDA y hemicelulosa (Graminha *et al.*, 2008).

El género *Pleurotus* se utiliza en FS por su flexibilidad en requerimientos ambientales y temperatura. Además ha mostrado excelentes resultados

en el tratamiento y mejoramiento de residuos agroindustriales, ya que reduce los niveles de lignina (Escalona *et al.*, 2001). Algunos estudios indican que el tratamiento de materiales lignocelulósicos con *Pleurotus* ocasionan cambios en la composición química, reduciendo las fracciones de FDN, FDA, celulosa y hemicelulosa asociado a la producción de enzimas fibrolíticas (Marquez *et al.*, 2007). Se estima que la producción mundial oscila en 900,000 ton por año, de los cuales China produce 88.8% (Ragunathan *et al.*, 1996). *P. ostreatus* es un prospecto para evaluarlo como fuente de proteína en alimentación animal y como organismo para procesos de bioconversión de residuos lignocelulolíticos (Wang *et al.*, 2001).

El objetivo de este experimento fue cuantificar cambios en la composición de fibra y proteína total (PT) del bagazo de caña de azúcar y determinar la actividad de xilanasas, celulasas y lacasas durante una FS inoculada con IE8 de *P. ostreatus*. Además, establecer el mejor tiempo de FS para la producción de xilanasas y lacasas.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. Microorganismo experimental

Se usó *P. ostreatus* cepa IE8 donado por el Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada de Puebla. El estudio se realizó en el Laboratorio de Microbiología del Departamento de Zootecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, Km. 38.5 carretera México-Texcoco, Chapingo, Estado de México. C.P. 56230.

2.2.2. Propagación de la cepa

El hongo fue propagado en un medio de cultivo agar-extracto de malta, formulado con extracto de malta (20 g L⁻¹), peptona de caseína (5 g L⁻¹) y agar-agar (15 g L⁻¹; CINVESTAV, 2009). Se colocó agar- micelio (1 cm Ø)

(apartado 1.2.2) en el centro de una caja petri y se incubó a 25 °C (\pm 0.5) (Lang *et al.*, 1997)

2.2.3. Preparación del inóculo

El hongo cultivado en agar-extracto de malta se usó para inocular, con 8 discos de agar-micelio (1.5 cm Ø) el sustrato de sorgo-bagazo de caña durante 15 d a 25 °C. Este sustrato se preparó de la siguiente manera: el sorgo se enjuagó con agua corriente, se hirvió 15 min y se dejó escurrir para eliminar el exceso de agua. Se combinó sorgo entero (65%), sorgo quebrado (15%) y bagazo de caña de azúcar (20% con 85% de humedad). La mezcla se colocó en un matraz erlenmeyer de 500 mL ($\frac{3}{4}$ partes de su capacidad), tapándolo con algodón y papel aluminio para esterilizarlo 40 min (15 PSI y 121 °C). Se enfrió a temperatura ambiente y agitó fuertemente para favorecer aireación entre partículas.

2.2.4. Preparación del sustrato para FS

En la FS se utilizó bagazo de caña de azúcar (85% de humedad) esterilizado (15 min, 15 PSI y 121 °C) tal cual provenía del ingenio. Se colocaron 50 g de bagazo y 2.5 g de inóculo en una bolsa hermética. Las bolsas se incubaron a 25 °C (\pm 0.5; Lang *et al.*, 1997) y se retiraron a los 0, 3, 5 y 7 d de FS para cuantificarles la actividad enzimática y analizarlas bromatológicamente.

2.2.5. Extracción de enzimas fibrolíticas fúngicas y determinación de proteína extracelular

La metodología de extracción de enzimas fibrolíticas fúngicas, medición de la actividad de xilanasas, lacasas y celulasas, así como la determinación de proteína extracelular es la descrita en los apartados 1.2.6, 1.2.6.1, 1.2.6.2, 1.2.6.3 y 1.2.7, del capítulo anterior. Las curvas patrón de xilanasas, celulasas y proteína extracelular se muestran en anexo III

2.2.6. Análisis bromatológico

Se determinaron MS, cenizas, MO, PT, hemicelulosa, celulosa (AOAC, 2007), FDN, FDA (ANKOM Technology Method) y LDA (Sosa, 1979)

2.2.7. Análisis estadístico

Se analizó a los 0, 3, 5 y 7 d de FS en muestras independientes, cada tiempo consistió de 5 bolsas o repeticiones. Para el análisis estadístico se utilizó el procedimiento GLM de SAS® y la comparación múltiple de medias fue con el método de Tukey ($\alpha=0.05$). El modelo estadístico fue:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

Y_{ijk} = Variable de respuesta en el i-ésimo día y j-ésima repetición.

μ = Media general.

τ_i =Efecto del i-ésimo día.

ε_{ij} = Error aleatorio, el cual se supone normalmente distribuido con media 0 y varianza σ^2 .

Se calcularon coeficientes de correlación entre los componentes químicos y la producción de enzimas mediante el procedimiento CORR de SAS (2000).

2.3. RESULTADOS

2.3.1. Actividad enzimática y proteína extracelular

De acuerdo a los resultados presentados en el cuadro 2.1, la mayor actividad xilanásica se obtuvo al 7 d de fermentación (11.78 UI g SSi⁻¹), presentando diferencias con el resto de los días medidos ($p \leq 0.05$).

En la cuantificación de celulasas, la mayor producción se obtuvo a 5 d de FS (0.57 UI g SSi⁻¹), presentando diferencias ($p \leq 0.05$) con 0, 3 y 7 d de

FS, entre estos últimos no hubo diferencias ($p>0.05$). Para actividad lacásica todos los días de FS presentaron diferencias ($p\leq 0.05$), la máxima cuantificación se dio al 3 d (36.64 UI g SSi⁻¹), bajó al 5 d (28.77 UI g SSi⁻¹) y retomó un segundo pico de producción al 7 d (33.34 UI g SSi⁻¹).

En proteína extracelular la mayor producción fue el 3d (1.12 mg de proteína g SSi⁻¹), mientras la menor fue el 7d (0.81 mg de proteína g SSi⁻¹) habiendo diferencias entre ellos ($p\leq 0.05$), pero cada uno no fue diferente ($p>0.05$) al resto de los días cuantificados.

Cuadro 2.1. Actividad enzimática fibrolítica y proteína extracelular de *P. ostreatus*-IE8 sobre bagazo de caña de azúcar

Día de FS	Xilanasas	Lacasas (UI/SSi)	Celulasas	Proteína extracelular (mg/SSi)
0	9.4 ^b (0.129)*	0.8 ^d (0.138)	0.5 ^b (0.018)	1.0 ^{ab} (0.147)
3	10.3 ^b (0.855)	36.6 ^a (0.828)	0.5 ^b (0.005)	1.1 ^a (0.105)
5	9.7 ^b (0.363)	28.8 ^c (0.965)	0.6 ^a (0.061)	1.0 ^{ab} (0.074)
7	11.8 ^a (0.638)	33.3 ^b (0.771)	0.5 ^b (0.049)	0.8 ^b (0.125)

Medias con diferente literal por columna son diferentes ($p\leq 0.05$); * valores entre paréntesis refiere a la desviación estándar de la media por tratamientos.

2.3.3. Análisis bromatológico

Con base en los resultados de FDN, se observó que al día 0 de FS (68.05%) presentó el menor contenido, aumentando ($p\leq 0.05$) a partir del 3 d (73.24%) sin diferencias ($p>0.05$) durante el resto de la FS (Cuadro 2.2).

Los días 0 (38.93%) y 5 (35.44%) fueron diferentes ($p\leq 0.05$) en su contenido de FDA, pero cada uno no fue diferente ($p>0.05$) a los días 3 y 7 de FS. La LDA tuvo variación de resultados en los días medidos de FS;

ya que el día 0 fue diferente ($p \leq 0.05$) al 3 y 7 día, mientras el día 5 no tuvo diferencias ($p > 0.05$) con el día 0 y 3.

La proporción de hemicelulosa se incrementó en el transcurso de la FS, porque el día 0 presentó la menor cantidad (29.08%) y este fue diferente ($p \leq 0.05$) al resto de los días medidos. Los días 3, 5 y 7 de FS no tuvieron diferencias ($p > 0.05$) en el contenido de celulosa; sin embargo, representó una disminución en su contenido con respecto al día 0 (25.13%).

Cuadro 2.2. Composición bromatológica durante la FS sobre bagazo de caña de azúcar en base seca

Variable	Tiempo de FS			
	0	3	5	7
FDN (%)	68.05 ^b (0.918)*	73.24 ^a (0.902)	72.06 ^a (0.730)	72.00 ^a (0.738)
FDA (%)	38.93 ^a (1.193)	36.96 ^{ab} (1.006)	35.44 ^b (0.623)	37.52 ^{ab} (1.571)
LDA (%)	13.82 ^c (1.141)	15.68 ^{ab} (0.277)	14.84 ^{bc} (1.074)	16.64 ^a (0.981)
Hemicelulosa (%)	29.08 ^c (0.450)	36.28 ^{ab} (1.272)	36.66 ^a (0.568)	34.50 ^b (1.249)
Celulosa (%)	25.13 ^a (1.882)	21.30 ^b (0.927)	20.58 ^b (0.864)	20.84 ^b (2.241)
PT (%)	4.14 ^a (0.404)	4.30 ^a (0.255)	4.42 ^a (0.148)	4.48 ^a (0.249)
MS (%)	96.46 ^{ab} (0.152)	96.72 ^a (0.192)	96.26 ^b (0.089)	96.32 ^b (0.179)
MO (%)	88.08 ^a (1.232)	86.56 ^b (0.391)	86.48 ^b (0.311)	86.42 ^b (0.545)
Cenizas (%)	11.92 ^b (1.232)	13.44 ^a (0.391)	13.52 ^a (0.311)	13.58 ^a (0.545)

Hileras con diferente literal son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$). * Desviación estándar

La PT no se incrementó conforme transcurrió la FS ($p > 0.05$), dado que la producción de enzimas son imperceptibles en la cuantificación y por el tiempo de FS medido fue imposible considerar la fructificación del hongo como incorporación de proteína al bagazo. La MO al 0 d fue 88.08%, misma que se redujo dos puntos porcentuales durante la FS ($p \leq 0.05$), debido a que el hongo utilizó parte para su alimentación. En contraste, la cuantificación de cenizas aumentó durante la FS en la misma tendencia

que MO. La MS dependió de la humedad del sustrato y la temperatura de incubación, por lo que la MS osciló durante la FS en 96%.

