



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRICOLAS

**CAMPUS MONTECILLO
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA**

**“ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD LIGNOCELULÓSICA DEL
HONGO *Pleurotus ostreatus* SOBRE EL RASTROJO DE CEBADA”**

LORENA LUNA RODRIGUEZ

TESIS

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

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2007

La presente tesis titulada: **“ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD LIGNOCELULÓSICA DEL HONGO *Pleurotus ostreatus* SOBRE EL RASTROJO DE CEBADA”** realizada por la estudiante: **LORENA LUNA RODRÍGUEZ**, 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. MARCOS MENESES MAYO

ASESOR

DR. OCTAVIO LOERA CORRAL

ASESOR

DR. GERMÁN D. MEDOZA MARTÍNEZ

ASESOR

MC. CLAUDIA MONTALVO PAQUINI

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada.

Este proyecto de tesis fue financiada por el proyecto CONACYT N° 42782-Z

Al Colegio de Postgraduados, por darme la oportunidad de realizar la maestría.

A todos mis profesores, por todas sus enseñanzas y oportunos consejos.

Al Dr. Marcos Meneses Mayo, por su valiosa asesoría, por su amistad, por su valiosa dirección, por el tiempo dedicado a mi formación profesional.

Al Dr. Octavio Loera Corral, mi agradecimiento por la disposición, dirección de la presente investigación; sobre todo por su experiencia y enseñanza transmitida.

Al Dr. German D. Mendoza Martínez, por una valiosa colaboración y dirección de la presente investigación.

A la M.C. María Magdalena Crosby Galván, gracias todo el apoyo brindado, consejos y amistad.

A Anastasio Galicia Rincon gracias por aportar experiencias y enseñanzas prácticas.

A mis compañeros de Maestría, con los cuales compartí un objetivo en común y a la vez diversificado que en mayor o menor medida me brindaron su amistad.

A mis compañeros del Laboratorio de Biotecnología y Enzimología de hongos de la UAM Iztapalapa, por sus atenciones y el apoyo que siempre me brindaron.

DEDICATORIA

A mi hijo, por que talvez no comprenda mis ausencias; pero sabe que es el motor de mi vida.

A mi familia que a pesar de las adversidades se que siempre cuento con su apoyo.

A mis padres por darme, lo mejor de todo, la vida.

A la Familia Tapia, por todas sus atenciones y afecto; además de fomentar mi recuento con la Fe.

A la Familia Díaz, por su afecto e invaluable apoyo con el que se que cuento

INDICE GENERAL

INDICE DE CUADROS	v
INDICE DE FIGURAS	vi
ABREVIATURAS	vii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	2
III. JUSTIFICACIÓN.....	3
IV. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
1. BIOMASA VEGETAL Y RESIDUOS AGROINDUSTRIALES.....	4
1.1. Residuos lignocelulósicos.....	4
1.2. Estrategias para acelerar la degradación de la pared celular.....	6
2. HONGOS LIGNOCELULÓSICOS BIODEGRADADORES DE RESIDUOS FIBROSOS.....	7
2.1. Hongo <i>Pleurotus ostreatus</i>	7
2.2. Taxonomía del hongo <i>Pleurotus ostreatus</i>	7
2.3. Nutrición de <i>Pleurotus ostreatus</i>	8
2.4. Substratos empleados en el crecimiento de hongos	8
2.5. Condiciones de crecimiento del Género <i>Pleurotus</i>	9
3. SUBSTRATOS AGRÍCOLAS TRATADOS CON <i>Pleurotus ostreatus</i> PARA LA ALIMENTACIÓN DE RUMIANTES	10
3.1. Composición de algunos residuos agrícolas más empleados en la alimentación de rumiantes.....	10
4. FERMENTACIÓN EN SUBSTRATO SÓLIDO (FSS).....	11
5. COMPLEJOS ENZIMÁTICOS.....	12
5.1. Acción metabólica de las enzimas	12
5.2. Enzimas fibrolíticas exógenas	15
5.3. Efectos de enzimas exógenas en la alimentación de rumiantes	16
V. HIPÓTESIS.....	20

VI. OBJETIVOS	20
1. OBJETIVO GENERAL	20
1.1. Objetivos Específicos	20
VII RESULTADOS Y DISCUSION	21

ESTUDIO I. SELECCIÓN DE LA CEPA Y CONDICIONES OPTIMAS DE CRECIMIENTO DE *Pleurotus ostreatus* SOBRE RASTROJO DE CEBADA

1. INTRODUCCIÓN	21
2. DESARROLLO EXPERIMENTAL	22
2.1 Localización geográfica del estudio	22
3. ETAPAS EXPERIMENTALES DEL ESTUDIO	22
3.1 ETAPA I. Determinación de biomasa y velocidad de crecimiento radial comparando dos fuentes de nitrógeno	22
3.2 ETAPA II. Velocidad radial a distintos porcentajes de humedad y diferentes fuentes de nitrógeno sobre rastrojo de cebada	23
4. MATERIAL Y MÉTODOS	25
4.1. Material biológico	25
4.2. Material vegetativo	25
4.3. Velocidad de crecimiento radial (V_r)	26
4.4. Determinación de biomasa	26
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	27
6. RESULTADOS Y DISCUSION	28
6.1 RESULTADOS Y DISCUSION ETAPA I	28
6.2 RESULTADOS Y DISCUSION ETAPA II	31
7 CONCLUSIONES	32

ESTUDIO II. PRODUCCIÓN DE ENZIMAS FIBROLÍTICAS POR *Pleurotus ostreatus* CEPA IE8 EN FERMENTACIÓN SÓLIDA SOBRE RASTROJO DE CEBADA

1. INTRODUCCIÓN.....	33
2. DESARROLLO EXPERIMENTAL	34
2.1 Localización geográfica del estudio	34
2.2. Diagrama de flujo experimental para la obtención de enzimas.....	34
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
3.1 Material biológico.....	35
3.2 Análisis bromatológico del rastrojo de cebada	35
3.3 Digestibilidad <i>in vitro</i>	35
3.4 Preparación del extracto crudo para evaluación de actividad enzimática.....	35
3.5 Determinación de la curva estándar de xilanasas.....	36
3.6 Determinación de la curva estándar de celulasas.....	36
3.7 Determinación de la actividad de lacasas	37
3.8 Determinación de Proteína extracelular	38
4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	38
5. RESULTADOS	38
5.1 Análisis bromatológico y digestibilidad de la materia seca del rastrojo de cebada.....	38
5.2 Análisis bromatológico y digestibilidad de la materia seca del rastrojo de cebada fermentado con <i>P. ostreatus</i>	39
5.3 Producción de enzimas fibrolíticas por <i>Pleurotus ostreatus</i> IE8 en fermentación sólida sobre rastrojo de cebada.	42
6. CONCLUSIONES	48

**ESTUDIO III. ESTABILIDAD DE XILANASAS, CELULASAS Y LACASAS
PRODUCIDAS POR *Pleurotus ostreatus* CEPA IE8 A DIFERENTE PH**

1. INTRODUCCION	49
2. DESARROLLO EXPERIMENTAL	50
2.1 Localización geográfica del estudio.....	50
2.2 Diagrama de flujo experimental para la evaluación de la estabilidad de enzimas fibrolíticas fúngicas obtenidas de la FSS con <i>P. ostreatus</i> cepa IE8....	50
3. MATERIALES Y MÉTODOS	51
3.1 Material biológico.....	51
3.2 Estabilidad de las actividades enzimáticas xilanasas, celulasas y lacasas a pH 6 y 7 de <i>P. ostreatus</i> sobre rastrojo de cebada.	51
3.3 Producto comercial enzimático.....	51
3.4 Preparación del extracto crudo para las pruebas de estabilidad a distinto pH	51
4. ANALISIS ESTADISTICO	52
5 RESULTADOS Y DISCUSION.	53
6. CONCLUSIONES.....	57
VIII. LITERATURA CITADA	58

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Condiciones óptimas de crecimiento del género <i>Pleurotas</i>	9
Cuadro 2. Composición química y digestibilidad de algunos residuos agrícolas (% de MS)	11
Cuadro 3. Algunas enzimas que actúan en el proceso de degradación de lignocelulosa ..	13
Cuadro 4. Efecto de la aplicación de enzimas en el alimento antes de la alimentación ...	18
Cuadro 5. Descripción de los tratamientos para la evaluación de velocidad de crecimiento radial (mm h^{-1}) y producción de biomasa (g g^{-1} MS).....	23
Cuadro 6. Descripción de los tratamientos para la evaluación de velocidad de crecimiento radial (mm h^{-1}), sobre rastrojo de cebada (0.5 mm)	23
Cuadro 7. Composición del medio de cultivo Relación C/N11.5.....	25
Cuadro 8. Velocidad radial de las cepas IE8 y CP50 en medios de cultivo con diferentes fuentes de nitrógeno.....	28
Cuadro 9. Promedio de rendimiento (g/gss) de las cepas IE8 y CP50 en medios con rastrojo de cebada con diferentes Fuentes de nitrógeno	30
Cuadro 10. Velocidad radial en rastrojo de cebada con dos porcentajes de humedad (70 y 80%) y distintas fuentes de nitrógeno.	31
Cuadro 11. Diluciones y concentraciones de xilosa $\mu\text{mol/ml}$ para la elaboración de curva estándar.....	36
Cuadro 12. Metodología para medir la actividad de la xilanasas.....	36
Cuadro 13. Diluciones y concentraciones de glucosa $\mu\text{mol/ml}$ para la elaboración de la curva estándar.....	37
Cuadro 14. Metodología para medir la actividad de celulasas.....	37
Cuadro 15. Análisis bromatológico del rastrojo de cebada.....	39
Cuadro 16. Análisis bromatológico del rastrojo de cebada a los 8, 16, y 30 días de FSS ..	40
Cuadro 17. Valores de velocidad de decaimiento (k) y tiempo de vida media ($t_{1/2}$) para los extractos enzimáticos producidos por <i>P. ostreatus</i> cepa IE8 y su comparación con un extracto comercial enzimático a pH6 y 7 a 39°C	54

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. a) Estructura de la celulosa, b) Modelo de la celulosa unida por puentes de hidrógeno	5
Figura 2. Estructura de la lignina.....	5
Figura 3. Enzimas que actúan en el proceso de degradación del complejo lignocelulosa..	14
Figura 4. Radicales involucrados en la degradación de lignina.	15
Figura 5. Diagrama de flujo para la Etapa I (Determinación de biomasa y velocidad de crecimiento radial con dos fuentes de nitrógeno) empleado como soporte agar y rastrojo de cebada (0.5 mm).....	22
Figura 6. Diagrama de flujo para la Etapa II (Velocidad radial de <i>Pleurotus ostreatus</i> a dos porcentajes de humedad y dos fuentes de nitrógeno sobre rastrojo de cebada 0.5 mm)	24
Figura 7. Diagrama de flujo para la medición de la actividad de enzimas fibrolíticas producidas por <i>Pleurotus ostreatus</i> y análisis bromatológico	34
Figura 8. Curva estándar para Xilanasas	43
Figura 9. Curva estándar para Celulasas	44
Figura 10. Curva estándar para proteína	44
Figura 11. Actividad enzimática de xilanasas (■) y celulasas (▲) a través del tiempo (30 días de FSS), con <i>Pleurotus ostreatus</i> (Cepa IE8), con 80% de humedad. Las unidades se reportan por gramo de sustrato seco inicial (U/gss)	45
Figura 12. Actividad enzimática lacasas (■) y contenido de proteína extracelular (▲), a través del tiempo (30 días de FSS), con <i>Pleurotus ostreatus</i> (Cepa IE8), con 80% de humedad. Las unidades se reportan por gramo de sustrato seco inicial para lacasas (U/gss) y para proteína (mg/gss)	47
Figura 13. Evaluación de la estabilidad de las enzimas producidas por <i>P. ostreatus</i> IE8, xilanasas, celulasas, lacasas y proteína sobre el rastrojo de cebada, comparando su estabilidad con un extracto comercial (<i>Fibrozyme</i>)	50
Figura 14. Comportamiento de la actividad enzimática de xilanasas a través del tiempo en pH7 ♦ ($k = -0.067 \text{ h}^{-1}$ y $t_{1/2} = 10.32 \text{ h}$) y pH6 ▲ ($k = -0.017 \text{ h}^{-1}$ y $t_{1/2} = 40.79 \text{ h}$) incubada a 39 ° C. La línea punteada corresponde al ajuste del modelo	

matemático	53
Figura 15. Comportamiento de la actividad enzimática de Celulasas a través del tiempo en pH 7 ($k = -0.069 \text{ h}^{-1}$ y $t_{1/2} = 10.0 \text{ h}$) y pH 6 ▲ ($k = -0.06 \text{ h}^{-1}$ y $t_{1/2} = 11.55 \text{ h}$) incubada a 39° C. La línea punteada corresponde al ajuste del modelo matemático	55
Figura 16. Comportamiento de la actividad enzimática de lacasas a través del tiempo en pH 7 $k = -0.052 \text{ h}^{-1}$ y $t_{1/2} = 13.31 \text{ h}$ y pH 6 ▲ ($k = -0.09 \text{ h}^{-1}$ y $t_{1/2} = 7.33 \text{ h}$) incubada a 39 °C. La línea punteada corresponde al ajuste del modelo matemático	56