2.4. DISCUSIÓN

Los principales factores a considerarse en la producción de enzimas mediante fermentación sólida (FS) son: tamaño de partícula del sustrato, naturaleza del inóculo, temperatura y duración de FS (Nsereko *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2002 y Kurman *et al.*, 2008). El presente estudio se caracterizó por la heterogeneidad de las partículas del bagazo de caña de azúcar que fue recolectado directamente del ingenio, propiciando la producción de lacasas y xilanasas, por otra parte el inóculo de *P. ostreatus*-IE8 se activó en el sustrato sorgo-bagazo de caña de azúcar, estimulando con ello la producción de enzimas en comparación a la activación en medios de cultivo de papa dextrosa en cajas petri. La versatilidad de resultados en este tipo de estudios se debe a las condiciones sometidas durante la experimentación, corroborándose porque Márquez *et al.* (2007) usando bagazo de caña de azúcar (0.5-1 cm de diámetro, 80% de humedad) inoculado con *P. ostreatus* a 30 °C reportaron mayor actividad xilanásica (27.41 UI g SSi⁻¹), celulásica (0.96 UI g SSi⁻¹) pero menor lacásica (15.54 UI g SSi⁻¹) a 14 d de FS, mientras Verma y Madamwar (2002) en el mismo sustrato y la misma especie obtuvieron 112 Ug⁻¹ de lacasas, además Roldán-Carrillo *et al.* (2003) obtuvieron una actividad de 0.12 U mL⁻¹ de celulasas en el mismo sustrato pero con *Phanerochaete chysosporium* incubado a 39°C al 3d de FS.

P. ostreatus es reconocido como productor de lacasas antes que de celulasas (Márquez *et al.*, 2007) coincidiendo con los resultados obtenidos en el presente estudio. Sin embargo, Robles *et al.* (2009)

obtuvieron mayor actividad xilanásica utilizando misma cepa a 7 d de FS en bagazo de maguey (15.25 UI g SSi⁻¹) o paja de frijol (43.45 UI g SSi⁻¹) como sustrato, pero menor actividad de lacasas al cuantificar 5.52 UI g SSi⁻¹ en paja de trigo y 0.20 UI g SSi⁻¹ en bagazo de maguey. Situación que se presenta por la composición de la pared celular de cada sustrato, ya que las pajas contienen menor contenido de lignina que el bagazo.

La cantidad de área superficial disponible para la colonización de *P. ostreatus* y la composición química de la superficie disponible, son los factores determinantes en la degradación de la pared celular y esta genera los cambios en los componentes bromatológicos (Din *et al.*, 1991); además *P. ostreatus* incide en la estructura de la fibra, favoreciendo la digestibilidad de sus componentes (Cornel *et al.*, 1995). Existen muchos estudios donde realizan FS analizando los cambios químicos durante el proceso; no obstante se caracterizaron por su incubación en tiempos superiores al presente estudio. Ávila (2005), Okano *et al.* (2006), Luna (2007) y Bastida (2007) realizaron fermentaciones superiores a los 30 d, permitiéndoles reportar reducciones significativas en FDN y lignina, situación que no se dio en el presente estudio debido al corto tiempo de fermentación. Dado que Bastida (2007) obtuvo 76.93% de FDN para el mismo sustrato y cepa al 30 d de fermentación, coincidiendo con los resultados de Peláez *et al.* (2008) fermentando 15 d la caña de azúcar integral con *P. sapidus* y Okano *et al.* (2007) usando *P. eryngii* como inoculo en bagazo de caña. Ávila (2005) usando rastrojo de maíz como sustrato para la misma cepa no encontró variación significativa en FDN reportando 75.19 y 75.39% para el 8 y 30 d de FS.

Las tres principales mediciones de fibra en la FS sobre bagazo de caña de azúcar presentaron incrementos significativos, probablemente porque al inicio de la FS la muestra se constituyó de carbohidratos disponibles,

fibra, proteína y cenizas; y al ser inoculada, los carbohidratos solubles y hemicelulosa son consumidos como fuente de energía antes que la celulosa y lignina en la fase de crecimiento del micelio (Escalona *et al.*, 2001; Okano *et al.*, 2007); por tanto la proporción de los componentes químicos de la muestra varían después de la FS.

La degradación del bagazo de la caña de azúcar con *P. ostreatus*-IE8 se inicia con la colonización rápida de las células radiales del parénquima de la pared celular que contienen azúcares libres y otros nutrientes. La disposición radial del parénquima facilita el acceso al interior y permite la distribución del hongo en el sustrato. El acceso a las células adyacentes se produce mediante las aberturas o de manera directa a través de la pared celular. Una vez que las sustancias fácilmente asimiladas son consumidas, da inicio la degradación de la pared celular mediante una erosión localizada en todas las capas de la pared celular. La degradación va de forma progresiva a través de las capas de la pared secundaria y lamina media. Las hifas del hongo mediante la liberación de lacasas degradan lignina progresivamente desde el borde del flujo luminoso de la pared secundaria hacia la lámina media. Sin embargo, los niveles de degradación de la pared celular esta influenciada por el contenido lignocelulosico del sustrato y el tiempo de exposición, al ser factores que regulan el alcance y el ritmo de deterioro (Akhtar *et al.*, 1997); factores que intervinieron en el presente estudio dadas las variables bromatológicas reportadas (Cuadro 2.2).

La degradación de los componentes de la pared celular del bagazo de caña por acción de las enzimas producidas por *P. ostreatus* es la siguiente: la degradación de la celulosa por las celulasas se realiza en forma sinérgica de sus tres tipos, porque una sola no degrada más allá del 5%, sin importar cuanta enzima sea. (Wilson y Irvin, 1999). Los tipos

de celulasas son endoglucanasas, exoglucanasas y glucosidasas, de las cuales las endoglucanasas actúan primero sobre las partes amorfas de la celulosa y regiones menos estructuradas reduciendo las cadenas de la celulosa, seguido actúan las exoglucanasas que remueven glucosa o celobiosas a partir de un extremo libre no reductor; y la hidrólisis completa de celobiosa a glucosa se da por las glucosidasas.

En el caso de la hemicelulosa se requiere la acción sinérgica de varias enzimas por su heterogeneidad estructural, donde las endoxilanasas inician longitudinalmente la degradación de su columna vertebral para hidrolizarla en cadenas que contienen xilobiosa, arabinosa, ácido glucorónico y xilosa que son degradadas por otras enzimas específicas (Gadd, 2001). La lignina esta constituida por numerosas unidades de derivados de fenilpropano entrecruzadas (Jung y Allen, 1995), por lo que las lacasas son las encargadas de oxidar este tipo de compuestos fenolicos por tener en su estructura átomos de cobre (Loera *et al.*, 2006).

Así, el estudio del efecto de las enzimas producidas por hongos basidiomicetos están relacionadas directamente con la degradación de la pared celular para la producción de energía (Beauchemin, 2003; Pinos-Rodríguez *et al.*, 2002). Se analizó la correlación lineal entre la producción de enzimas y los componentes químicos (Cuadro 2.3), donde se observó que la actividad de lacasas se asoció positivamente con FDN, LDA, hemicelulosa y cenizas, pero negativamente con FDA, celulosa y MO ($p \leq 0.05$).

La actividad xilanásica se asoció positivamente con LDA, y la actividad celulásica se correlacionó en forma negativa con FDA y positiva con hemicelulosa. Estas asociaciones podrían explicar el comportamiento de las fracciones FDN, LDA y hemicelulosa, debido a que aumentaron porque la producción de lacasas fue constante a partir del 3d de FS, se

incrementó la producción de xilanasas y se mantuvo una producción mínima de celulasas durante la FS.

Cuadro 2.3. Coeficientes de correlación lineal entre componentes químicos y actividad enzimática fibrolítica fúngica

Variables	Proteína extracelular	Celulasas	Xilanasas	Lacasas
MS	0.43678 (0.0542)	-0.24538 (0.2971)	-0.18028 (0.4602)	0.12317 (0.6377)
FDN	0.03419 (0.8895)	0.32371 (0.1764)	0.33500 (0.1742)	0.92600 ($<.0001$)
FDA	-0.21746 (0.3712)	-0.52103 (0.0222)	0.03215 (0.8992)	-0.49592 (0.0507)
LDA	-0.24814 (0.3057)	-0.10225 (0.6770)	0.74122 (0.0004)	0.66677 (0.0048)
Hemice-lulosa	0.13592 (0.5790)	0.49507 (0.0312)	0.20977 (0.4035)	0.88165 ($<.0001$)
Celulosa	-0.00096 (0.9969)	-0.32084 (0.1805)	-0.41409 (0.0876)	-0.74210 (0.0010)
PT	0.07128 (0.7652)	0.18900 (0.4249)	0.20336 (0.4037)	0.37398 (0.1392)
Cenizas	0.04438 (0.8526)	0.30334 (0.1936)	0.32984 (0.1679)	0.70239 (0.0017)
MO	-0.04438 (0.8526)	-0.30334 (0.1936)	-0.32984 (0.1679)	-0.70239 (0.0017)

Los valores entre paréntesis indican la significancia observada ($\alpha=0.05$) de la correlación lineal

2.5. CONCLUSIONES

- La fermentación sólida del bagazo de caña de azúcar obtenido directamente del ingenio inoculado con *P. ostreatus-IE8*, favorece la actividad enzimática lacásica y desfavorece la actividad celulásica.

- La mayor actividad xilanásica en bagazo de caña de azúcar fue al 7 d de FS y de lacásica al 3 d.
- Se definió el 7 d de FS como óptimo, al tener la mejor actividad enzimática fibrolítica fúngica.
- La FS sobre bagazo de caña de azúcar aumentó la fracción FDN, LDA, hemicelulosa y cenizas, en contraste disminuyó FDA, MO y MS, mientras PT no tuvo variación.