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

FSS	Fermentación en Substrato Sólido
PC	Proteína Cruda
PS	Proteína Soluble
CS	Carbohidratos Solubles
FDA	Fibra Detergente Acida
FDN	Fibra Detergente Neutra
MO	Materia Orgánica
MIN	Minerales
MS	Materia Seca
GDP	Ganancia Diaria de peso
EE	Extracto Etéreo
FC	Fibra Cruda
ELN	Extracto Libre de Nitrógeno
CEL	Celulosa
HEM	Hemicelulosa
LG	Lignina
EM	Energía Metabolizable
MnP	Manganeso Peroxidasa
LiP	Lignina Peroxidasa
EMA	Agar Extracto de Malta
Vr	Velocidad de Crecimiento Radial
UI	Unidad de Actividad
DIVMS	Digestibilidad <i>in vitro</i> de la Materia Seca
C.E.C.	Complejo Enzimático Comercial
$t_{1/2}$	Tiempo de Vida Media
k	Constante de Decaimiento

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD LIGNOCELULÓSICA DEL HONGO *Pleurotus ostreatus* SOBRE EL RASTROJO DE CEBADA

Luna Rodríguez Lorena, M.C.

Colegio de postgraduados, 2007

RESUMEN

Este trabajo describe la evaluación del crecimiento del hongo ligninolítico *Pleurotus ostreatus* (cepas IE8 y CP50) sobre rastrojo de cebada suplementada con fuente de nitrógeno exógena (urea o sulfato de amonio) y humedades de 70 y 80 %; inicialmente se evaluó la velocidad de crecimiento radial (V_r) en cajas Petri y rastrojo de cebada. Las V_r más altas fueron 0.568 mm h^{-1} del testigo A (CP50, 80% de humedad, Medio con agua destilada) y 0.573 mm h^{-1} del tratamiento 6 (cepa IE8, 80% de humedad, Medio base). (Ver cuadro 5, pag. 23). Al adicionar una fuente de nitrógeno exógena las cepas no mejoran su V_r ; sin embargo el 80% de humedad favoreció el V_r de ambas cepas. Con las condiciones antes mencionadas se eligió el hongo *Pleurotus ostreatus* (cepas IE8) para realizar un fermentado sólido (FSS). La cinética de producción de xilanasas, celulasas y lacasas fue evaluada durante 30d; la actividad de celulasas máxima ($15,95 \text{ U/gss}$) se registró a los 8d; mientras que para xilanasas ($80,51 \text{ U/gss}$) y lacasas ($3,46 \text{ U/gss}$) coincidió con el máximo contenido de proteína extracelular ($0,12 \text{ mg/gss}$) a los 12d de fermentación. La caracterización del extracto enzimático se realizó a temperatura controlada (39° C) a dos valores de pH (6 y 7). Las enzimas mostraron mayor estabilidad a 39° C y pH 6, con valores de actividad residual para xilanasas, celulasas y lacasas de 77,5, 49,1 y 27,5%, respectivamente luego de 15 h. A pH 7, la actividad enzimática residual fue menor y no mostró cambios significativos entre ellos (celulasas: 36,8%; xilanasas: 41,1% y lacasas: 42,1%). El análisis bromatológico reveló diferencias significativas ($P \leq 0,05$) después de 30d de fermentación en los contenidos de FDN, hemicelulosa y lignina, disminuyendo en 2,42; 7,03 y 3,79% de MS con respecto al tiempo inicial, respectivamente. La proteína bruta aumentó 0,86% de MS y la DIVMS incrementó de 39,64 a 42,36% después de 30d. El estudio muestra la factibilidad de emplear procesos biotecnológicos simples y obtener enzimas con actividad fibrolítica directamente sobre rastrojo de cebada, coadyuvando en el incremento de la digestibilidad de la fibra.

PALABRAS CLAVES: Hongos ligninolíticos, Enzimas exógenas, Fibra.

STUDY OF FIBROLYTIC ACTIVITY IN BARLEY WASTES

USING *Pleurotus ostreatus*

Luna Rodríguez Lorena, M.C.

Colegio de postgraduados, 2007

ABSTRAC

This work describes the evaluation of growth for *Pleurotus ostreatus* (white-rot fungi) (strains IE8 y CP50) on barley wastes supplemented with an exogenous nitrogen source (urea or ammonium sulphate) and moisture adjusted to 70 or 80%. Initially, radial growth rate (V_r) was evaluated on barley wastes on Petri dishes. Highest V_r were 0.568 mm h^{-1} for a control medium A (strain CP50, moisture 80% containing only distilled water) and 0.573 mm h^{-1} for treatment 6 (strain IE8, moisture 80% containing in saline solution and phosphate dipotasio. Results showed that addition of an external nitrogen source did not improve radial growth; however, adjusting initial moisture at 80% had a positive effect for both strains. After these results *Pleurotus ostreatus* IE8 was selected for further studies in solid fermentation (FSS). An enzymatic production kinetics was evaluated for 30 d for xylanases, cellulases and laccases; maximal cellulose activity (15,95 U/gss) was obtained at 8d; whereas for xylanases (80,51 U/gss) and laccase (3,46 U/gss) maximal titres were observed after 12 d, which also agreed with the maximum extracellular protein content (0,12 mg/gss). An enzymatic extract characterization was achieved at controlled temperature (39° C) and two pH values (6 and 7). The enzymatic activities showed greater stability at 39° C and pH 6, since values for residual activities for xylanases, cellulases and laccases were 77,5; 49,1 and 27,5%, respectively after 15 h. At pH 7 residual enzymatic activities were lower with no significant differences among these values (cellulases 36,8%; xylanases 41,1% and laccases 42,1%). The bromatological analysis revealed significant differences ($P < 0,05$) after 30d of fermentation in comparison to those values observed at initial time since contents of FDN, hemicellulases and lignin diminished by 2,42; 7,03 and 3,79% of DM. The gross protein increased 0,86% of DM and the DMIVS increased from 39,64 up to 42,36% after 30d. The study shows the feasibility to use simple biotechnological processes in order to obtain fibrolytic enzymes directly on barley wastes, increasing fiber digestibility.

KEYWORDS: White-rot fungi, Exogenous enzymes, Fiber.

I. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, los procesos tecnológicos a nivel mundial, están siendo evaluados con biotecnologías basadas en el crecimiento microbiano bajo sistemas de cultivo sumergido y en estado sólido. Este último consiste en el crecimiento de microorganismos en materiales sólidos con la presencia de agua libre, donde los límites óptimos de humedad varían de 40 a 80%; bajo estas condiciones los hongos son favorecidos, debido a su capacidad para crecer en medios con baja actividad de agua; mientras que a 12% la actividad biológica cesa (Moo Young, 1980).

La fermentación en substrato sólido (FSS) es un sistema heterogéneo y complejo que se ha usado para producir diversos metabolitos de interés comercial como: antibióticos, enzimas, alcohol, metano y ácido cítrico entre otros (Orzua, 2003). El crecimiento de hongos ligninolíticos en FSS es importante, pues la producción de enzimas y su actividad, permiten la remoción de carbohidratos estructurales y formación de metabolitos más simples. En el caso de producirse enzimas fibrolíticas, estas pueden utilizarse para mejorar la digestibilidad de alimentos para rumiantes, y su uso es cada vez más aceptado por los productores.

La actividad enzimática en la pared celular transforma la celulosa, hemicelulosa, lignina y otros materiales fibrosos mediante un proceso relativamente simple; por acción de enzimas fibrolíticas. Muchos hongos celulolíticos y ligninolíticos usan una gama completa de hidrolasas capaces de liberar cantidades grandes de monosacáridos a partir de los componentes de la pared celular. Sin embargo, si estos componentes se encuentran ligados al complejo lignina, resisten la hidrólisis y puede inhibir la actividad hidrolítica. Por lo anterior resulta interesante analizar los procesos de biotransformación del complejo lignino-celulosa (Lynd *et al.*, 2002) para poder acceder al más importante recurso de la pared de la célula vegetal, la celulosa y mejor aún, penetrar la gran barrera constituida por dos estructuras, la lignina y la hemicelulosa.

II. ANTECEDENTES

A nivel mundial existen diferentes especies de hongos que pueden degradar residuos agroindustriales ricos en compuestos lignocelulósicos, como pajas de trigo, cebada, maíz, etc. Los hongos del género *Pleurotus* son microorganismos cuya fase vegetativa se puede obtener fácilmente en laboratorio y se clasifican como hongos de la pudrición blanca por su capacidad para degradar lignina, celulosa y hemicelulosa. Estos hongos producen gran cantidad de enzimas fenol-oxidasas, responsables de la degradación de lignina, específicamente las lacasas que son altamente utilizadas debido a que son inespecíficas y oxidan algunos compuestos fenólicos. Estos compuestos pueden ser despolimerizados provocando su precipitación y eliminándolos de las aguas contaminadas por la industria petroquímica, textilera, colorantes y pinturas, entre otros.

Sin embargo, la biodegradación natural de subproductos agrícolas no ocurre con la misma velocidad con las que se generan, ya que se acumulan y llegan a convertirse en un peligro para el equilibrio ecológico. Por lo tanto, el principal obstáculo que limita el aprovechamiento total de la celulosa y los otros polisacáridos presentes en los residuos lignocelulósicos es la asociación íntima con la lignina, que limita la utilización de la celulosa y hemicelulosa como forraje, debido a que su digestibilidad disminuye conforme aumenta su contenido. Por ello, los residuos agrícolas de naturaleza lignocelulósica, tienen potencial para usarse en la alimentación de rumiantes, ya que pueden ser transformados por procesos fermentativos a proteínas de buena calidad (De la Torre, 1985).

Al respecto, investigaciones realizadas en la obtención de enzimas a nivel comercial han ofrecido resultados satisfactorios a un alto índice de productores (Harris, 1998), sin embargo, faltan estudios concluyentes sobre la estabilidad, dosificación y empleo correcto de los mismos.

III. JUSTIFICACIÓN

Debido a la gran diversidad y cantidad de productos comestibles procesados y consumidos en nuestra sociedad se genera una gran cantidad de desechos, que son fuente de contaminación ejemplo de ellos tenemos: las grandes cantidades de bagazo, cáscaras en la industria de jugos y bebidas, pulpa de café en la industria cafetalera, cascarillas en la industria de los cereales y el alto volumen de desechos de la industria pesquera. Algunos de los cuales no pueden ser degradados al ritmo que se producen por lo que es necesario introducir alternativas para su degradación.

Una alternativa para los residuos agrícolas es su utilización en la alimentación de rumiantes, aun cuando su baja digestibilidad limita su uso; por lo anterior se han probado diversas formas para tratarlos, entre las que destacan procesos físicos, químicos o biológicos. Sin embargo, algunos de estos ocasionan serios problemas económicos o de eficiencia, lo cual ha promovido la evaluación del potencial de enzimas exógenas para aumentar su utilización, así como de procesos biotecnológicos que permitan reducir costos y obtener de ellos mejores preparados enzimáticos (Lynd *et al.*, 2002). De tal manera que es factible evaluar la función de las enzimas exógenas en la alimentación de rumiantes.