2.6. LITERATURA CITADA

- AOAC. Official methods of analysis, 18 th ed. Association of official Analytical Chemist. Arlington. VA, USA. 2007.
- Akhtar M, Blanchette R A and Kirk T K. Fungal delignification and biomechanical pulping of wood. *In: Advances in Biochemical Engineering, Biotechnology*. 57: 160-195. 1997.
- Ávila Mayo H. Enzimas fibrolíticas de *Pleurotus ostreatus* y su actividad en rastrojo de maíz. Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Estado de México. 2005.
- Bastida López A R. Valoración nutritiva y fermentativa del ensilado de bagazo de caña de azúcar (pre-fermentado) con residuos de lechuga (*Lactuca sativa L*). Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Estado de México. 2007.
- Beauchemin K A, Colombatto D and Morgavi D P. A rationale for the development of feed enzyme products for ruminants. *Can J Anim Sci*. 2003. 23-36.
- CINVESTAV. 2009. Colección nacional de cepas microbianas y cultivos celulares. Consultado: 17/11/2009. En: <http://www.cinvestav.mx/>

- Cornel U, Silvestre M y Ortega M E Efecto de la inoculación de hongos comestibles *Pleurotus ostreatus*, sobre el valor nutritivo de la paja de cebada usada en la alimentación de rumiantes. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo, México. 1995.
- Din N, Gilkes N R, Tekant B, Miller R C Jr, Warren R A J and Kilburn D G. Non-hydrolytic disruption of cellulose fibres by the binding domain of a bacterial cellulose. *Bioresour Technol.* 1991. 9:1096-1099.
- Escalona C L, Ponce P I, Estrada M A, Solano S G, Ricardo S O y Cutiño E M. Cambios en la composición bromatológica del GANVER inoculado con una cepa de *Pleurotus ostreatus*. *Rev Prod Anim.* 2001. 13(1): 21-24.
- Gadd G M. Fungi in bioremediation. British Mycological Society. Cambridge University Press. 2001. 1-27 p.
- Graminha E B N, Goncalves A Z L, Pirola R D P B, Balsalobre M A A, Da Silva R and Gomes E. Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. *Anim Feed Sci Technol.* 2008. 144: 1-22.
- Jung H G and Allen M S. Characteristics of plant walls affecting intake and digestibility of forages by ruminants. *J Anim Sci.* 1995. 73: 2774-2790.
- Kumar S S, Sczakas G, Soccol C. R & Padey A. Production of enzymes by solid-state fermentation *in* Current Developments in solid-state fermentation. Ed. Springer New York. 2008. Pp: 183-204. Liu N, Shi S, Gao Y and Qin M. Fiber modification of kraft pulp with laccase in presence of methyl syringate. *Enzyme Microb Technol.* 2009. 44: 89-95.
- Lang E, Kleeberg I and Zadrazil F. Competition of *Pleurotus sp.* and *Dichomitus squalens* with soil microorganism during lignocelluloses decomposition. *Bioresour Technol.* 1997. 60: 95-99.

- Liu C F, Sun R C, Qin M H, Zhang A P, Ren J L, Ye J, *et al.* Succionaylation of sugarcane bagasse under ultrasound irradiation. *Bioresour Technol.* 2008. 99:1465-1473.
- Loera C O, Pérez P M C I, Barbosa R J R and Villaseñor O F. Laccases. *Adv Agric Food Biotechnol.* 2006:323-340.
- Luna Rodríguez L. Estudio de la actividad lignocelulósica del hongo *Pleurotus ostreatus* sobre el rastrojo de cebada. Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Estado de México. 2007.
- Márquez A A T, Mendoza M G D, González M S S, Buntins D S E y Loera C O. Actividad fibrolítica de enzimas producidas por *Trametes sp* EUM1, *Pleurotus ostreatus* IE8 y *Aspergillus niger* AD96.4 en fermentación sólida. *Interciencia.* 2007. 32(11):780-785.
- Nsereko V L, Morgavi D P, Rode L M, Beauchemin K A ans McAllister T A. Effects of fungal enzyme preparations on hydrolysis and subsequent degradation of alfalfa hay fiber by mixed rumen microorganisms *in vitro*. *Anim Feed Sci Technol.* 2000. 88:153-170.
- Okano K, Fukui S, Kitao R and Usagawa T. Effects of culture length of *Pleurotus eryngii* grown on sugarcane bagasse on *in vitro* digestibility and chemical composition. *Anim Feed Sci Technol.* 2006.
- Park Y S, Kang S W, Lee J S, Hong S I and Kim S W. Xylanase Production in solid state fermentation by *Aspergillus niger* mutant using statistical experimental designs. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2002. 58:761-766.
- Peláez A A, Meneses M M, Miranda R L A, Megías R M D, Bárcena G R y Loera O. Ventajas de la fermentación sólida con *Pleurotus sapidus* en ensilajes de caña de azúcar. *Arch Zootec.* 2008. 57 (217) 25-33.

- Pinos-Rodríguez J M, González S S, Mendoza G D, Bárcena R, Cobos A M, Hernández A, *et al.* Effect of exogenous fibrolytic enzyme on ruminal fermentation and digestibility of alfalfa and rye-grass hay fed to lambs. *J Anim Sci.* 2002. 80: 3016-3020.
- Ragunathan R, Gurusamy R, Palaniswamy M and Swaminathan K. Cultivation of *Pleurotus sp.* On varios agro-residues. *Food Chem.* 1996. 55(2):139-144.
- Robles N, García E, Meneses M M, Peláez A A y Manuel J C. Cultivo sólido del bagazo de maguey, paja de frijol y aserrín con *Pleurotus ostreatus* IE8 en la producción de enzimas fibrolíticas. *In: XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.* Acapulco, Guerrero. 2009.
- Roldán-Carrillo T, Rodríguez-Vázquez R, Díaz-Cervantes D, Vázquez-Torres H, Manzur-Guzmán A and Torres-Domínguez A. Starch-based plastic polymer degradation by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* grown on sugarcane bagasse pith: enzyme production. *Bioresour Technol.* 2003. 86: 1-5.
- SAS. SAS/STAT Guide for personal computer. Vers. 8. SAS Institute Cary, NC. USA. 2000.
- Sosa de Pro E. Manual de procedimientos analíticos para alimentos de consumo animal, Chapingo, México. 1979.96-99.
- Verma P and Madamwar D. Production of ligninolytic enzymes for dye decolorization by cocultivation of white-rot fungi *Pleurotus ostreatus* and *Phanerochaete chrysosporium* under solid-state fermentation. *Appl Biochem Biotechnol.* 2002. 102-103: 109-118.
- Wang D, Sakoda A and Suzuki M. Biological efficiency and nutritional value of *Pleurotus ostreatus* cultivated on spent beer grain. *Bioresour Technol.* 2001. 78: 293-300.
- Wilson D B and Irwin D C. Genetics and properties of cellulases. *In: Recent progress in bioconversion of lignocellulosics.* 1999: 1-21.

Yang W Z, Beauchemin K A and Vedres D D. Effects of pH and fibrolytic enzymes on digestibility, bacterial protein synthesis, and fermentation in continuous culture. *Anim Feed Sci Technol.* 2002. 102:137-150.

CAPÍTULO 3. FERMENTACIÓN RUMINAL *IN VITRO* DE BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR TRATADO CON FIBROZYME® O EXTRACTO ENZIMÁTICO DE FERMENTADO SÓLIDO.

3.1. INTRODUCCIÓN

La digestibilidad del forraje representa la cantidad potencial disponible de sustrato nutritivo para el rumiante (Beauchemin *et al.*, 2003). El uso de enzimas fibrolíticas exógenas aumentan la utilización de forrajes y mejoran la eficiencia productiva de los rumiantes (Beauchemin *et al.*, 2003; Colombatto *et al.* 2003; Moreno *et al.*, 2007). Industrialmente, las enzimas usadas para este fin son producto de la fermentación microbiana, pero el tipo y actividad enzimática varía dependiendo de la cepa, sustrato y condiciones de crecimiento seleccionados (Beauchemin *et al.*, 2003). Así, la disponibilidad de productos comerciales de enzimas combinado con altos costos de alimentación han impulsado investigaciones para evaluar el papel de las enzimas fibrolíticas exógenas en los sistemas de producción de rumiantes (Yang *et al.*, 2002); sin embargo, es necesario establecer la relación enzima-sustrato.

La estimación de la degradación de alimentos mediante métodos *in vitro* es importante para la nutrición de rumiantes, al correlacionarse con los parámetros medidos *in vivo* teniendo la ventaja de ser menos costosos, obtener resultados en menor tiempo, así como tener mayor control y precisión de las condiciones experimentales, comparado con las técnicas *in situ* o *in vivo* (Getachew *et al.*, 1998; Makkar, 2005). Específicamente, la medición del volumen de gas *in vitro* se utiliza para determinar la cinética de fermentación ruminal y predicción de la digestibilidad de la materia seca (Blümmel *et al.*, 2005; Váradyová *et al.*, 2005) ayudando a establecer la utilización eficiente de los forrajes en dietas para rumiantes (DePeters *et al.*, 2003; Makkar, 2005; Váradyová *et al.*, 2005). La técnica

de Menke *et al.* (1979) se adapta a países en vías de desarrollo por los materiales requeridos para su implementación en laboratorio (Makkar, 2005).

El presente estudio tuvo como objetivo determinar la fermentación ruminal *in vitro* mediante la técnica de producción de gas y la composición química del bagazo de caña de azúcar tratado con Fibrozyme® y productos de fermentación sólida (FS; enzimas fibrolíticas fúngicas).

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Tratamientos

Se realizó una igualación xilanásica del extracto crudo enzimático (ECE) con Fribrozyme®, para lo cual se obtuvo ECE de una FS de 7d sobre bagazo de caña inoculado *P. ostreatus*-IE8, y una solución de Fribrozyme® (1g en 10 mL de agua destilada). Se les cuantificó la actividad de xilanasas, celulasas y lacasas (metodología en apartados 1.2.6.1, 1.2.6.2, 1.2.6.3, respectivamente). El Cuadro 3.1 muestra que la actividad enzimática de la solución Fribrozyme® es 10 veces mayor a la del ECE. Con estos resultados, se tomó como referencia para los tratamientos la aplicación de 10 mL de Fribrozyme® por Kg MS⁻¹ de bagazo (equivalente a 1 g Kg MS⁻¹) y en los tratamientos correspondientes, la cantidad necesaria de ECE para tener la misma actividad enzimática.

El sustrato base (SB) fue bagazo de caña de azúcar esterilizado (20 min, 15 PSI y 121 °C) con 80% de humedad. En bolsas de plástico estériles (unidad experimental) se colocaron 100 g de SB y recibió los siguientes tratamientos:

Cuadro 3.1. Actividad enzimática fibrolítica (UI) del extracto crudo enzimático y Fibrozyme®

Variable	UI/mL		
	Xilanasas	Celulasas	Lacasas
ECE	0.85	0.05	3.39
Fibrozyme®	8.5	0.31	Sin actividad

Tratamiento 1. Sustrato base de bagazo de caña de azúcar (SB) adicionando 5 g de inóculo *P. ostreatus*-IE8 (apartado 2.2.3.).

Tratamiento 2. SB más 5 g de fermentado sólido. El fermentado sólido consistió de bagazo de caña de azúcar inoculado con *P. ostreatus*-IE8 por 7 d (apartado 2.2.4).

Tratamiento 3. SB adicionado de 5 g de inóculo de *P. ostreatus*-IE8 (apartado 2.2.3.) y 1.9 mL de ECE. La cantidad de ECE contenía 1.7 UI de xilanasas, 0.1 UI de celulasas y 6.44 UI de lacasas.

Tratamiento 4. SB más 1.9 ml de ECE (1.7 UI de xilanasas, 0.1 UI de celulasas y 6.44 UI de lacasas).

Tratamiento 5. SB con 0.2 ml de Fibrozyme®. La cantidad adicionada de Fibrozyme® contenía 1.7 UI de xilanasas y 0.01 UI de celulasas.

Tratamiento 6. Sustrato base (SB) como testigo.

Todos los tratamientos se incubaron a 25 °C durante 7 d, se secaron a 60 °C por 96 h, posteriormente se molieron en un molino Willey provisto de una criba de 1 mm de diámetro.

3.2.2. Análisis bromatológico de los tratamientos

Se determinaron MS, cenizas, MO, PT, hemicelulosa, celulosa (AOAC, 2007), FDN, FDA (ANKOM Technology Method) y LDA (Sosa, 1979) al bagazo tratado después de la incubación a 25 °C por 7 d.

3.2.3. Cinética de producción de gas *in vitro*

En frascos de vidrio color ámbar de 120 mL de capacidad se colocaron con flujo continuo de CO₂, 0.5 g de muestra y 90 mL de inóculo ruminal. Los frascos se cerraron herméticamente y colocaron en baño maría a 39 °C (Menke y Steigass, 1988). Se determinó la presión de gas en los frascos a 0, 1, 2.5, 4, 7, 10, 14, 18, 24, 30, 36, 48, 60 y 72 h de incubación con un manómetro (0-1 kg cm⁻²). Los valores de presión de gas (kg cm⁻²) fueron transformados a volumen de gas (mL g⁻¹ MS) usando un modelo de regresión lineal (Anexo IV). Con los datos de volumen se obtuvieron los parámetros de la cinética de producción de gas: volumen máximo de gas (Vm; mL g⁻¹) tasa de producción de gas (S; h⁻¹) y tiempo lag (L; h), del modelo logístico $V_a = V_m / (1 + \exp(2-4*S*(T-L)))$, descrito por Schofield y Pell (1995), usando el paquete estadístico SAS (2000).

El inóculo ruminal usado en esta prueba se obtuvo de la siguiente manera: se extrajo líquido ruminal de un borrego fistulado alimentado con una dieta alta en forraje, no específica; el líquido ruminal fue filtrado a través de ocho capas de gasa y una parte de éste fue diluido en nueve partes de una solución mineral reducida, conteniendo cada litro: K₂HPO₄ (0.45 g), KH₂PO₄ (0.45 g), (NH₄)₂SO₄ (0.45 g), NaCl (0.90 g), MgSO₄ (0.18 g) y CaCl₂.H₂O (0.12 g).

3.2.3.1. Digestibilidad *in vitro*

Al término del periodo de incubación (72 h) se filtró el residuo de cada frasco en bolsitas ANKOM y se secó a 60 °C durante 24 h para calcular la digestibilidad de la MS (DIGMS). Para calcular la digestibilidad verdadera

(DIGV) se les cuantificó el contenido de FDN (ANKOM Technology Method) eliminando con ello los microorganismos adheridos durante la fermentación *in vitro*. Las formulas usadas fueron:

$$\text{DIGMS} = \frac{\text{MS inicial} - (\text{MS residual-blanco})}{\text{MS inicial}} * 100$$

$$\text{DIGV} = \frac{\text{MS inicial} - (\text{MS FDN} - \text{blanco})}{\text{MS inicial}} * 100$$

3.2.3.2. Variables estimadas mediante modelos matemáticos

Se utilizaron los modelos descritos por Menke *et al.* (1979) para estimar la digestibilidad de la materia orgánica (DMO) y energía metabolizable (EM); así como el descrito por Blümmel *et al.* (1997) para biomasa microbiana (BM). La adherencia microbiana (AM) se determinó restando la cantidad de FDN residual a la MS residual (AM = g MS residual – g MS FDN).

$$\text{EM (MJ/Kg MD)} = 2.20 + 0.136 \text{ Gp} + 0.057 \text{ PT}$$

$$\text{DMO (\%)} = 14.88 + 0.889 \text{ Gp} + 0.45 \text{ PT} + 0.0651 \text{ Ce}$$

$$\text{BM (mg)} = \text{mg de MS degradados} - (\text{mL gas producidos} * 2.20)$$

Donde: EM es la energía metabolizable; DMO es digestibilidad de la materia orgánica; BM es biomasa microbiana, Gp son mL de gas producido por 200 mg de MS durante 24 h de fermentación; PT es proteína total en porcentaje; Ce es cenizas en porcentaje.

3.2.4. Análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente al azar, donde cada tratamiento consistió de 4 repeticiones independientes. Los datos se analizaron

usando el procedimiento GLM del paquete estadístico SAS® (2000) y las diferencias de medias fueron comparadas usando la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$). El modelo estadístico usado fue:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = Variable de respuesta en el i-ésimo tratamiento y j-ésima repetición.

μ = Media general.

τ_i =Efecto del i-ésimo tratamiento.

ε_{ij} = Error aleatorio, el cual se distribuye normalmente con media 0 y varianza σ^2 .

Se calcularon coeficientes de correlación entre los componentes químicos y los parámetros de producción de gas *in vitro* mediante el procedimiento CORR de SAS (2000). Así como, un análisis de regresión lineal entre producción de gas *in vitro* y el tiempo de incubación.

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Análisis bromatológico

El bagazo de caña de azúcar como sustrato base en algunos de los tratamientos (T1, T2, T3, T4 y T5) presentaron menor contenido de las fracciones FDN y FDA con respecto al testigo (T6; Cuadro 3.3). Los valores menores de FDN se obtuvieron con los tratamientos que involucraron FS (T1, T2 y T3), sin existir diferencia entre ellos. Los tratamientos 4 y 5 no presentaron diferencias entre sí, indicando que se igualó el efecto de Fibrozyme® con el ECE. Para FDA, T3 (41.08%) tuvo diferencia ($p<0.05$) con T5 (44.78%); no obstante, cada uno en particular no presentó diferencias ($P>0.05$) con los tratamientos 1, 2 y 4.

En contraste, los tratamientos 1, 2, 3, 4 y 5 aumentaron la proporción de LDA con respecto al testigo (T6). El menor contenido de LDA se obtuvo con T4 (15.68%) y T5 (16.25%). El tratamiento 3 tuvo menor contenido de LDA (17.23%) que el tratamiento 1 (19.38%) como consecuencia de la adición del ECE al sustrato base de caña de azúcar.

Los tratamientos 1, 2, 3 y 4 presentaron menor proporción de celulosa que T5 (Fibrozyme®), éste último propició la menor degradación de celulosa (28.55%) del bagazo comparado con T6 (testigo; 40.53%). La aplicación del ECE (T4) causó una degradación mayor ($P < 0.05$) de celulosa que Fibrozyme® (T5). Por el contrario, la aplicación del ECE disminuyó ($P < 0.05$) la degradación de hemicelulosa, ya que T3 (29.20%) fue diferente a T1 (26.50%) y T4 (32.90%) a T6 (29.03) y T5 (28.73%).

El contenido de PT incrementó con los tratamientos que involucraron FS (T1, T2 y T3) en comparación a los tratamientos 4 y 5 (aplicación de enzimas); no obstante, la proporción de PT fue mayor en todos los tratamientos con respecto a T6 (testigo). El T3 fue el que incrementó la mayor proporción de contenido de PT (4.48%) representando 2.8 y 3.5 puntos porcentuales arriba de lo reportado por NRC (2007) y el testigo. La MO disminuyó y las cenizas incrementaron por efecto de los tratamientos en comparación al testigo (T6).

3.3.2. Cinética de la producción de gas

La Figura 3.1 muestra la tasa fraccional de producción de gas *in vitro* del sustrato base de bagazo de caña y sus distintos tratamientos. Se observaron desplazamientos de la fermentación temprana (entre 1 y 7 h de incubación) por efecto de los tratamientos en comparación al testigo (T6). Lo más notorio es que la tasa fraccional disminuyó en los tratamientos inoculados con *P. ostreatus*-IE8 (T1, T2 y T3) con respecto

al testigo (T6), mientras en los tratamientos con Fibrozyme® (T5) y ECE (T4) dicha disminución no fue tan drástica (Figura 3.1).

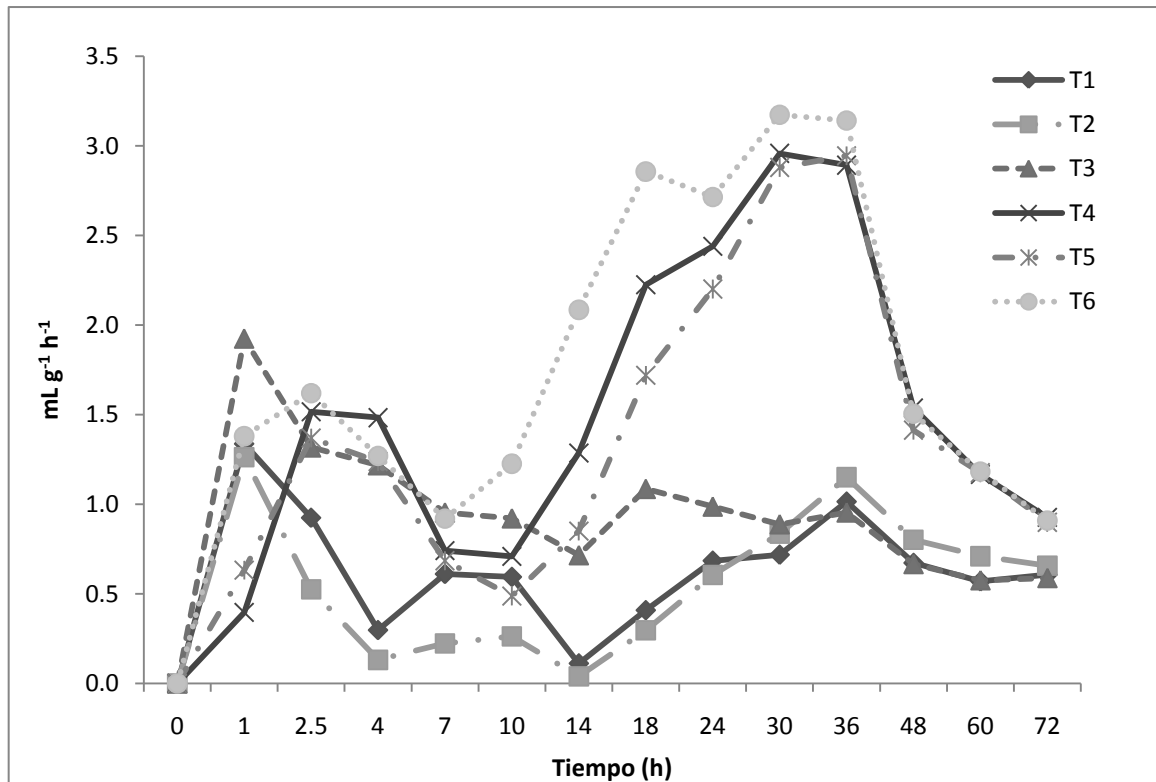


Figura 3.1. Tasa fraccional de producción de gas *in vitro* de un fermentado sólido de caña de azúcar comparado con Fibrozyme® y extracto crudo enzimático

La Figura 3.2 muestra la evolución de la producción de gas acumulado, compuesto de tres fases (L, S y Vm; Cuadro 3.4). Los diferentes tratamientos sobre el SB causaron disminución ($p < 0.05$) de Vm con respecto al testigo (T6), siendo fuertemente disminuido en aquellos que se les realizó FS (T1, T2 y T3) y menos drástica por el tratamiento con ECE (T4) o Fibrozyme (T5). El tiempo lag (L) no fue afectado por T4 y T1, los tratamientos T5 y T2 incrementaron ($p < 0.05$) el tiempo L y, T3 lo disminuyó, todos con respecto al testigo (T6). La tasa de producción de

gas (S) disminuyó en los tratamientos inoculados con *P. ostreatus*-IE8 (T1, T2 y T3), pero no fue diferente con T4 y T5 (aplicación de enzimas fibrolíticas exógenas) en comparación al testigo (T6).