Es conocido que los residuos agrícolas son una fuente potencial de energía abundante y barata para los rumiantes, y su digestibilidad se mejoraría mediante cultivos microbianos y enzimas fibrolíticas exógenas (Fernández *et al.*, 1981; Plata *et al.*, 1994; Roa *et al.*, 1997; Coronel *et al.*, 2001). Las enzimas fibrolíticas aisladas de cultivos de hongos y bacterias han mostrado efectos positivos al adicionarse durante el proceso de ensilaje de algunos forrajes (Stokes, 1992). Si se aplican a los forrajes antes de una incubación *in vitro* mejoran la digestión de MS y FDN, lo que sugiere que su adición directa al alimento puede mejorar la utilización del forraje (Feng *et al.*, 1996). Así, el uso de enzimas fibrolíticas exógenas se ha evaluado en forrajes de buena calidad, como la alfalfa (*Medicago sativa*) o en cereales con un contenido regular de fibra; sin embargo, no se ha evaluado en los esquilmos agrícolas.

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

1. BIOMASA VEGETAL Y RESIDUOS AGROINDUSTRIALES

El término biomasa se emplea para referirse a cualquier tipo de materia vegetal (residuos forestales, desechos lignocelulósicos urbanos, residuos agrícolas y agroindustriales). Mundialmente sólo se usa alrededor de un 7% de la biomasa producida; algunos residuos agrícolas son quemados e incorporados al suelo (Guzmán *et al.*, 1987), esta combustión no contribuye al aumento de gases con efecto invernadero porque el CO₂ desprendido en su combustión ha sido previamente fijado por la planta en su crecimiento y en menor medida usados en la alimentación animal.

En este sentido, la biomasa también puede ser factible de utilizarse en la alimentación de rumiantes, dado que presentan unos ecosistemas microbianos muy diversos adaptados para la digestión de alimentos altos en fibra. Al respecto (González, 2004) menciona que la pared celular de las plantas presentan estructuras complejas, y las propiedades químicas de algunos compuestos de la pared celular y la matriz tridimensional que se entrelaza por los polisacáridos, la lignina y los compuestos fenólicos, limitan la digestión de la pared celular por los microorganismos ruminales; sin embargo, algunos microorganismos actúan sobre compuestos específicos para degradar celulosa, hemicelulosa y lignina.

1.1 Residuos lignocelulósicos

Los componentes principales de la pared celular son: celulosa, hemicelulosa y lignina. La hemicelulosa está unida químicamente a la celulosa formando una estructura llamada microfibrillas; la lignina está en la pared celular y actúa como una barrera para la degradación biológica de los residuos lignocelulósicos (Lynd *et al.*, 2002). La celulosa (Figura 1) es el principal carbohidrato estructural sintetizado por las plantas, es un polímero de glucosa unido por enlaces β -1,4 glucosídicos tiene una estructura simple primaria y otra compleja terciaria. En las plantas, la celulosa aparece en forma de microfibrillas en paredes primarias y secundarias, como resultado de la formación de puentes de hidrógeno entre las cadenas orientadas entre los dominios paralelos ordenados y con regiones amorfas desordenadas. En la pared secundaria la celulosa

forma varias láminas donde las microfibrillas se organizan en paralelo presentando una orientación diferente en cada lámina (Beguin y Aubert, 1994).

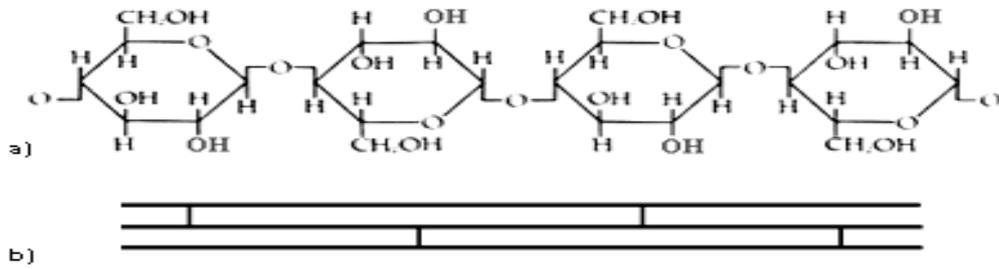
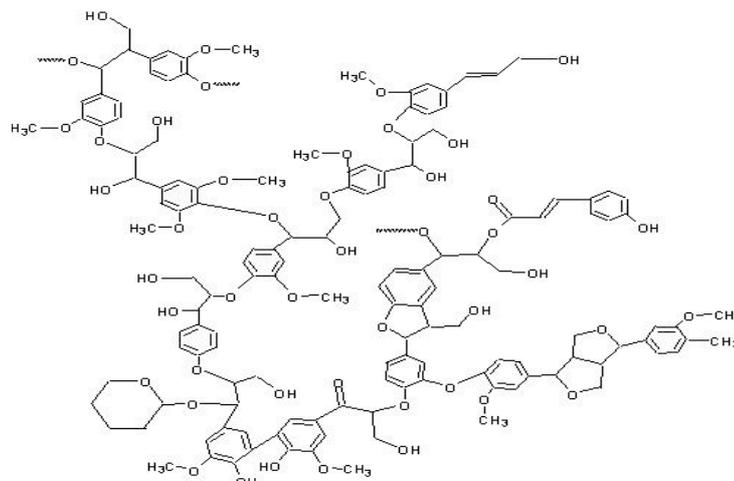


Figura 1. a) Estructura de la celulosa, b) Modelo de la celulosa unida por puentes de hidrógeno.

El complejo lignocelulosa es un conjunto de microfibras que forman parte de los componentes del polisacárido celulosa y se entrelaza en capas de lignina que las protege contra la actividad de enzimas hidrolíticas, y actúa como estabilizador de la estructura compleja dando firmeza a las plantas. El término lignina se deriva del latín “lignum” que significa madera. Klason, definió la lignina como un polímero del alcohol coniferílico, el cual se origina a partir del glucósido coniferina, presente en la savia de las coníferas; según Erdtman (1930) es el producto de la deshidrogenación de ciertos compuestos fenólicos. La lignina (Figura 2) es un polímero incrustado en la pared celular secundaria de las células de las plantas. Su estructura química es muy compleja, sus monómeros son variados y derivan principalmente del fenilpropano, siendo el producto final del metabolismo que a la muerte de la planta es degradado lentamente por hongos y bacterias (Church, 1988).



Fuente: (Jung *et al.*, 1997)

Figura 2. Estructura de la lignina

Numerosos elementos determinan la naturaleza de los procesos de biodegradación de las barreras físicas en el material vegetal; el factor más importante es la distribución del tamaño de los espacios entre los polímeros individuales, que da forma a la estructura de la pared y es similar en todas las especies forrajeras usadas para la alimentación pecuaria. La mayoría de estos espacios porosos tienen un diámetro entre 2 y 4 nm, dimensiones no suficientes para permitir la difusión libre dentro de la pared de simples enzimas globulares con masas mayores a 20 KDa (Gardner *et al.*, 1999). La porosidad de la pared y su composición cambia muy poco durante el curso de la degradación, incluso cuando 70% de la MS se ha descompuesto (Chesson *et al.*, 1986).

1.2. Estrategias para acelerar la degradación de la pared celular

La modificación de la lignina en las plantas usadas como forraje se realiza por métodos de pre-tratamiento físico o químico, aunque algunas pueden ser cuestionables desde el punto de vista económico. Un suplemento con enzimas exógenas en las dietas puede incrementar la digestibilidad de los nutrientes y aumentar la respuesta en la producción de especies pecuarias no rumiantes y rumiantes (Beauchemin *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1999).

Al respecto, las enzimas exógenas se han usado para remover factores antinutricionales e incrementar la digestibilidad de los nutrimentos, así como para complementar la actividad de las enzimas endógenas en el caso de aves (Bedford, 1993). En el caso de rumiantes tienen actividades fibrolíticas, con especificidad en celulasas y xilanasas (Beauchemin *et al.*, 2000) sin embargo algunos resultados han sido dudosos por el amplio potencial de las enzimas endógenas producidas por la microflora ruminal; el argumento utilizado para explicar los efectos positivos es: el posible beneficio que resulta de la adición de polisacaridasas extracelulares enriquecidas que causan un ataque máximo del material vegetal, proporcionando una disponibilidad adicional que estimula la velocidad del crecimiento y actividad microbiana disminuyendo el tiempo requerido para su colonización (González, 2004).

2. HONGOS LIGNOCELULÓSICOS BIODEGRADADORES DE RESIDUOS FIBROSOS

La degradación de la celulosa, hemicelulosa y lignina es esencial para mantener el ciclo del carbono en la tierra. Para llevar a cabo este proceso los microorganismos tienen que degradar primero la lignina, polímero complejo que protege a la celulosa y hemicelulosa, ya que la degradación de lignina es la etapa limitante para la utilización de estos (Pérez-Leblic *et al.*, 2005). En el reino fungi los macromicetos son los más eficientes para descomponer el carbono orgánico, identificándose a los hongos de pudrición café como uno de los grupos que degradan celulosa, hemicelulosa y lignina a pH de 2.0 a 3.0 (Rayner y Boddy, 1988).

Por otro lado, aunque muchos microorganismos están involucrados en la degradación de estos polímeros, los basidiomicetos de pudrición blanca juegan un papel importante en el proceso, ya que son los únicos capaces de degradar la lignina hasta CO₂ y H₂O, en especial cuando el contenido de este polímero en la pared celular supera el 20%. Para llevar a cabo este proceso los hongos han desarrollado un sistema oxidativo inespecífico que incluye oxido-reductasas extracelulares, metabolitos de pequeño peso molecular y especies activas de oxígeno (Pérez-Leblic *et al.*, 2005).

2.1. Hongo *Pleurotus ostreatus*

Pleurotus ostreatus es un hongo de pudrición blanca que produce degradación selectiva de la lignina durante su crecimiento sobre rastrojos, característica importante para las aplicaciones biotecnológicas basadas en la deslignificación (Pérez-Leblic *et al.*, 2005). El nombre de *Pleurotus* proviene del griego Pleura, que significa formado lateralmente por la posición del estípite respecto al píleo y *ostreatus* se refiere a su apariencia y color similar a la concha de ostión (Mao y Tyler, 1992).

2.2. Taxonomía del hongo *Pleurotus ostreatus*

Taxonómicamente los hongos están agrupados en el reino fungi, la clasificación dentro del reino es complicada y se basa principalmente en el tipo de estructura reproductiva que se forman tanto en los ciclos sexuales como asexuales. Con base en lo anterior se

clasifican en tres grandes grupos: Myxomycota (hongos mucilaginosos), Eumycota (hongos verdaderos) y Lichens (hongos simbioses).

El grupo de *Eumycota* se divide a su vez en cuatro grupos que son: Ascomicetos, Basidiomicetos, Ficomicetos y Deuteromicetos (Orzua, 2003). El hongo *P. ostreatus* es un Basidiomiceto que produce cuerpos fructíferos con forma de concha y es clasificado como se indica a continuación (Guzmán *et al.*, 2002):

Reino: Fungi

División: *Eumycota*

Grupo: Basidiomicetos

Orden: Agaricales

Genero: *Pleurotus*

Especie: *ostreatus*



2.3. Nutrición de *Pleurotus ostreatus*

El hongo *P. ostreatus* tiene un sistema enzimático muy complejo que degrada grandes polímeros (lignina y celulosa) que componen el sustrato (Guzmán *et al.*, 2002). Sin embargo, la forma de nutrición de los hongos implica la capacidad para producir enzimas hidrolíticas específicas, debido a la presencia de genes específicos. Dado que los hongos filamentosos presentan una pared celular rígida exterior a la membrana plasmática; las enzimas hidrolíticas además, deben ser secretadas al exterior de la célula, donde degradan lignina y celulosa, produciendo compuestos de bajo peso molecular que puedan ser absorbidos. La secreción de enzimas por hongos filamentosos es un proceso muy relacionado con el crecimiento y al igual que éste, la secreción está localizada exclusivamente en los ápices de las hifas (Iriarte, 2003).

2.4. Sustratos empleados en el crecimiento de hongos

Este hongo a diferencia de los champiñones no requiere sustratos compostados, degrada y se alimenta de la celulosa y la lignina presente en desechos vegetales. El cultivo de este se puede realizar en troncos o en sustratos diversos como: rastrojos de trigo, de cebada o de otros cereales; aserrín o viruta de maderas blandas no resinosas.

Estos últimos requieren un contenido de humedad promedio de 75 % y un pH entre 6.0 y 7.0. Los substratos deben ser pasteurizados antes ser utilizados para evitar posibles contaminaciones y se pueden hacer combinaciones (ejemplo: 52 % de paja de trigo + 48 % de viruta). Cabe mencionar que los rastrojos de cereales son más sencillos de pasteurizar, mientras que las virutas o el aserrín requieren un tratamiento térmico más enérgico.

2.5. Condiciones de crecimiento del Género *Pleurotus*

Cada especie tiene intervalos óptimos de temperatura y de acuerdo a esto también diferentes tipos de respuestas biológicas. Temperaturas menores a 15 °C promueven una tasa de crecimiento lineal y existe una aceleración en el crecimiento en un rango de temperatura de 15 a 30 °C. El pH tiene un efecto muy marcado en el crecimiento del hongo ya que a valores inferiores o superiores al óptimo (Cuadro 1) afecta de manera favorable el crecimiento de las especies *Pleurotus florida* y *Pleurotus eryngii*.

La concentración óptima de CO₂ varía dependiendo de la especie de *Pleurotus*, así mismo López y González (1997) mencionan que las altas concentraciones de CO₂ estimulan el crecimiento miceliar; ya que este le sirve de escudo contra otros microorganismos, los cuales no pueden crecer en estas condiciones. Con respecto al O₂ se menciona que aún cuando este hongo se desarrolle en condiciones de semianaerobiosis es necesario que una fuente de O₂ sea provista.

Cuadro 1. Condiciones óptimas de crecimiento del género *Pleurotus*

	<i>P. ostreatus</i>	<i>P. eryngii</i>	<i>P. florida</i>
Temperatura (°C)	29 ^(a)	25 ^(b)	28 ^(c)
Humedad (%)	75-80 ^(a)	75 ^(b)	75 ^(b)
pH	4.5-5.5 ^(a)	5.0 y 6.0 ^(b)	5.5 y 6.5 ^(b)
Concentración de CO ₂ (%)	28 ^(b)	22 ^(a)	28 ^(b)

Fuente:
 a) Guillen Navarro *et al.*, 1998
 b) López y González, 1997
 c) Hadar y Cohen-Arazi 1986

3. SUBSTRATOS AGRÍCOLAS TRATADOS CON *Pleurotus ostreatus* PARA LA ALIMENTACIÓN DE RUMIANTES

Cornel *et al.* (1995) observaron que *P. ostreatus* incide en la estructura de la fibra, favoreciendo la digestibilidad *in vivo* de sus componentes, sin embargo no mencionan diferencias significativas entre la paja de cebada tratada con *P. ostreatus* y la no tratada. Así mismo Soto *et al.* (2001) muestran que los componentes de la pared celular del zacate de maíz post-cultivo de *P. ostreatus* presenta valores de proteína cruda (PC) de 4.8 %, proteína soluble (PS) 1.83 % y carbohidratos solubles (CS) 2.77% y un menor contenido de Fibra detergente neutra (FDN) 60.37 %, lo cual muestra un incremento en la calidad nutritiva de este residuo atribuido al proceso de FSS.

Montañez (1999) utilizó paja de trigo tratada con *P. florida*, encontrando que, después del crecimiento del hongo, se incrementa el contenido de materia orgánica (MO) y PC, pero no incrementa la digestibilidad aparente ni las concentraciones de ácidos grasos volátiles y nitrógeno amoniacal.

Moreno *et al.* (1999) trataron paja de trigo con *P. ostreatus* y urea para la alimentación de cabritos, sin observar cambios en la digestibilidad de FDN, ni en el consumo de materia seca (MS), ganancia de peso (GDP) y eficiencia alimenticia. De manera similar Aceves *et al.* (1997) realizaron una evaluación nutricional de la paja de trigo alimentando ovinos, no encontrando diferencias significativas en los tratamientos de FDN, conversión alimenticia, GDP, sin embargo sí en la digestibilidad *in vitro* de la materia seca.

3.1. Composición de algunos residuos agrícolas más empleados en la alimentación de rumiantes

Bonilla *et al.* (1991) reportan la composición química de algunos residuos agrícolas (Cuadro 2), donde las concentraciones de PC se encuentran en un rango de 3.6 a 5.9; la EM de 1.5 a 2.0 Mcal/Kg de MS y la digestibilidad de MS de 36.2 a 60.8%. A estas características se le atribuye su baja utilización en la alimentación de rumiantes

Cuadro 2. Composición química y digestibilidad de algunos residuos agrícolas (% de MS).

Residuos (rastrajos)	EM (Mcal/kg)	PC	EE	FC	ELN	LG	CEL	HEM	DIVMS
Trigo	1.5	3.9	1.5	37.0	41.9	6.7	30.8	19.7	55.9
Cebada	1.6	3.6	1.6	37.4	41.0	8.7	37.3	25.	55.5
Arroz	1.5	3.9	1.3	33.5	39.9	5.1	16.6	-	36.2
Maíz	2.0	5.9	1.6	30.8	46.5	5.8	33.6	26.4	60.8

Fuente: Bonilla *et al.*, 1991.

4. FERMENTACIÓN EN SUBSTRATO SÓLIDO (FSS)

Raimbault (1998) define la FSS como la transformación microbiana aeróbica de un material sólido. Los organismos que pueden crecer en FSS son bacterias, levaduras y hongos; llevándose a cabo la mayoría de las investigaciones con hongos filamentosos, debido a que su crecimiento en forma de micelio, su tolerancia a bajas actividades de agua y condiciones de alta osmolaridad los hacen la microflora natural más adecuada para la fermentación sólida. Algunas características que se controlan este proceso son: humedad y aireación, estas determinan el crecimiento y desarrollo del microorganismo, ello conlleva al intercambio de gases como oxígeno y CO₂ a través de los poros del sustrato y la salida de metabolitos secundarios (Zadrazil, 1992).

De acuerdo con Raimbault (1998) el sustrato de la fermentación sólida debe cumplir con varias condiciones, mismas que cubren la mayoría de los residuos agrícolas usados para este fin:

1. Tener una matriz porosa que puede ser o no biodegradable y presentar una superficie de área por volumen en un rango de 10^3 - 10^6 cm²/cm³ que permita un crecimiento microbiano en la interfase sólido-líquido.
2. Debe absorber agua en más de una vez su propio peso, para permitir una alta velocidad en los procesos bioquímicos.
3. Que permita el paso con relativa facilidad de la mezcla de oxígeno con otros gases y aerosoles a través del cultivo microbiano.
4. Las propiedades mecánicas del sustrato sólido deben resistir la compresión y un mezclado suave (partículas que no tiendan a unirse unas con otras).

5. Debe estar libre de contaminantes y de inhibidores de crecimiento de los microorganismos y debe de ser capaz de absorber suplementos como carbohidratos, fuentes de nitrógeno y sales minerales.

En años recientes se ha reconocido las ventajas de la FSS sobre la fermentación en medio líquido; sobre todo en la producción de metabolitos fúngicos y en la producción de enzimas, cultivo de hongos comestibles, obtención de proteína unicelular, producción de esporas de hongos entomopatógenos, toxinas, antibióticos, probióticos y ácidos orgánicos, entre otros (Raimbault, 1998; Romero *et al.*, 2000).

5. COMPLEJOS ENZIMÁTICOS

Aunque existen numerosos productos enzimáticos comercializados para el ganado, estos se derivan fundamentalmente de cuatro bacterias (*Bacillus subtilis*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, *Streptococcus faecium*) y tres tipos de hongos (*Aspergillus oryzae*, *Trichoderma sp.*, *Saccharomyces cerevisiae*). La degradación de la celulosa y hemicelulosa requiere enzimas, y la diferencia en sus proporciones relativas y sus actividades individuales determinan la eficiencia para la degradación de la pared celular de estos productos comerciales. Incluso dentro de una especie microbiana aislada, los tipos y actividades enzimáticas pueden variar ampliamente dependiendo de la cepa seleccionada, del substrato de crecimiento y de las condiciones de cultivo (Gasnhe, 1992).

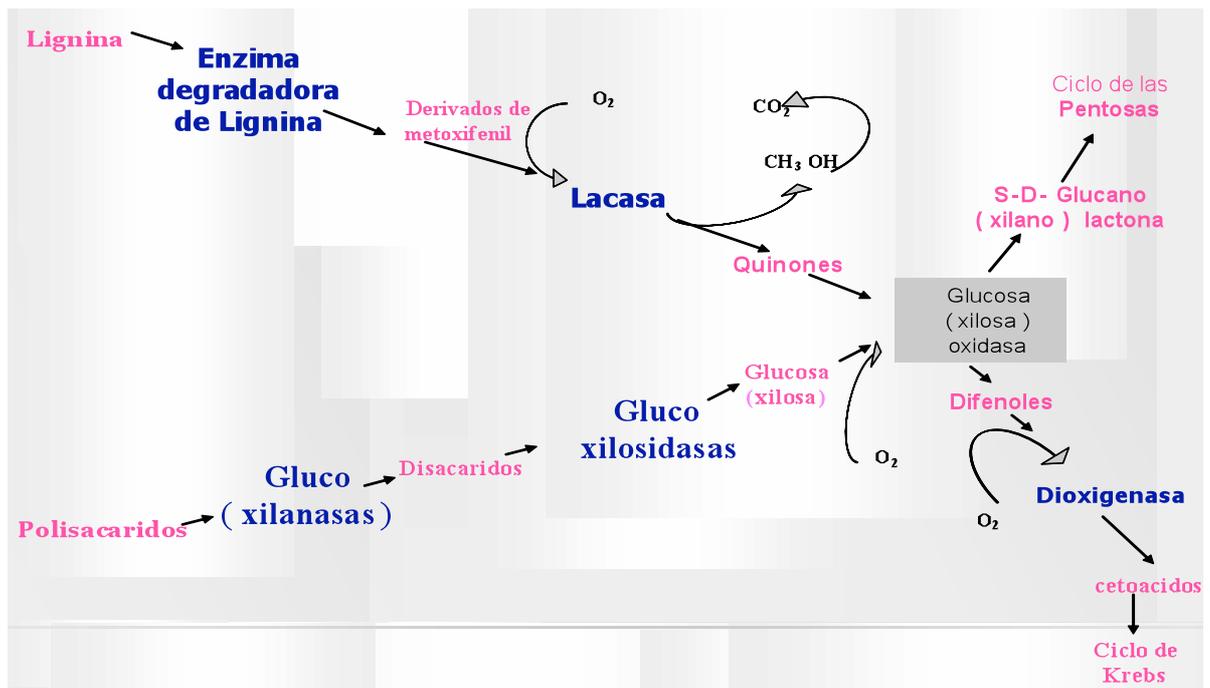
5.1. Acción metabólica de las enzimas

Leonowicz *et al.* (1997) mencionan que la degradación de substratos complejos se logra debido a la versatilidad del hongo basidiomicetos ya que cuenta con genes involucrados en la degradación de lignina, así como familias enzimáticas (Cuadro 3) responsables de la actividad de celulasas, xilanasas e hidrolasas requeridas para degradar residuos lignocelulósicos.

Cuadro 3. Algunas enzimas que actúan en el proceso de degradación de lignocelulosa.