La DIGMS y DIGV del SB (T6) disminuyó ($p < 0.05$) por efecto de los tratamientos, esta fue mucho menor cuando al SB se expuso a una fermentación sólida con *P. ostreatus* (T1, T2 y T3). La DIGMS con T4 (ECE) fue mayor que T5 (Fibrozyme®), pero dicha diferencia no se presentó en la DIGV. La adherencia microbiana (AM) en el residuo de SB fue menor ($p < 0.05$) en los tratamientos 3 (FS más ECE) y 4 (ECE), en comparación con el testigo (T6). El ECE redujo la adherencia microbiana en el SB (Cuadro 3.5) dado que T3 (35 mg) es diferente a T1 (42 mg) y T4 (34 mg) a T6 (42 mg).

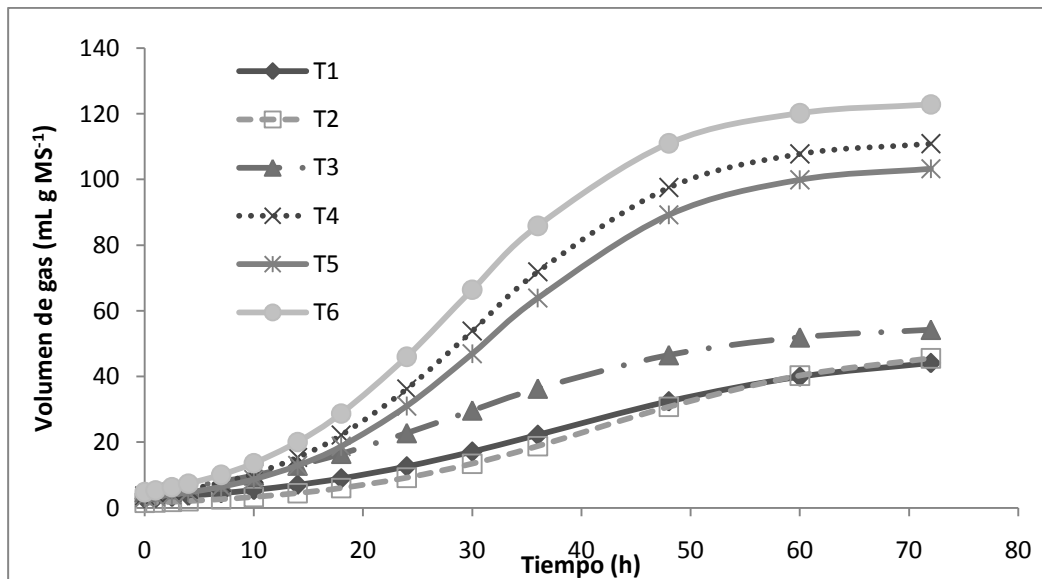


Figura 3.2. Evolución de la producción de gas in vitro de un fermentado sólido de caña de azúcar comparado con Fibrozyme® y extracto crudo enzimático

El Cuadro 3.5 muestra el efecto negativo de los tratamientos en el contenido de energía metabolizable (EM), debido a que el testigo (T6) tuvo

la mayor EM (3.63 kJ/kg MD). El tratamiento 4 presentó el mayor contenido de EM, mientras T1 y T2 cuantificaron las menores EM, todos diferentes con el testigo ($p \leq 0.05$). La DMO presentó comportamiento similar entre tratamientos a la EM. La estimación de BM fue mayor en aquellos tratamientos que involucraron FS (T1, T2 y T3), ya que al resto se le cuantificaron valores negativos.

Los coeficientes de determinación (R^2) y la producción de gas por unidad de tiempo ($\beta 1$) se exponen en el Cuadro 3.2. La producción de gas de los tratamientos presentó el mismo comportamiento del volumen máximo producido (V_m), distinguiéndose tres grupos, donde el testigo (T6) produjo la mayor cantidad (1.95 mL h^{-1}), seguido por aquellos tratamientos que involucraron la aplicación del complejo enzimático al bagazo (T4 y T5), y por último los que involucraron fermentación sólida (T1, T2 y T3) al cuantificar menos de 1 mL h^{-1} de gas.

Cuadro 3.2. Producción de gas (mL h^{-1}) por hora del bagazo de caña de azúcar tratado con productos de la fermentación sólida y Fibrozyme® a distintos periodos de incubación

Testigo	Periodo de incubación									
	0-72 h		30-36 h		36-48 h		48-60 h		60-72 h	
	R^2	$\beta 1$	R^2	$\beta 1$	R^2	$\beta 1$	R^2	$\beta 1$	R^2	$\beta 1$
T1	0.98	0.62	0.79	0.85	0.96	0.85	0.98	0.63	0.94	0.35
T2	0.95	0.68	0.81	0.82	0.92	1.11	0.79	0.81	0.53	0.44
T3	0.97	0.80	0.84	1.11	0.88	0.85	0.54	0.36	0.80	0.16
T4	0.96	1.79	0.87	3.01	0.93	2.14	0.83	0.98	0.54	0.26
T5	0.96	1.60	0.98	2.82	0.99	2.13	0.96	0.90	0.61	0.28
T6	0.96	1.95	0.97	3.24	0.97	2.09	0.82	0.77	0.28	0.22

$R^2 \rightarrow$ Coeficiente de determinación; $\beta 1 \rightarrow$ Producción de gas (mL h^{-1})

De las 30 a 48 h de incubación, todos los tratamientos presentaron su máximo de producción de gas comparado con la producción durante 72 h de incubación, ya que T3 produjo 1.11 mL h⁻¹ de gas de las 30 a 36 h de incubación, mientras T2 tuvo la misma cantidad de las 36 a 48 h. Además T4, T5 y T6 incrementaron su producción de gas a casi el doble de las 30 a 36 h, disminuyendo en las siguientes 12 h, pero aun arriba de su producción durante 72 h de incubación. A partir de las 60 h de incubación la producción de gas disminuyó considerablemente en todos los tratamientos, de modo que sería innecesaria la fermentación del bagazo de caña de azúcar bajo las condiciones del presente estudio durante 12 h más para mejorar V_m, ya que a partir de ese tiempo de incubación se tiende a disminuir el coeficiente de determinación en los tratamientos 2, 4, 5 y 6.

3.4. DISCUSIÓN

En la cinética de la producción de gas de un forraje se distinguen tres picos en la tasa fraccional de producción de gas, el primero se da en las primeras horas de fermentación correspondiente al contenido celular; posteriormente se da la fermentación de polisacáridos de la pared celular o de reserva accesibles para los microorganismos; y la fermentación tardía es de los carbohidratos estructurales unidos o cerca de la lignina (Pinos-Rodríguez *et al.* 2002; Pinos-Rodríguez *et al.* 2005). Un forraje que regularmente las presenta es la alfalfa por sus características nutritivas, como lo demostró González (2003) fermentando *in vitro* alfalfa a distintas edades de rebrote.

El bagazo de caña de azúcar contiene poco contenido celular y alta fracción fibrosa, por tanto la mayor tasa fraccional se dio arriba de las 30 h de incubación correspondiendo a la segunda fase. Se obtuvo cambio ($p < 0.05$) en las primeras horas de incubación del T3 (FS más ECE)

porque se liberaron azúcares a partir de los polisacáridos estructurales desde que inició la fermentación del bagazo. Peláez *et al.* (2008) incubaron *in vitro* una FS de 48 h sobre caña de azúcar reportando la primer fase de la tasa fraccional en las primeras 10 h de incubación a partir de azúcar y almidón disponible, además de un segundo pico a las 24 h atribuido a la fermentación de los compuestos de la pared celular.

Colombatto *et al.* (2003) mencionó que la adición de enzimas afecta la tasa inicial de producción de gas alterando las tasas de fermentación; sin embargo, en la presente investigación el V_m no aumentó y la tasa fraccional de producción de gas (S) disminuyó con respecto al testigo (T6) cuando el sustrato base (SB) fue tratado con Fibrozyme (T5) o ECE (T4), debido a que la cantidad de material fermentable total se mantuvo sin cambios por la adición de enzimas, lo cual contradice lo indicado por Colombatto *et al.* (2003). Esta diferencia puede ser debido al tipo de sustrato, complejo enzimático, cantidad adicionada, variedad enzimática del producto y propiedades bioquímicas utilizados en ambos estudios.

Okano (2007) considera que los carbohidratos solubles y hemicelulosa son consumidos durante la fermentación sólida antes que la celulosa y lignina en la fase de crecimiento del micelio. En la presente investigación, la disminución en el V_m (Cuadro 3.4 y Figura 3.2) y de la tasa fraccional entre 10 a 72 h de incubación (Figura 3.1) en el SB inoculado con *P. ostreatus*-IE8 (T1, T2 y T3), se atribuyó a la reducción de los componentes fermentables, particularmente celulosa (Cuadro 3.3).

Las relaciones entre los componentes químicos y las variables de la cinética de la producción de gas de un sustrato, sirven para estimar el consumo y digestibilidad del sustrato por parte del animal (Kaitho *et al.*, 1998; Bindelle *et al.*, 2007). El V_m se correlacionó (Cuadro 3.6)

positivamente con FDN, hemicelulosa y celulosa, pero negativamente con LDA (Cuadro 3.6) siendo similar a lo reportado por Kaitho *et al.* (1998) y Al-Masri (2003). Así mismo, Vm tuvo correlación negativa con PT (Cuadro 3.6) lo cual se explica en virtud de que la proteína es usada preferentemente como nutriente para la biosíntesis de *novo* de proteína microbiana y solo en caso que los microorganismos incrementen sus requerimientos inmediatos de energía, se cataboliza como fuente de energía (González, 2003).

Los tratamientos donde se involucró FS (T1, T2 y T3) reportaron los menores valores de Vm, S, EM, DIGMS y DIGV, pero no significa que no sea conveniente realizarlo para la alimentación de rumiantes, ya que mediante un modelo matemático se estimó mayor biomasa microbiana (BM) comparado con el uso de enzimas fibrolíticas exógenas sobre el bagazo; además BM se correlacionó negativamente con dichas variables y positivamente con adherencia microbiana. No obstante, dado que estos datos son estimados con el modelo matemático descrito por Blümmel *et al.* (1997), es conveniente corroborar mediante la cuantificación de la población microbiana (IAEA, 1997; Dijkstra *et al.*, 2000). Al respecto Al-Masri (2003) mencionó que la producción de BM depende del tipo de material fermentado.