ENZIMA	NOMBRE QUÍMICO	REACCIÓN
Celulasa	1,4-(1,3:1,4)-β-D-glucano-4-glucanohidrolasa	Endohidrólisis de 1,4-β-D-glucisídico
Endo 1,4-β-glucanasa	1,4-(1,3:1,4)-β-D-gluco-4-glucanohidrolasa	Endohidrólisis de 1,4-β-D-glucosidasa
Exo 1,4-β-glucanasa	1,4-β-D- gluco celobiohidrolasa	Hidrólisis de enlaces 1,4-β-D-glucosídicos
Endo-1,4-β-D-xilanasa	1,4-β-D-xilan xilahidrolasa	Endohidrolisis de 1,4-β-D enlaces xilosídicos en xilano
Ligninasa		Catálisis de varias oxidaciones en el grupo alquil, con ruptura de los enlaces C-C y anillos aromáticos en la cadena de lignina, oxidación de alcoholes bencil para la formación de aldehídos
Celobiosa deshidrogenasa	Celobiosa: 1-oxidoreductasa	Celobiosa + aceptor = celobiona 1,5-lactona + aceptor reducido

Según Rodríguez *et al.* (2003) los Géneros *Trametes*, *Phanerochaete* y *Pleurotus* constituyen su complejo multienzimático ligninolítico por lacasas, la cual participa en la degradación de lignina y compuestos similares en ausencia de lignina peroxidasa. La biodegradación de la lignina (Figura 3) es un proceso oxidativo que implica la acción de enzimas fúngicas y de reacciones químicas subsecuentes de los radicales aromáticos formados; este proceso es iniciado por la oxidación enzimática de las unidades de la lignina y procede por una variedad de reacciones no enzimáticas de los radicales aromáticos formados (Camarero *et al.*, 1997).



Fuente: Leonowicz *et al.* (1986)

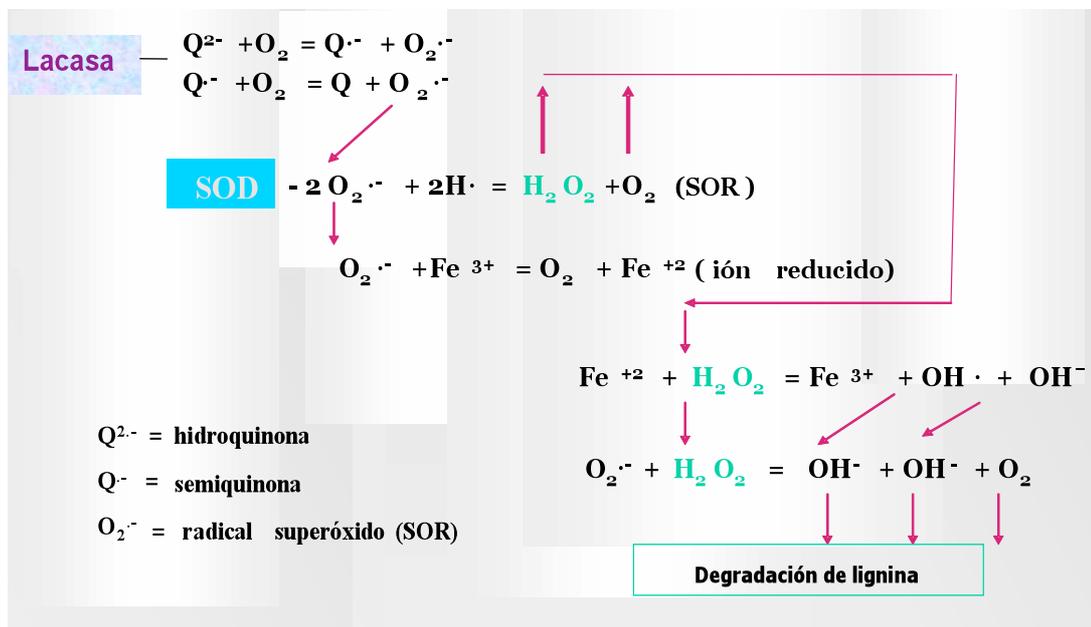
Figura 3. Enzimas que actúan en el proceso de degradación del complejo lignoceluloso.

La producción de lacasa extracelular es una característica común de los hongos de pudrición blanca (Thurston, 1994), además su sistema ligninolítico de estos incluye varias peroxidases (Martínez *et al.*, 1996; citado por Guillen *et al.*, 2000), como lignina peroxidasa (LiP) y manganeso peroxidasa (MnP) y oxidasas que producen el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Las lacasas catalizan la oxidación de una amplia gama de los compuestos fenólicos y aminos aromáticas (Thurston, 1994).

Por muchos años se pensó que el uso de las lacasas en la degradación de la lignina se limitaba a la oxidación de las unidades fenólicas y que degradaba solamente del 10 al 20% del polímero. Sin embargo, actualmente, se ha demostrado que las lacasas pueden también oxidar las unidades no fenólicas de la lignina en presencia de ciertos compuestos conocidos como mediadores naturales que son importantes porque las enzimas ligninolíticas, actúan indirectamente durante las fases tempranas de la degradación de la pared celular de la planta (Flournoy *et al.*, 1993; citado por Guillen *et al.*, 2000).

Por lo tanto, las lacasas catalizan la reducción del O₂ a H₂O por la transferencia de cuatro electrones, los semiquinones producidos en la oxidación un electrón de hidroquinones pueden autooxidarse hasta cierto punto, reduciendo el O₂ a O₂^{·-}.

Para que este mecanismo de activación del O₂ sea eficaz, es esencial que los hidroquinones estén disponibles durante la degradación de la lignina (Figura 4) y que los semiquinones sean convertidos a quinonas, principalmente vía la autooxidación (Guillen *et al.*, 2000). Las quinonas se reducen generalmente a los hidroquinones cuando están en contacto con el micelio de los hongos de pudrición blanca (Schoemaker *et al.*, 1989; citado por Guillen *et al.*, 2000).



Fuente: Leonowicz *et al.* (1986).

Figura 4. Radicales involucrados en la degradación de lignina.

5.2. Enzimas fibrolíticas exógenas

Existen diversas enzimas producidas mediante procesos biotecnológicos de fermentación, que se pueden adicionar en la dieta de rumiantes y mejorar la digestión de la fibra (Tricarico *et al.*, 1998). Las enzimas exógenas celulasas y hemicelulasas se usan en las industrias textiles, cerveceras, de detergentes y en el tratamiento de desechos animales (Selinger *et al.*, 1996).

En la producción pecuaria, las enzimas exógenas tienen diversos usos y características (Bonneau y Laarveld, 1999; Tirado Estrada *et al.*, 2001):

- 1) Remover factores antinutricionales de los alimentos.
- 2) Incrementar la digestibilidad de los nutrientes.
- 3) Complementar la actividad de las enzimas endógenas.
- 4) Tratamiento biológico de alimentos fibrosos para incrementar su valor nutritivo para los rumiantes.

Beverman (1980) clasifica las enzimas de acuerdo con el sustrato específico, por eso, los productos enzimáticos comerciales son extractos de la fermentación de origen bacteriano y fúngico, pueden tener diferente actividad enzimática; así una preparación enzimática con actividad xilanasica predominante puede tener adicionalmente actividad proteásica, celulósica, pectinasa, β - glucanasa u otras.

Al respecto, el efecto de las enzimas exógenas sobre el forraje puede ser simple, liberando carbohidratos solubles o bien complejo eliminando las barreras estructurales que limitan la digestión microbiana ruminal del alimento (McAllister *et al.*, 2001). Dentro del rumen las enzimas exógenas pueden actuar indirectamente en la actividad digestiva a través de efectos sinérgicos con los microorganismos. Martín y Nisbet (1992) han propuesto algunos modos de acción de las enzimas fibrolíticas y su utilización en la alimentación de rumiantes:

- 1) Mejor ataque y colonización microbiana de los componentes de las paredes celulares.
- 2) Mejor capacidad hidrolítica debido a la actividad enzimática o a la sinergia con enzimas del rumen o ambas.
- 3) Estimulación del número de bacterias ruminales.

5.3. Efectos de enzimas exógenas en la alimentación de rumiantes

Los primeros intentos por utilizar las enzimas exógenas en dietas para rumiantes se realizaron en la década de los sesenta (Burroughs *et al.*, 1960; Theurer *et al.*, 1963; citados por Pinos, 1999); reportando resultados variables. Sin embargo, se conoce que hay reducciones en los costos de la fermentación, la existencia de preparados enzimáticos más activos y definidos han estimulado la evaluación de la función de las

enzimas fibrolíticas en la nutrición de rumiantes (Chen *et al.*, 1995, Beauchemin *et al.*, 1997). Así, la adición de enzimas fibrolíticas exógenas al forraje durante el almacenaje o ensilado, ha tenido efectos benéficos al coadyuvar en la hidrólisis de los carbohidratos estructurales e incrementando la producción de ácido láctico que repercute en un descenso del pH y con mayor sustrato para los lactobacilos, lo cual da como resultado un producto de mayor calidad (Stokes, 1992; Henderson, 1993).

Las primeras experiencias respecto a los efectos de la adición de enzimas exógenas al forraje medido sobre la producción de leche fueron a mediados de la década de 1960 (Chen *et al.*, 1995). La aplicación directa de enzimas en el rumen ha tenido una menor repercusión que la aplicación al alimento antes de suministrarlo a los animales. Treacher *et al.* (1996) evaluaron los efectos de aplicar una mezcla de celulasas y xilanasas por aspersión al forraje e intraruminalmente a ovinos a través de una cánula, dos veces al día. Las digestibilidades de la MS y de la fibra fueron mayores cuando la mezcla se aplicó al forraje.

Otro estudio reveló que el efecto de una mezcla enzimática (celulasas y xilanasas) aplicada al forraje 24 h antes de consumirlo en dietas para novillos mejora la MS (2.7%), FDN (5.85%) y FDA (6.7%) ($p \leq 0.01$). Sin embargo, la adición directa al animal no cambió la digestibilidad del forraje; al parecer la forma líquida de la enzima causó su salida rápida del rumen ocasionando poco contacto con el sustrato (Lewis *et al.*, 1996).

La adición de una mezcla de xilanasas/celulasas a dietas con 45 a 50 % de concentrado y ensilado de alfalfa, heno de alfalfa, o una mezcla de ensilado de alfalfa, de maíz y heno de alfalfa, no cambió la producción de leche en vacas en lactancia (Luchini *et al.*, 1997; Nussio *et al.*, 1997). Pero al tratar forrajes con enzimas (celulasas y xilanasas) para vacas en lactancia temprana, se incrementó (6.3 kg d⁻¹, 16%) la producción de leche (Lewis *et al.*, 1999).

Kung *et al.* (2000) evaluaron una mezcla de heno de maíz y heno de alfalfa rociadas con enzimas (xilanasas y celulasas) antes del consumo y de la combinación (dieta, 50% forraje y 50% concentrado) observando que aumentó la producción de leche, respecto al testigo (39.5 vs 37.0 kg d⁻¹). En este sentido, en el cuadro 4 se presenta un resumen

de los resultados publicados de efectos de la aplicación de enzimas en el alimento y su efecto sobre la producción de leche.

Por otro lado, Karnezos (2000) menciona una serie de cambios en la fermentación ruminal relacionada con la adición al alimento de una enzima comercial (Fibrozyme): aumento en la digestibilidad de la MS y FDN; mayor utilización de carbohidratos, producción de amoníaco y actividad de ureasa, aumento de la producción de ácidos grasos volátiles y una disminución en la relación acetato:propionato, y pH ruminal. Por el contrario, un concentrado con una mezcla comercial de enzimas celulolíticas (10 g animal⁻¹) no cambió la ganancia diaria de peso en toretes en pastoreo (Sosa y Soto, 2001). Otro estudio demostró que al evaluar diferentes productos enzimáticos exógenos y diversas condiciones experimentales encontraron que la variabilidad es alta aunque la respuesta es positiva (Beuchemin *et al.*, 2002).

Cuadro 4. Efecto de la aplicación de enzimas en el alimento antes de la alimentación.