La DIGMS y DIGV se correlacionan positivamente con el Vm, S, FDN, celulosa y hemicelulosa, además negativamente con BM, LDA y PT. Bindelle *et al.* (2007) reportó valores contrastantes al reportar correlaciones negativas con FDN y positivas con PT, explicándose porque usó forrajes de mayor valor nutritivo, donde el contenido de PT fue el doble y menores las fracciones de la pared celular al sustrato evaluado en el presente estudio. Al-Masri (2003) las correlacionó negativamente

con fibra cruda, utilizando diversos forrajes con características similares a las utilizadas por Bindelle *et al.* (2007).

3.5. CONCLUSIONES

- El ECE obtenido de una FS de 7d sobre bagazo de caña de azúcar generó un efecto similar que Fibrozyme® sobre la composición química de la pared celular del bagazo.
- El origen del inóculo de *P. ostreatus*, ya sea mediante cultivo en grano de sorgo-bagazo o en cultivo sólido sobre bagazo, no afectó las fracciones de la pared celular.
- La inoculación del sustrato base con *P. ostreatus*-IE8 disminuyó la cinética de producción de gas (V_m , S y L).
- El bagazo de caña de azúcar tratado con Fibrozyme® o ECE no presentó diferencias significativas en S, L, DIGV.
- La adición de ECE al SB inoculado con *P. ostreatus*-IE8, causó diferencias en la cinética de la producción de gas (V_m , S, L), AM, EM y DMO, no así en la DIGMS y DIGV.

Cuadro 3.3. Análisis bromatológico de un fermentado sólido de caña de azúcar comparado con Fibrozyme® o extracto crudo enzimático.

Variable	T1	T2	T3	T4	T5	T6
FDN (%)	69.25 ^d (0.526)*	71.68 ^{bcd} (0.922)	70.25 ^{cd} (1.234)	74.53 ^b (0.885)	73.48 ^{bc} (2.966)	81.20 ^a (1.044)
FDA (%)	42.75 ^{bc} (0.387)	44.00 ^{bc} (0.346)	41.08 ^c (0.822)	41.65 ^{bc} (2.173)	44.78 ^b (2.557)	52.17 ^a (0.503)
LDA (%)	19.38 ^a (0.275)	20.08 ^a (0.556)	17.23 ^b (0.263)	15.68 ^c (0.386)	16.25 ^{bc} (0.603)	11.63 ^d (0.702)
Hemicelulosa (%)	26.50 ^c (0.216)	27.68 ^{bc} (0.655)	29.20 ^{ab} (0.632)	31.40 ^a (2.121)	28.73 ^{bc} (1.305)	29.03 ^{ab} (0.751)
Celulosa (%)	23.38 ^c (0.250)	23.93 ^c (0.411)	23.88 ^c (0.911)	25.95 ^c (2.423)	28.55 ^b (2.119)	40.53 ^a (0.643)
PT (%)	4.28 ^a (0.096)	3.18 ^b (0.110)	4.48 ^a (0.050)	2.68 ^c (0.287)	2.64 ^c (0.152)	1.63 ^d (0.208)
Cenizas (%)	14.25 ^a (0.238)	14.46 ^a (0.336)	14.05 ^a (0.370)	14.35 ^a (1.179)	13.58 ^a (2.340)	5.30 ^b (0.361)
MO (%)	85.75 ^b (0.238)	85.54 ^b (0.336)	85.95 ^b (0.370)	85.65 ^b (1.179)	86.42 ^b (2.340)	94.70 ^a (0.361)
MS (%)	98.90 ^a (0.500)	98.08 ^b (0.465)	98.73 ^{ab} (0.171)	98.65 ^{ab} (0.300)	98.28 ^{ab} (0.286)	---

Filas con diferente literal son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$). * Desviación estándar

Cuadro 3.4. Parámetros de la cinética de producción de gas *in vitro* y digestibilidad de un fermentado sólido de caña de azúcar comparado con Fibrozyme® o extracto crudo enzimático.

Variable	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Vm (mL g MS ⁻¹)	47.57 ^e (0.980)*	51.44 ^{de} (2.430)	53.03 ^d (1.708)	113.60 ^b (1.453)	104.03 ^c (1.893)	123.80 ^a (2.587)
S (h ⁻¹)	0.019 ^c (0.002)	0.021 ^{bc} (0.001)	0.021 ^b (0.001)	0.028 ^a (0.001)	0.027 ^a (0.001)	0.028 ^a (0.000)
L (h)	12.22 ^{bc} (2.155)	17.29 ^a (0.729)	5.37 ^d (1.969)	12.88 ^{bc} (0.779)	13.98 ^b (0.589)	10.82 ^c (0.047)
DIGMS (%)	19.85 ^d (0.720)	20.33 ^d (2.136)	20.84 ^d (0.131)	39.25 ^b (0.369)	36.25 ^c (0.187)	42.68 ^a (0.161)
DIGV (%)	27.41 ^c (0.155)	28.67 ^c (1.750)	27.03 ^c (0.564)	44.59 ^b (0.464)	44.23 ^b (0.353)	50.38 ^a (0.368)

Filas con diferente literal son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$). * Desviación estándar

Cuadro 3.5. Parámetros estimados sobre modelos matemáticos a partir de la cinética de producción de gas *in vitro* y digestibilidad de un fermentado sólido de caña de azúcar comparado con Fibrozyme® o extracto crudo enzimático.

Variable	T1	T2	T3	T4	T5	T6
AM (mg)	42 ^a (1.000)*	37 ^{ab} (2.000)	5 ^b (3.000)	34 ^b (3.000)	42 ^a (3.000)	42 ^a (3.000)
EM (Kj/Kg MD)	2.80 ^d (0.042)	2.64 ^e (0.030)	3.13 ^c (0.047)	3.43 ^b (0.059)	3.17 ^c (0.076)	3.63 ^a (0.038)
DMO (%)	20.07 ^d (0.272)	18.81 ^e (0.301)	22.21 ^c (0.283)	24.07 ^b (0.293)	22.60 ^c (0.169)	24.68 ^a (0.238)
BM (mg)	36.80 ^a (2.383)	33.56 ^a (2.337)	15.47 ^b (2.584)	-30.14 ^d (4.708)	-15.41 ^c (3.318)	-30.53 ^d (5.529)

Filas con diferente literal son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$). * Desviación estándar

Cuadro 3.6. Coeficientes de correlación entre componentes químicos y producción de un fermentado sólido de caña de azúcar comparado con Fibrozyme® o extracto crudo enzimático.

Variables	Vm	S	DIGMS	DIGV	AM	EM	DMO	BM	FDN	FDA	LDA	Hemi-celulosa	Celulosa
S	0.949 (<.0001)	1.000											
DIGMS	0.997 (<.0001)	0.974 (<.0001)	1.000										
DIGV	0.989 (<.0001)	0.967 (<.0001)	0.993 (<.0001)	1.000									
EM	0.829 (<.0001)	0.746 (0.000)	0.781 (0.001)	0.719 (0.003)	-0.186 (0.460)	1.000							
DMO	0.816 (<.0001)	0.738 (0.000)	0.784 (0.001)	0.704 (0.003)	-0.222 (0.376)	0.999 (<.0001)	1.000						
BM	-0.974 (<.0001)	-0.939 (<.0001)	-0.966 (<.0001)	-0.955 (<.0001)	0.076 (0.805)	-0.920 (<.0001)	-0.910 (<.0001)	1.000					
FDN	0.789 (0.000)	0.693 (0.001)	0.717 (0.003)	0.712 (0.003)	-0.075 (0.769)	0.486 (0.041)	0.507 (0.032)	-0.750 (0.002)	1.000				
FDA	0.038 (0.888)	0.051 (0.832)	0.030 (0.915)	-0.123 (0.662)	0.524 (0.026)	-0.226 (0.368)	-0.377 (0.123)	0.326 (0.256)	0.397 (0.083)	1.000			
LDA	-0.867 (<.0001)	-0.837 (<.0001)	-0.850 (<.0001)	-0.809 (0.000)	0.115 (0.650)	-0.967 (<.0001)	-0.957 (<.0001)	0.914 (<.0001)	-0.487 (0.029)	0.218 (0.356)	1.000		
Hemi-celulosa	0.654 (0.006)	0.647 (0.002)	0.629 (0.012)	0.610 (0.016)	-0.528 (0.025)	0.704 (0.001)	0.688 (0.002)	-0.780 (0.001)	0.673 (0.001)	-0.412 (0.071)	-0.659 (0.002)	1.000	
Celulosa	0.787 (0.000)	0.680 (0.001)	0.753 (0.001)	0.711 (0.003)	0.342 (0.164)	0.526 (0.025)	0.568 (0.014)	-0.612 (0.020)	0.702 (0.001)	0.668 (0.001)	-0.581 (0.007)	0.159 (0.502)	1.000
PT	-0.769 (0.0003)	-0.785 (<.0001)	-0.787 (0.0003)	-0.790 (0.0003)	-0.171 (0.471)	-0.298 (0.216)	-0.226 (0.353)	0.669 (0.006)	-0.768 (<.0001)	-0.438 (0.054)	0.418 (0.067)	-0.410 (0.072)	-0.684 (0.001)

Los valores entre paréntesis indican probabilidad

3.6. LITERATURA CITADA

- Al-Masri M R. An *In vitro* of some unconventional ruminant feeds in terms of the organic matter digestibility, energy and microbial biomass. *Trop Anim Health Prod.* 2003. 35: 155-167.
- AOAC. Official methods of analysis. 18 th Ed. 2007.
- Bindelle J, Ilunga Y, Delacollette M, Muland Kayij M, Uamba di M´Balu, Kindele E, *et al.* Voluntary intake, chemical composition and *in vitro* digestibility of fresh forages fed to *Guinea pigs* in periurban rearing systems of Kinshasa (Democratic Republic of Congo). *Trop Anim Health Prod.* 2007. 39: 419-426.
- Beauchemin K A, Colombatto D, Morgavi D P and Yang W Z. Use de exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. *J Anim Sci.* 2003. 81:E37-E47.
- Blümmel M, Cone J W, Van Gelber A H, Nshalai I, Umunna N N, Makkar H P S, *et al.* Prediction of forage intake using *in vitro* gas production methods: Comparison of multiphase fermentation kinetics measured in an automated gas test, and combined gas volume and substrate degradability measurements in a manual syringe system. *Anim Feed Sci Technol.* 2005. 123-124:517-526.
- Colombatto D, Mould F L, Bhat M K and Owen E. Use de fibrolytic enzymes to improve the nutritive value of ruminant diets. A biochemical and *in vitro* rumen degradation assessment. *Anim Feed Sci Technol.* 2003. 107:201-209.
- DePeters E J, Getachew G, Fadel J G, Zinn R A, Taylo S J, Pareas J W, *et al.* *In vitro* gas production as a method to compare fermentation characteristics of steam-flaked corn. *Anim Feed Sci Technol.* 2003. 105:109-122.
- Dijkstra J, France J, Dhanoa M S and López S. Simulation of substrate degradation, microbial synthesis and gas production in the gas production technique and *in vivo*. EAAP Satellite Symposium, Gas

- production: fermentation kinetics for feed evaluation and to assess microbial activity. 2000. 18-19 august. Wageningen, the Netherlands.
- Getachew G, Blümmel M, Makkar H P S and Becker K. *In vitro* gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. *Anim Feed Sci Technol*. 1998. 72:261-281.
- González Gutiérrez L E. Constituyentes químicos, producción de gas y espuma por la fermentación *In vitro* de estratos de alfalfa con distinta edad de rebrote. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, Edo. de México. 2003.
- IAEA. Estimation of rumen microbial protein production from purine derivatives in urine. 1997. IAEA-TECDOC-945.
- Kaitho R J, Nsahlai I V, Williams B A, Umunna N N, Tamminga S and Van Bruchem J. Relationships between preference, rumen degradability, gas production and chemical composition of browses. *Agroforestry Systems*. 1998. 39: 129-144.
- Makkar H P S. *In vitro* gas methods for evaluation of feeds containing phytochemicals. *Anim Feed Sci Technol*. 2005. 123-124:291-302.
- Menke K H, Raab L, Salewski A, Stengass H, Fritz D and Scheneider W. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. *J Agric Sci (Camb)*. 1979. 92: 217-222.
- Menke K H and Steingas H. Estimation of the energetic feed value obtained from Chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Anim Res Develop*. 1988. 28: 7-55.
- Moreno R, Pinos-Rodríguez J M, González S, Álvarez G, García J C, Mendoza G, *et al*. Efecto de enzimas fibrolíticas exógenas en la degradación ruminal *in vitro* de dietas para vacas lecheras. *Interciencia*. 2007. 32 (12):850-853.
- NRC. Nutrient requirements of small ruminants. Washington, DC. 2007. 362 pág.

- Okano K, Fukui S, Kitao R and Usagawa T. Effects of culture length of *Pleurotus eryngii* grown on sugarcane bagasse on *in vitro* digestibility and chemical composition. Anim Feed Sci Technol. 2007. 136: 240-247.
- Peláez A A, Meneses M M, Miranda R L A, Megías R M D, Bárcena G R y Loera O. Ventajas de la fermentación sólida con *Pleurotus sapidus* en ensilajes de caña de azúcar. Arch Zootec. 2008. 57 (217) 25-33.
- Pinos-Rodríguez J M, González M S S, Mendoza M G D, Bárcena G R y Cobos P M. Efecto de enzimas fibrolíticas exógenas en la digestibilidad *in vitro* de la pared de heno de alfalfa (*Medicago sativa*) o de ballico (*Lolium perenne*). INCI. 2002. 27(1): 28-32.
- Pinos-Rodríguez J M, González S, Mendoza G, García J C, Miranda L, De la Cruz G A y De Lerma V. Efecto de enzimas fibrolíticas exógenas en la degradación *in vitro* de ingredientes alimenticios, y en la producción de leche de vacas holstein. INCI. 2005. 30(12): 752-757.
- SAS. SAS/STAT Guide for personal computer. Vers. 8. SAS Institute Cary, NC. USA. 2000.
- Schofiel P, and Pell A N. Measurement and kinetic analysis of the neutral detergent-soluble carbohydrate fraction of legumes y grasses. J. Anim Sci. 1995. 73: 3455-3463.
- Sosa de Pro E. Manual de procedimientos analíticos para alimentos de consumo animal. Chapingo, México. 1979. pp: 96-99.
- Váradyová Z, Baran M and Zelanák I. Comparison of two *in vitro* fermentation gas production methods using both rumen fluid and faecal inoculums from sheep. Anim Feed Sci Technol. 2005. 123-124:81-94.
- Yang W Z, Beauchemin K A and Vedres D D. Effects of pH and fibrolytic enzymes on digestibility, bacterial protein synthesis, and fermentation in continues culture. Anim Feed Sci Technol. 2002. 102: 137-150.

CONCLUSIONES GENERALES

- ❖ El extracto de bagazo de caña de azúcar proporciona los nutrientes necesarios para el crecimiento micelial de *Pleurotus ostreatus*-IE8 y *Fomes fomentarius*.
- ❖ La mejor actividad enzimática fibrolítica fúngica en bagazo de caña de azúcar se presentó al 7 d de FS.
- ❖ *Fomes fomentarius* fue el mejor productor de celulasas, mientras *Pleurotus ostreatus*-IE8 lo fue para lacasas. La producción de xilanasas fue similar en ambos casos.
- ❖ Los componentes químicos del bagazo de caña de azúcar se afectaron en una fermentación sólida inoculado con *Pleurotus ostreatus*-IE8.
- ❖ Se obtuvo un extracto crudo enzimático de una fermentación sólida de 7d que generó efectos similares a Fibrozyme® en la composición química y cinética de producción de gas *in vitro*.
- ❖ La adición del extracto crudo enzimático a una fermentación sólida mejoró los parámetros de la cinética de producción de gas en ensayos *in vitro*.

Anexos

ANEXO I. CURVAS PATRÓN

I.I. Curva patrón para xilanasas y celulasas

Para la curva patrón de xilanasas se utilizó solución xilosa (10 mM), preparándose al disolver 0.15 g de xilosa en 100 mL de amortiguador de citratos (pH 5.3-50mM). En la curva patrón de celulasas se usó solución glucosa (10 mM), se preparó disolviendo 0.18 g de dextrosa en 100 mL de amortiguador de citratos (pH 4.8-50 mM). A continuación, se realizaron diluciones con agua destilada (tabla I), se les adicionó 1.5 mL de DNS, se llevaron a ebullición durante 5 min e inmediatamente se colocaron en agua con hielo. La absorbancia se midió a una onda de longitud de 540 nm, y cada concentración se hizo por triplicado.

Tabla I. Volumen de reactivos utilizados para las curvas patrón de xilanasas y celulosas

Tubo	Solución xilosa o glucosa (μL)	Agua destilada (μL)	DNS (μL)	Concentración (μmol)
Blanco	0	1,000	1,500	0.0
1	50	950	1,500	0.5
2	100	900	1,500	1.0
3	150	850	1,500	1.5
4	200	800	1,500	2.0
5	250	750	1,500	2.5
6	300	700	1,500	3.0
7	350	650	1,500	3.5
8	400	600	1,500	4.0
9	500	500	1,500	5.0

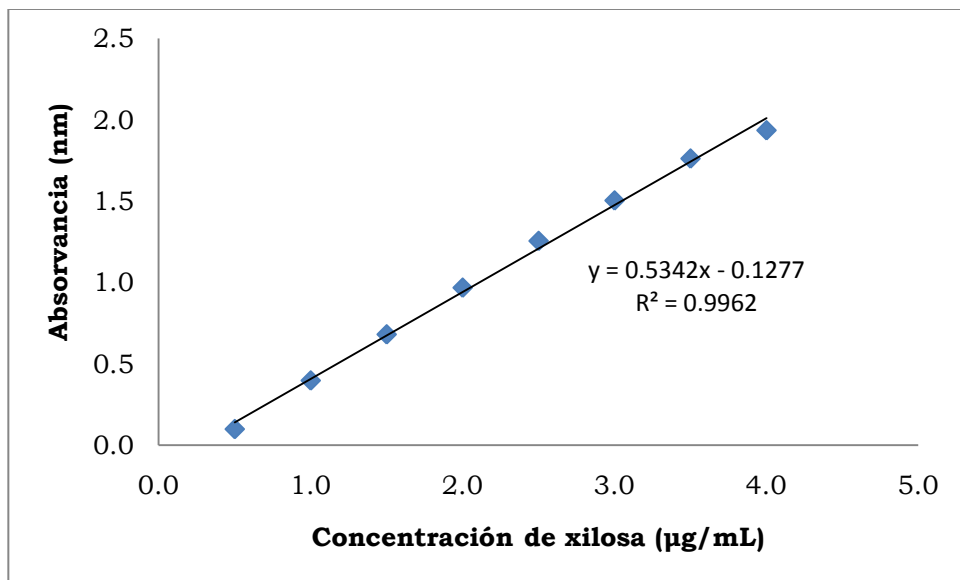


Figura I. Curva patrón de xilosa

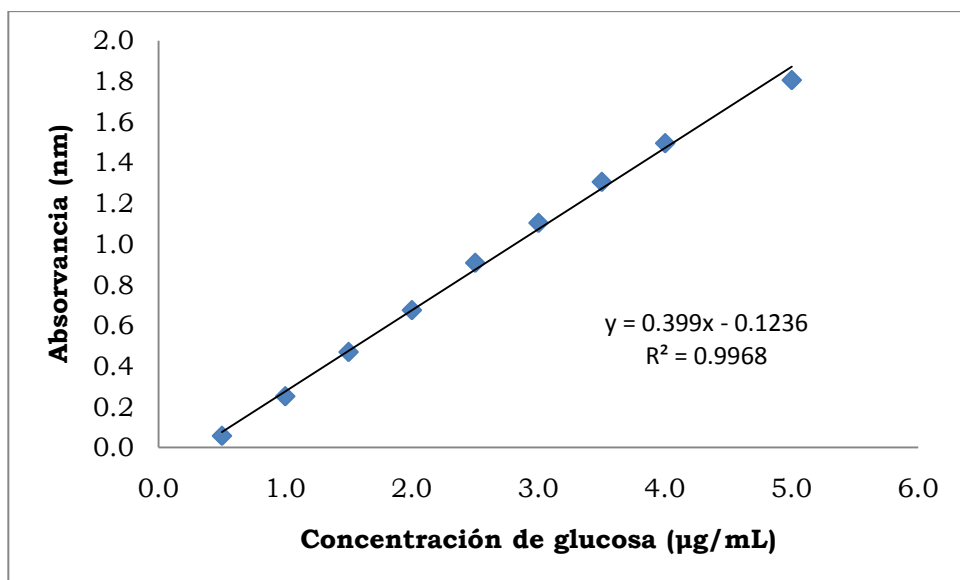


Figura II. Curva patrón de glucosa

I.II. Curva patrón para proteína extracelular

Se disolvió 0.1 g de seroalbumina bovina en 100 mL de amortiguador de citratos (pH 5.3-50 mM); además se diluyó 1:10 en agua destilada. Se realizaron diluciones con agua destilada (tabla II) obteniendo un intervalo

de concentración de 1-10 $\mu\text{g/mL}$. La absorbancia se registró a una longitud de onda de 595 nm, cada concentración se hizo por triplicado.