AUTORES	INCREMENTO EN LA PRODUCCIÓN DE LECHE, kg d ⁻¹
Beuchemin <i>et al.</i> (1999)	+0.3; +1.5
Lewis <i>et al.</i> (1999)	+1.2; +6.3; +1.6
Rode <i>et al.</i> (1999)	+3.6
<u>Schingoethe</u> <i>et al.</i> (1999)	Experimento 1 (+1.2, +0.9, +2.7) Experimento 2 (+1.3)
Yang <i>et al.</i> , (1999)	+0.9; +1.9; +1.6
Min <i>et al.</i> (2000)	-0.5; -0.5
Kung <i>et al.</i> (2000)	Experimento 1 (+2.5; -0.8) Experimento 2 (+0.7; +2.5)
Yang <i>et al.</i> (2000)	- 0.1; +2.1
Zheng <i>et al.</i> (2000)	+2.0; +4.1; +1.5
Promedio de los tratamientos	+1.60

Más de un valor significa que se ha probado más de un tratamiento enzimático. El incremento en leche es relativo a la producción de leche de las vacas testigo (Kung, 2001).

Yescas *et al.* (2002) encontraron que en borregos con cánula en rumen y alimentados con dos forrajes (rastroy de maíz y paja de avena) y un producto enzimático fibrolítico exógeno con niveles de enzima (0 y 1 g Fibrozyme kg MS⁻¹), no hubo diferencias en la digestibilidad *in situ* de MS, FDN y FDA.

Colombatto *et al.* (2003) desarrollaron ensayos *in vitro* para determinar los efectos de la adición de un producto enzimático comercial derivado de *Trichoderma reesei* sobre la hidrólisis y fermentación de celulosa, xilano y una mezcla a partes iguales de estos dos sustratos. El estudio se realizó en ausencia de líquido ruminal durante 20 h de incubación a 20 °C, se observó un incremento en la producción de azúcares reductores en el xilano y la mezcla. En otra serie de incubaciones al añadir líquido ruminal a la reacción enzimática, se demostró que la aplicación de enzimas aumenta las actividades glucanasa, endoglucanasas y β-D glucosidasa las más activas en un promedio de 85% hasta por 6 horas.

Colombatto *et al.* (2004) demostraron que el efecto del pH sobre la actividad enzimática de los productos comerciales así como la variabilidad entre ellos no es sorprendente, esto debido a las diferentes cepas de origen de los hongos y de las condiciones de crecimiento; así encontraron que la actividad xilánasica de Liquicell 2500 en el rango de pH evaluado, fue 10 veces mayor a la de Depol 40; en todos los casos la actividad endoglucanasa no es afectada por las condiciones de acidez del ensilado, mientras que las actividades celulasa y xilanasas, disminuyen al elevar el pH por arriba de 4.5, esta tendencia se manifiesta en la capacidad hidrolítica por una mayor liberación de azúcares reductores a medida que el pH es más ácido.

V. HIPÓTESIS

La inoculación de *Pleurotus ostreatus* sobre rastrojo de cebada promoverá una producción de enzimas con actividad específica (lacasas, celulasas y xilanasas), misma que actuará de manera directa sobre los componentes de la pared celular y aumentará en proteína microbiana el contenido proteico del subproducto evaluado.

VI. OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad y estabilidad enzimática de enzimas fibrolíticas fungicas del hongo *Pleurotus ostreatus* obtenidas por fermentación en substrato sólido, sobre rastrojo de cebada.

1.1. Objetivos Específicos

- Evaluación del efecto de humedad y fuente de nitrógeno exógeno como suplemento en el crecimiento micelial del hongo *Pleurotus ostreatus* sobre rastrojo de cebada.
- Determinación de la actividad enzimática del extracto enzimático (líquido) obtenido de la FSS de rastrojo de cebada.
- Evaluación de la estabilidad a pH y temperatura del extracto enzimático (líquido) obtenido por FSS.
- Caracterización nutritiva del rastrojo de cebada (extracto sólido) durante 30 días de FSS.
- Evaluar la actividad enzimática del extracto líquido obtenido por FSS con un producto comercial (Fibrozyme).

VII. RESULTADOS Y DISCUSION

ESTUDIO I. SELECCIÓN DE LA CEPA Y CONDICIONES OPTIMAS DE CRECIMIENTO DE *Pleurotus ostreatus* SOBRE RASTROJO DE CEBADA

1. INTRODUCCIÓN

La disposición final de los rastrojos afecta al medio ambiente en todas las regiones del mundo, actualmente se trata de reducir la masa de este tipo de residuos aplicando métodos biotecnológicos que permitan favorecer su reutilización. Al respecto, los materiales constituidos de celulosa, hemicelulosa y lignina pueden ser tratados con hongos filamentosos (Diorio, 2003), dado que la degradación de substratos lignocelulósicos con procesos aeróbicos mejoran su asimilación como en el caso de la FSS, donde la adición de diferentes cepas de basidiomicetos pueden transfórmalos en productos potencialmente asimilables. Sin embargo, éstas tienen diferentes exigencias para su crecimiento, como humedad, tamaño de partícula, pretratamiento, temperatura, pH entre otras (Juárez, 2000). El mecanismo de biodegradación de la lignina debido a la acción de las enzimas oxidasas extracelulares secretadas por *P. ostreatus*, se define como la combustión enzimática a compuestos simples (Camarero *et al.*, 1997).

La invasión de substratos por hongos filamentosos es evaluada mediante la velocidad de crecimiento y de igual forma su capacidad de adaptación a los nutrientes empleados en los procesos de FSS (Orzua-González *et al.*, 2001). También se ha podido apreciar que la complejidad del medio influye marcadamente sobre el crecimiento del micelio y, por tanto, en su velocidad de crecimiento y producción de biomasa (Webster *et al.*, 1971; citado por Eng *et al.*, 2003).

La finalidad del presente estudio ha sido evaluar un método sencillo y práctico para la selección de cepas de *P. ostreatus* empleando rastrojo de cebada.

2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

2.1 Localización geográfica del estudio

El presente estudio se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología y Enzimología de hongos de la UAM Iztapalapa, y en el Laboratorio de Nutrición Animal del Colegio de Postgraduados, localizado en la Carretera México Texcoco, Km. 36.5, en Montecillo, Municipio de Texcoco, Edo. de México, México.

3. ETAPAS EXPERIMENTALES DEL ESTUDIO

3.1 ETAPA I. Determinación de biomasa y velocidad de crecimiento radial comparando dos fuentes de nitrógeno

Las cepas IE8 y CP50 del hongo *Pleurotus ostreatus* se inocularon por separado sobre rastrojo de cebada molido (0.5 mm) mezclado con agar y dos fuentes de nitrógeno exógena (urea o sulfato de amonio) teniendo como variable velocidad de crecimiento radial (V_r), ver cuadro 5 para la descripción de los tratamientos.

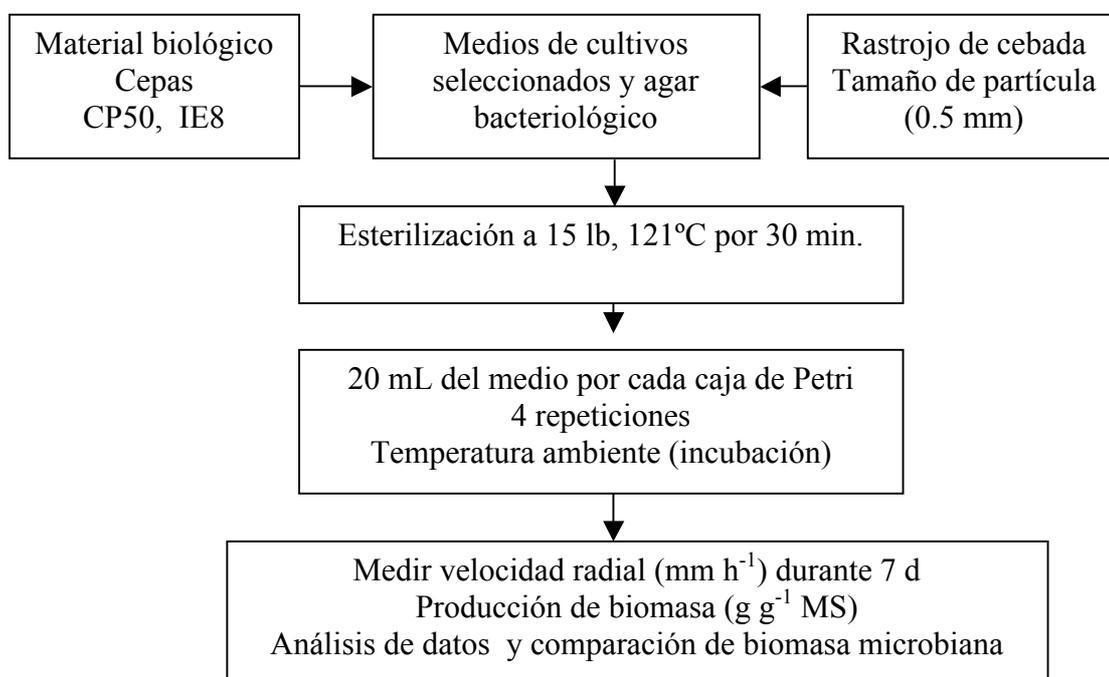


Figura 5. Diagrama de flujo para la Etapa I (Determinación de biomasa y velocidad de crecimiento radial con dos fuentes de nitrógeno) empleado como soporte agar y rastrojo de cebada (0.5 mm).

Cuadro 5. Descripción de los tratamientos para la evaluación de velocidad de crecimiento radial (mm h⁻¹) y producción de biomasa (g g⁻¹ MS).

Composición	CP50			IE8				
	Testigo	1	2	3	Testigo	4	5	6
	A				B			
Medio H₂O	Medio base con agua destilada, sin solución salina							
Medio base	Agar (15g/L)							
	Rastrojo de cebada (40g/L)							
	0.05mm							
	--				--			
	Solución salina							
	--				--			
	Fosfato dipotasio (1.0 g/L)							
Fuente de Nitrógeno	Urea (2.98 g/L)							
	--	-	-		--			
	Sulfato de amonio (6.45 g/L)							
	--	-	-		--	-		--

Nota: Este estudio se realizó en cajas de petri con agar bacteriológico

3.2. ETAPA II. Velocidad radial a distintos porcentajes de humedad y diferentes fuentes de nitrógeno sobre rastrojo de cebada

En esta etapa se determinó la Vr en rastrojo de cebada suplementando con dos fuentes de nitrógeno, a diferentes porcentajes de humedad (figura 6) y los tratamientos se realizaron en cajas de Petri como se muestran en el cuadro 6, donde el medio base y medio/H₂O no contienen agar.

Cuadro 6. Descripción de los tratamientos para la evaluación de velocidad de crecimiento radial (mm h⁻¹), sobre rastrojo de cebada (0.5 mm).