Tabla II. Volumen de reactivos utilizados para la curva patrón de proteína extracelular

Tubo	Solución seroalbumina (μL)	Agua destilada (μL)	Reactivo de Bradford (μl)	Concentración ($\mu\text{g/ml}$)
BLANCO	0	1,600	400	0
1	20	1,580	400	1
2	60	1,540	400	3
3	100	1,500	400	5
4	140	1,460	400	7
5	160	1,440	400	8
6	200	1,400	400	10

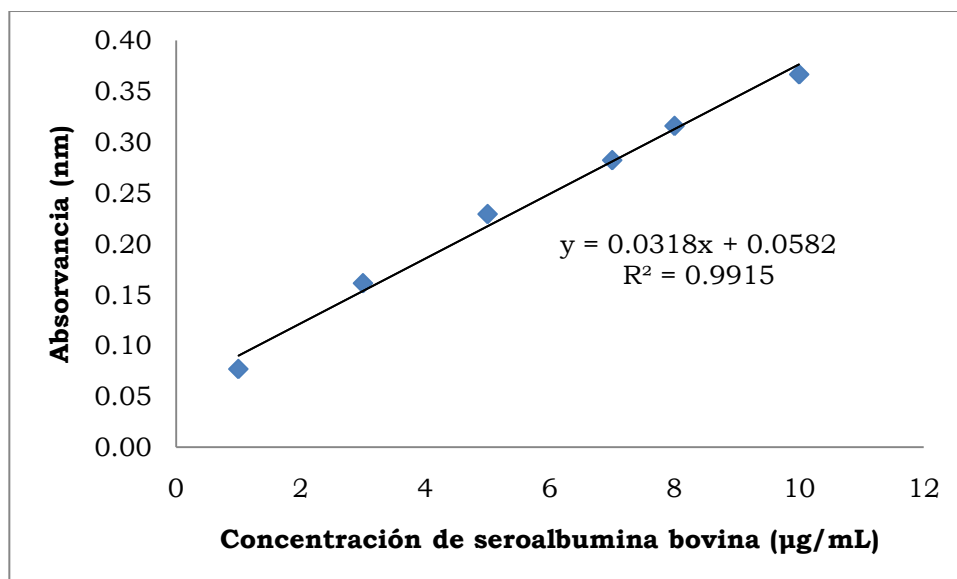


Figura III. Curva patrón de seroalbumina bovina

ANEXO II. RESULTADOS ESTADÍSTICOS

Tabla III. Análisis de varianza de Vcr

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Suma de cuadrados medio	Valor de F	Pr>F
Modelo	3	0.192	0.064	284.65	<.001
Medio cultivo	1	0.056	0.056	246.97	<.001
Cepa	1	0.058	0.058	258.40	<.001
Cepa*Medio	1	0.062	0.062	274.74	<.001
Error	18	0.004	0.000		
Total corregido	21	0.196			

Tabla IV. Análisis de varianza de la producción de biomasa

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Suma de cuadrados medio	Valor de F	Pr>F
Modelo	3	1382.7576	460.9192	4.65	0.0141
Medio cultivo	1	2.3704	2.3704	0.02	0.8788
Cepa	1	1173.4815	1173.4815	11.84	0.0029
Cepa*Medio	1	100.1482	100.1482	1.01	0.3282
Error	18	1784.3333	99.1296		
Total corregido	21	3167.0909			

ANEXO III. CURVAS PATRÓN PARA LA CEPA IE8

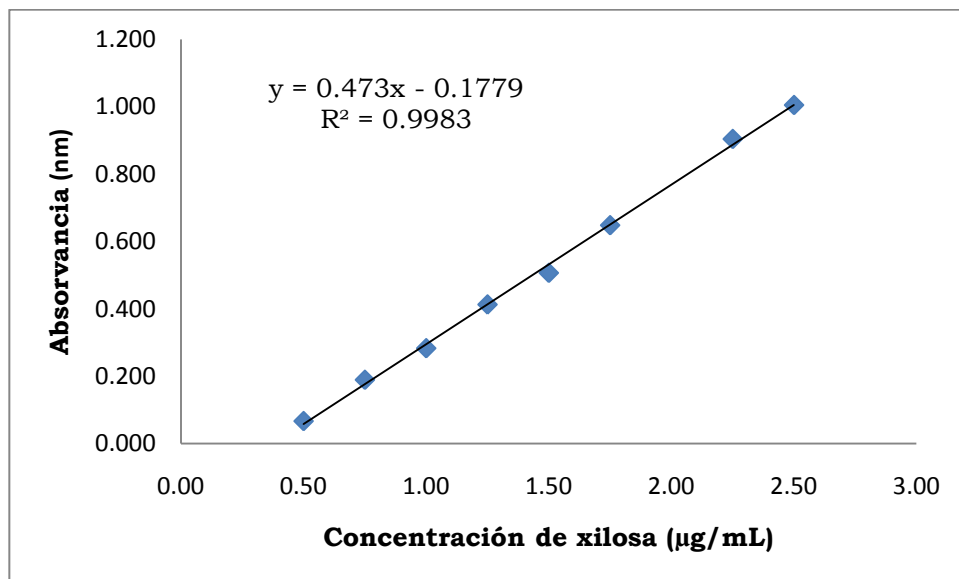


Figura IV. Curva patrón de xilosa

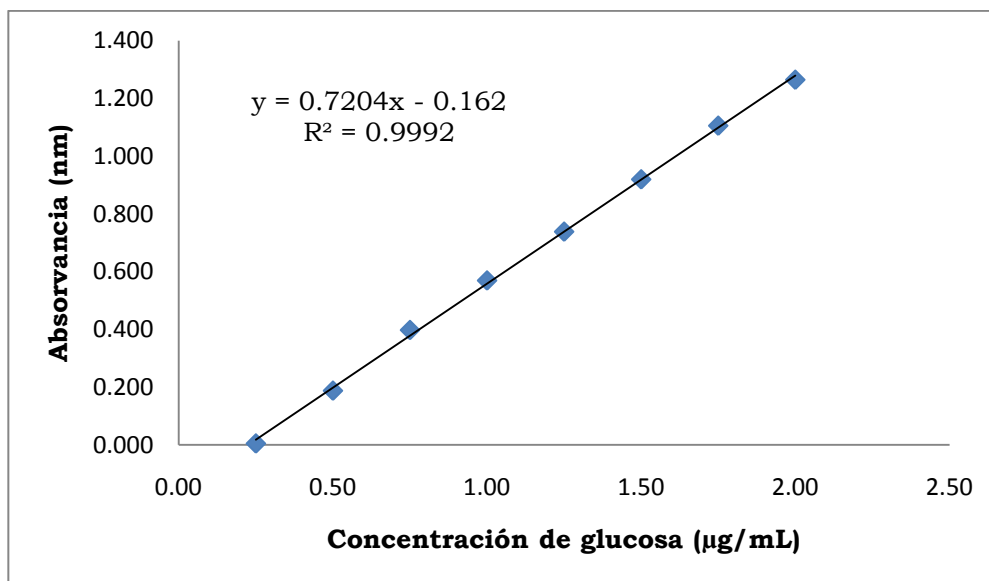


Figura V. Curva patrón de glucosa

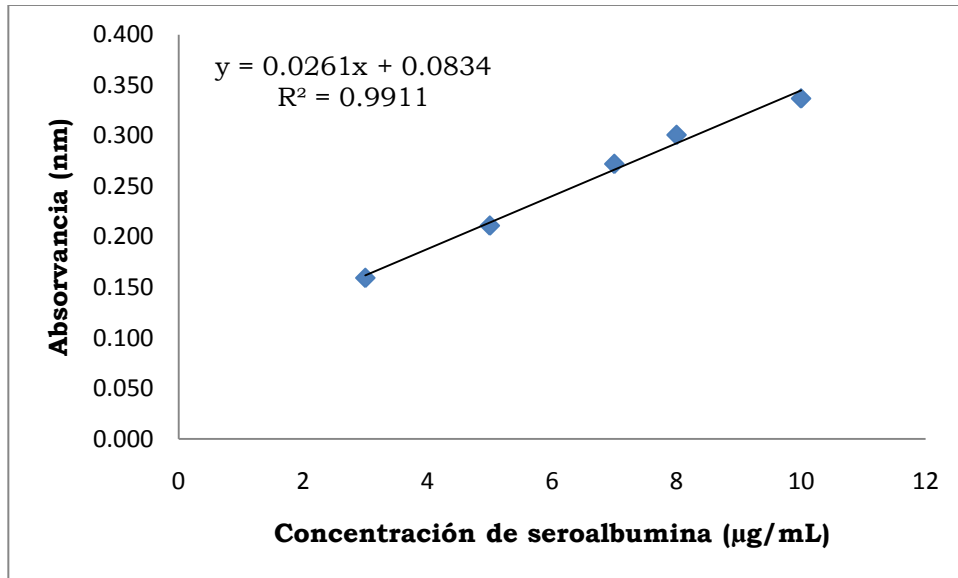


Figura VI. Curva patrón de seroalbumina bovina

ANEXO IV. CINÉTICA DE LA PRODUCCIÓN DE GAS *In vitro*

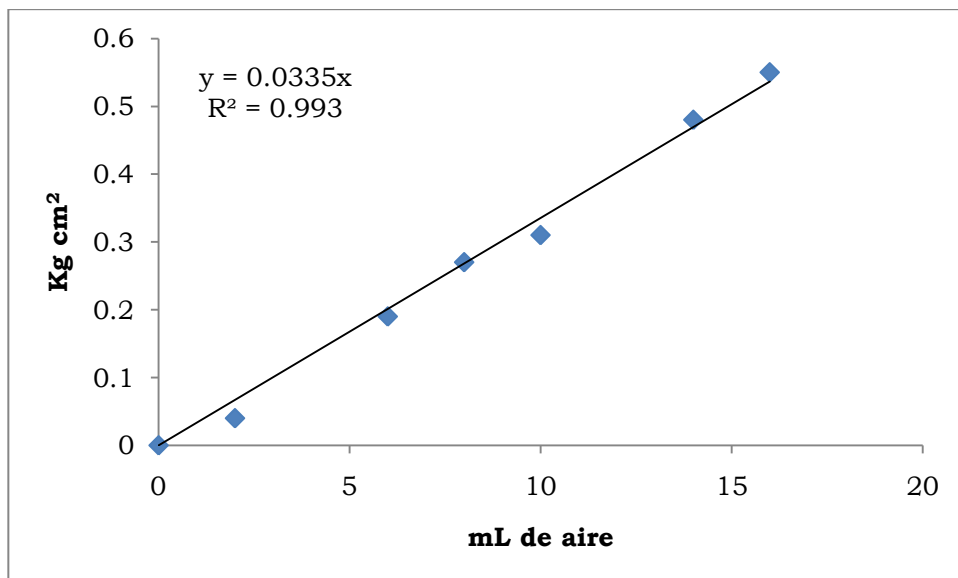


Figura VII. Curva patrón de aire