Cepa CP50				
	T ₁	T ₂	T ₃	Testigo A
80 %	Medio base, urea	Medio base, sulfato de amonio	Medio base	Medio/ H ₂ O
	T ₄	T ₅	T ₆	Testigo B
70%	Medio base, urea	Medio base, sulfato de amonio	Medio base	Medio/ H ₂ O
Cepa IE8				
	T ₇	T ₈	T ₉	Testigo C
80 %	Medio base, urea	Medio base, sulfato de amonio	Medio base	Medio/ H ₂ O
	T ₁₀	T ₁₁	T ₁₂	Testigo D
70%	Medio base, urea	Medio base, sulfato de amonio	Medio base	Medio/ H ₂ O

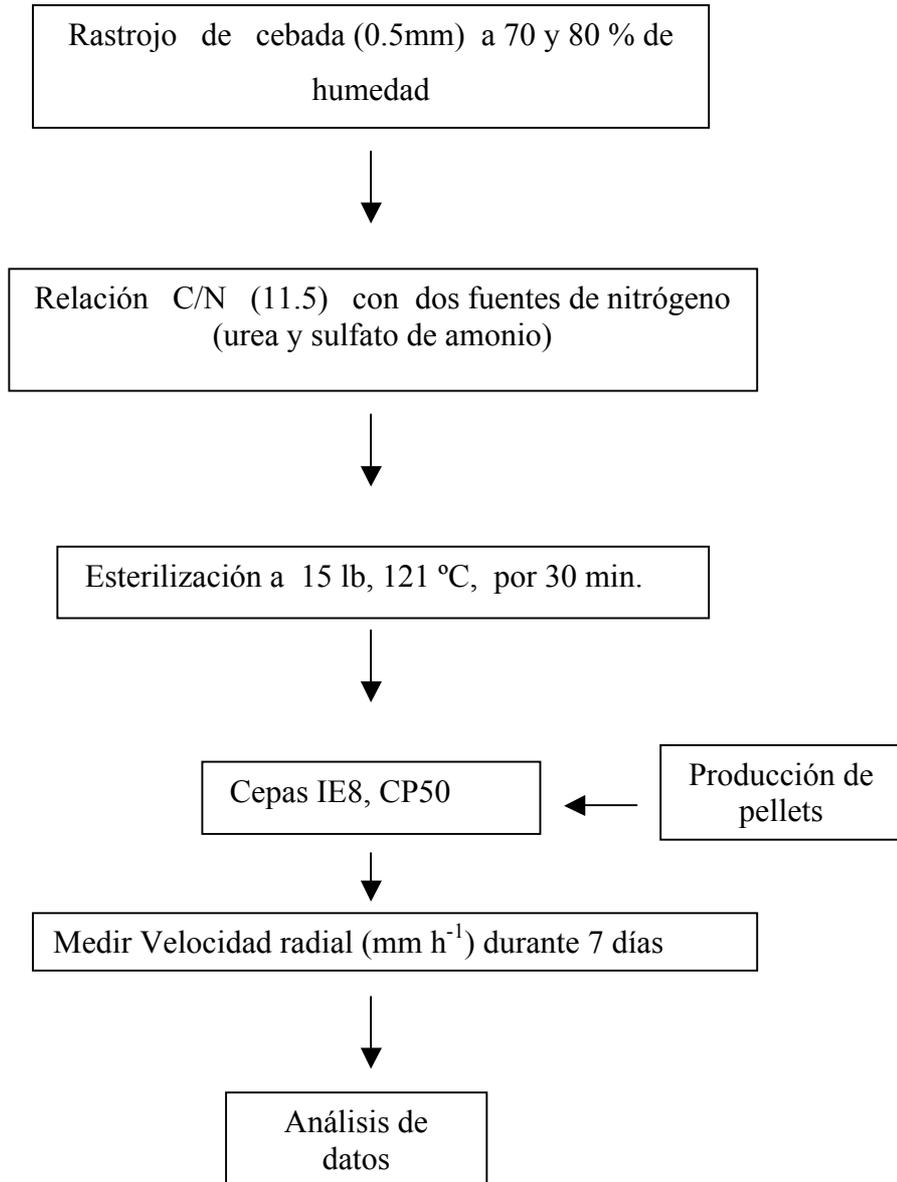


Figura 6. Diagrama de flujo para la etapa II (Velocidad radial de *Pleurotus ostreatus* a dos porcentajes de humedad y dos fuentes de nitrógeno sobre rastrojo de cebada 0.5 mm).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Material biológico

Se utilizaron dos cepas microbianas de *Pleurotus ostreatus*, la cepa CP50 de la colección de cultivos del Colegio de Posgraduados y la cepa IE8. Para reactivar las cepas se prepararon medios de cultivos estándar agar extracto de malta (EMA) y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 días.

Para la obtención de pellets, las cepas de *Pleurotus ostreatus*, se inocularon en medio líquido de EM (33.6g/L), en agitación a 100 rpm durante 5 d a temperatura ambiente. Posteriormente se filtraron los pellets, y fueron sembrados en cajas de Petri con el medio de cultivo descrito por Meneses y Paquini, (1995) en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Composición del medio de cultivo Relación C/N11.5.

Rastrojo de cebada	40.00 g
Urea ó sulfato de amonio	2.98 y 6.45g, respectivamente
Fosfato dipotasio	1.0 g
Solución salina A	10.0 mL L ⁻¹
Agua destilada	1000 mL cbp
Componentes de la Solución salina A en 1000 mL	
Sulfato de magnesio 7H ₂ O	25.0g
Sulfato ferroso 7H ₂ O	2.8 g
Sulfato de manganeso H ₂ O	1.7 g
Cloruro de sodio	1.6 g

4.2. Material vegetativo

Se utilizó rastrojo de cebada proveniente del Municipio de Texcoco, Edo. de México. El material recibió un pretratamiento antes de ser utilizado como sustrato de FSS: Se molió con malla de 0.5 mm para las etapas I y II y posteriormente se esterilizó a 15 lb, a 121°C por 30 minutos.

4.3. Velocidad de crecimiento radial (Vr)

La velocidad de crecimiento se determinó midiendo el micelio con un vernier digital, el crecimiento miceliar se midió a diferentes intervalos de tiempo (0; 8; 24; 48 h, etc., hasta la invasión completa del medio de cultivo). El cálculo se realizó mediante la ecuación enunciada por Trinci (1969), en la cual el diámetro de la colonia es una función lineal del tiempo, y la pendiente se define como la velocidad de crecimiento radial.

4.4. Determinación de biomasa

La biomasa se determinó en base al peso seco y fue medido hasta que el hongo invadió completamente la caja petri, aproximadamente 7 d de FSS; después de este periodo se separó la biomasa del agar por medio de agua hirviendo. La capa de micelio se colocó en papel filtro (Whatman No. 541) y se introdujo a una estufa por 24 h a 60° C. Por diferencia de peso se calculó la cantidad de biomasa (Ashok *et al.*, 2001).

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un análisis de varianza para diseños completamente al azar con arreglo factorial de tratamientos 2x4 y 2x2x4. Los factores las cepas de *Pleurotus ostreatus* con dos niveles de nitrógeno (urea o sulfato de amonio), un grupo testigo, y testigo un positivo, agregando al segundo diseño el porcentaje de humedad (70 y 80%).

Las variables respuesta fueron para la Etapa I:

- Velocidad de crecimiento radial (mm/h)
- Producción de biomasa (MS g/g)

Modelo estadístico etapa I:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (AB)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = variable respuesta en la repetición k, nivel j de B y nivel i de A

μ = Media general

A_i = Efecto del hongo (cepa) $i= 1,2$

B_j = Efecto del substrato (fuente de N) $j=1,2,3,4$

$(AB)_{ij}$ = Efecto de la interacción

ϵ_{ijk} = Error aleatorio

Modelo estadístico Etapa II:

$$Y_{ijkl} = \mu + A_i + B_j + C_k + (AB)_{ij} + (AC)_{ik} + (ABC)_{ijk} + \epsilon_{ijkl}$$

Donde:

Y_{ijkl} = Velocidad de crecimiento en la repetición l, nivel k de C, nivel j de B, nivel i de A

μ = Media general

A_i = Efecto del hongo (cepa) $i= 1,2$

B_j = Efecto del substrato (fuente de N) $j= 1,2,3,4$

C_k = Efecto del porcentaje de humedad (70% y 80%) $k= 1,2,$

$(ABC)_{ijk}$ = Efecto de la interacción

ϵ_{ijkl} = Error aleatorio

El procesamiento de los datos se realizó con el paquete estadístico SAS (1998) y la comparación de medias con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) (Steel y Torrie, 1986).

6. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1. RESULTADOS Y DISCUSION ETAPA I

Los resultados del Cuadro 8 muestran para los seis tratamientos y dos testigos los diferentes valores de velocidad de crecimiento radial (V_r) en la etapa I. Se observa que la mayor velocidad de crecimiento radial fue de 0.67 mm h^{-1} del testigo A para la cepa CP50, sin embargo no existen diferencias significativas con los tratamientos 1, 2 y 3. Para el caso de la cepa IE8 el testigo B presentó mayor V_r y mostró diferencias significativas con el tratamiento 5, no así con los tratamientos 4 y 6.

Cuadro 8. Velocidad radial de cepas IE8 y CP50 cultivados con diferentes fuentes de nitrógeno.

Tratamiento	$V_r \text{ (mm h}^{-1} \text{)}$
CP50	
Testigo A	$0.67 \pm 0.036_a$
1	$0.60 \pm 0.023_a$
2	$0.49 \pm 0.061_a$
3	$0.57 \pm 0.010_a$
IE8	
Testigo B	$0.61 \pm 0.009_a$
4	$0.58 \pm 0.056_a$
5	$0.38 \pm 0.045_b$
6	$0.54 \pm 0.106_a$

* Medias con la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha=0,05$)

T₁ y T₄: Urea

T₂ y T₅: Sulfato de amonio

T₃ y T₆: Medio base

Testigo A y B: Medio sin fuente mineral (s/m)

Las medias reportadas en la Cuadro 8 son mayores a los datos reportados por Rodríguez *et al.* (2003) a pH 6.5 y temperatura de 30°C reportan un crecimiento de 0.26 mm h^{-1} para *Pleurotus ostreatus*, mientras Guillen-Navarro (1998) reporta una velocidad radial de 0.023 mm h^{-1} a pH 5.5 en medio agar papa dextrosa con extracto de levadura, incubado a 26°C ; otro estudio con *Phanerochaete chrysosporium* mostró

que la velocidad de crecimiento radial para este hongo es de 0.520 mm h^{-1} a un pH de 5.3 en medio extracto de malta-agar (Rodríguez-Vázquez *et al.*, 1999).

La cepa IE8 mostró el mismo perfil que la cepa CP50, sin embargo la V_r , fue menor en todos los tratamientos donde se adicionó de sulfato de amonio, ya que este inhibe el crecimiento del hongo para ambas cepas, lo que podría indicar un factor de toxicidad. Al respecto Dianxan *et al.* (2001) demostraron que con altas concentraciones de urea se afecta negativamente el crecimiento de *P. ostreatus*. Así como Hongman *et al.* (2004) indican que la producción algunas enzimas, específicamente de lacasas se expresa mejor en sustratos con una fuente de nitrógeno limitada, que con concentraciones altas de urea (5g/ L) afectan la actividad enzimática.

Las velocidades de crecimiento radial mostraron un crecimiento relativamente rápido, si lo comparamos con microorganismos de crecimiento lento, como los hongos micorrízicos, de los cuales se menciona que para *Suillus granalatus* H13, *Amanita rubescens* H38 el valor de V_r oscila entre 0.066 mmh^{-1} y 0.12 mmh^{-1} , respectivamente, y *Gibberella fujikuroi* presenta un V_r de 0.14 mmh^{-1} a 25 °C (Volke, 1995; citado por Eng *et al.*, 2003). De este estudio se destaca que las cepas probadas no requieren de una fuente de nitrógeno externa para su crecimiento y esto puede estar relacionado con la actividad enzimática misma que estaría favorecida con este tipo de microorganismo; además significa un ahorro de reactivo para promover su crecimiento.

Los valores de biomasa (MS) de *P. ostreatus* en el Cuadro 9, muestran que no hay diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0.05$) para cada cepa. La mejor producción se presenta en el Testigo B ($Y_{x/s} = 0.32 \text{ g/gss}$), por lo que se considera a la cepa IE8 es la más eficiente en la transformación de materia seca a biomasa. Datos similares reportó Ávila (2005) donde la cepa IE8 fue la más eficiente ($Y_{x/s} = 0.033 \text{ g/gss}$) adicionando sulfato de amonio como fuente de nitrógeno; sin embargo los tratamientos con urea presentan un efecto negativo en producción de biomasa.

Tomando como base que la producción de enzimas y el crecimiento del hongo están relacionados (Fukushima *et al.*, 1991; citado por Guillen-Navarro *et al.*, 1998), se considera que la V_r y Producción de biomasa fue mejor con la cepa IE8, lo que

permitirá que esta exprese su potencial de actividad enzimática, en el substrato sin presencia de fuente de nitrógeno externa.

Cuadro 9. Promedio de rendimiento (g/gss) de las cepas IE8 y CP50 en medios con rastrojo de cebada con diferentes fuentes de nitrógeno.

Tratamiento	Rendimiento (g/gss)
CP50	
Testigo A	0.280 ± 0.002
1	0.245 ± 0.020
2	0.215 ± 0.010
3	0.177 ± 0.040
IE8	
Testigo B	0.328 ± 0.027
4	0.245 ± 0.015
5	0.235 ± 0.010
6	0.200 ± 0.475

* Las medias no son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha=0,05$)

T₁ y T₄: urea

T₂ y T₅: sulfato de amonio

T₃ y T₆: Medio mineral

Testigo A y B: agua destilada

6.2. RESULTADOS Y DISCUSION ETAPA II

En el Cuadro 10 se muestran los diferentes valores de velocidad de crecimiento radial, puede apreciarse que la mayor velocidad de crecimiento radial fue de 0.573 mm h⁻¹ del tratamiento T₉ y de 0.568 mm h⁻¹ del testigo A, sin embargo, no presentan diferencias significativas.

Cuadro 10. Velocidad radial en rastrojo de cebada con dos porcentajes de humedad (70 y 80%) y distintas fuentes de nitrógeno.

Cepa CP50				
	T₁	T₂	T₃	Testigo A
80%	0,549± 0,073 _{abc}	0,536± 0,071 _{abc}	0,558± 0,071 _{ab}	0,568± 0,040 _a
	T₄	T₅	T₆	Testigo B
70%	0,502± 0,033 _{abc}	0,427± 0,012 _{bc}	0,448± 0,000 _{abc}	0,440± 0,035 _{abc}
Cepa IE8				
	T₇	T₈	T₉	Testigo C
80%	0,486± 0,010 _{abc}	0,487± 0,080 _{abc}	0,573± 0,043 _a	0,537± 0,059 _{abc}
	T₁₀	T₁₁	T₁₂	Testigo D
70%	0,441± 0,020 _{abc}	0,417± 0,026 _c	0,44± 0,0008 _{abc}	0,451± 0,033 _{abc}

* Medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha=0,05$)

T₁,T₄,T₇ y T₁₀: urea.

T₂,T₅,T₈ y T₁₁: sulfato de amonio.

T₃,T₆,T₉ y T₁₂: Medio mineral.

Testigo A y Testigo C: Agua destilada, 80% humedad.

Testigo B: Testigo D: Agua destilada, 80% humedad.

Ávila (2005) indicó que a 80% de humedad las cepas IE8 y CP50 tienen efecto positivo sobre la Vr. En este estudio también se aprecia que en los tratamientos con 70% de humedad; no se observan diferencias significativas ($P<0.05$), mientras que para Gawande y Kamat (1999) el contenido de humedad en el sustrato es un factor importante en el desarrollo del micelio del hongo.

Por su parte Dianxia *et al.*, (2001) mencionan que a 70% de humedad del sustrato favorece el crecimiento del hongo *P. ostreatus*, y Fan *et al.*, 2000 al evaluar varios residuos de la industria del café indica que el contenido ideal para el crecimiento micelial es de 60-65% para la cáscara del café y de 60-70% para las hojas del café. Sin embargo, en este estudio al utilizar paja de cebada como sustrato, tiene la capacidad de absorber mayor cantidad de agua lo que favorece su crecimiento.

7. CONCLUSIONES

- De la etapa I se desprende que la cepa CP50 presentó mayor crecimiento radial y la cepa IE 8 fue la más eficiente en la transformación de materia seca en biomasa.
- Los tratamientos en donde se proporcionó una fuente de nitrógeno externa presentaron menor V_r , y se observó el mismo efecto en la conversión de MS a biomasa microbiana, aunque estadísticamente no mostró diferencia significativa.
- Las cepas de *P. ostreatus* utilizadas se adaptaron mejor y más rápidos en rastrojo de cebada a 80% de humedad.
- La cepa IE8 tiene mejor capacidad de adaptación sin fuente de nitrógeno y a 80% de humedad por lo que fue elegida para continuar con los estudios II y III de la presente tesis.

ESTUDIO II. PRODUCCIÓN DE ENZIMAS FIBROLÍTICAS POR *Pleurotus ostreatus* cepa IE8 EN FERMENTACIÓN SÓLIDA SOBRE RASTROJO DE CEBADA

1. INTRODUCCIÓN

Las enzimas comerciales usadas en la industria de la alimentación del ganado son productos de la fermentación microbiana, estas son producidas mediante procesos de fermentación sólida (Cowan, 1994; citado por Beauchemin *et al.*, 2003). Una vez que se completa la fermentación, la proteína enzimática es separada de los residuos en algunos casos y en otros se vende como mezcla. Los organismos con las que se producen, varían ampliamente, así como el tipo de productos enzimáticos y actividad de las mismas (Gashe, 1992). Los productos comerciales no indican un valor para la actividad enzimática, y por lo tanto, puede ser difícil distinguir comercialmente entre los productos "verdaderos" de la enzima y los productos con los niveles residuales de la actividad (Beauchemin *et al.*, 2003).

Las actividades de enzimas fibrolíticas son determinadas generalmente midiendo el incremento de azúcares reductores en los substratos puros, por unidad del tiempo, y de esta manera se calculan las unidades enzimáticas. Los azúcares reductores, incluyen los monosacáridos y los extremos libres del azúcar en oligosacáridos, mismos que son valorados por colorimetría por el método ácido dinitrosalicílico (Miller, 1959). El substrato comúnmente usado para la actividad de celulasas mide la celulosa que es la carboximetilcelulosa, que refleja la actividad de endo- β 1,4 glucanasa (Wood y Bhat, 1988; citado por Beauchemin *et al.*, 2003).

La actividad de xilanasas es medida comúnmente por la liberación de azúcares reductores a partir de xilano. Las xilanasas son específicas para los enlaces internos β -1,4 dentro de la estructura del xilano y generalmente estas son consideradas como endoxilanasas (Bhat y Hazlewood, 2001; citado por Beauchemin *et al.*, 2003). Por tanto, la disponibilidad de nuevos productos y los altos costos de producción, ha promovido la evaluación del uso de enzimas obtenidas por FSS con hongos de pudrición blanca como *Pleurotus ostreatus*, dado que cuenta con genes involucrados en

la degradación de lignina, así como las familias enzimáticas responsables de la actividad de celulasas, xilanasas y lacasas (Leonowicz, 1999).

2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

2.1. Localización geográfica del estudio

El presente estudio se realizó en las instalaciones del laboratorio de Biotecnología y Enzimología de hongos de la UAM Iztapalapa, y el Laboratorio de Nutrición Animal del Colegio de Postgraduados, localizado en la Carretera México Texcoco, km. 35.5, en Montecillo, Municipio de Texcoco, Edo. de México, México.

2.2. Diagrama de flujo experimental para la obtención de enzimas

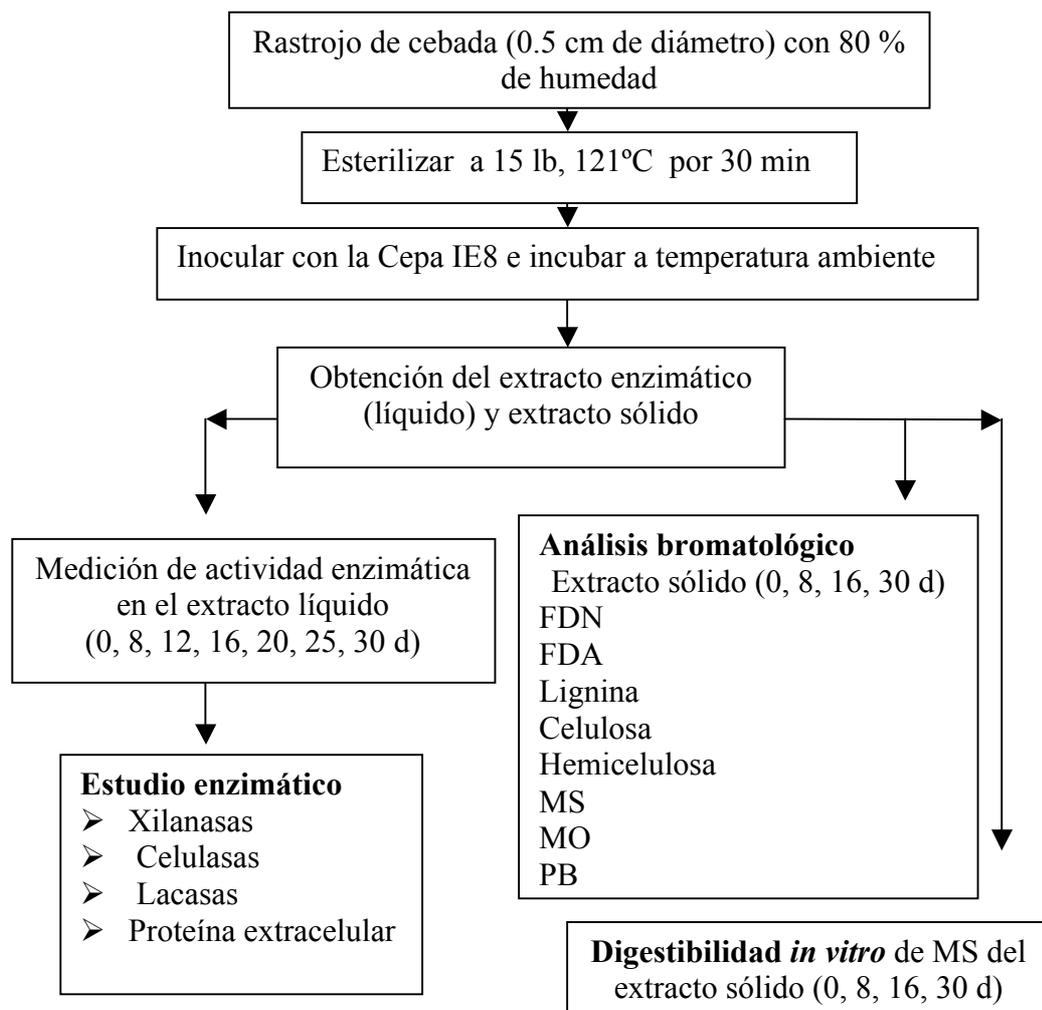


Figura 7. Diagrama de flujo para la medición de la actividad de enzimas fibrolíticas producidas por *Pleurotus ostreatus* y análisis bromatológico.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material biológico

Se utilizó la cepa IE8 del hongo *P. ostreatus*, debido a su mejor desempeño al evaluar la Vr y la Producción de biomasa.

3.2. Análisis bromatológico del rastrojo de cebada

Se realizaron análisis bromatológicos a tiempo 0, 8, 16 y 30 d de FSS analizando: Materia seca (MS), Proteína bruta (PB) por el método de Kjeldhal y Minerales (MIN), mediante las técnicas descritas por la AOAC (1995); fibra detergente neutro y ácida (FDN y FDA) por la técnica de Van Soest *et al.* (1991), y la lignina se determinó por el método de Van Soest y Wine (1991).

3.3. Digestibilidad *in vitro*

A intervalos de 0, 8, 16 y 30 d de FSS se realizó una prueba de digestibilidad *in vitro* de la MS (DIVMS) a 24h, para cada día de fermentación, se realizaron tres repeticiones y se empleó la técnica de Tilley y Terry (1963).

3.4. Preparación del extracto crudo para evaluación de actividad enzimática

Se preparó el sustrato con paja tamizada a un tamaño de partícula de 5 cm de diámetro, y se esterilizó a 15 lb. por 30 min, el sustrato contenido en un matraz de 250mL (4 gss) fue inoculado por la Cepa IE8, se tomaron muestras a los 0, 4, 8, 12, 16, 20, 25, 30 d de FSS; el día cero consistió en inocular sobre el rastrojo de cebada y el mismo día hacer la determinación de las enzimas, la extracción se realizó con 50mL (12.5 ml/gss) de buffer de citratos pH 5.3 y 0.05 M. (citrato de sodio y ácido cítrico), posteriormente los frascos se agitaron durante 30 minutos, finalmente se centrifugó a 10,000 rpm durante 20 minutos, realizándose los ensayos en el sobrenadante.

3.5. Determinación de la curva estándar de xilanasas

La actividad de xilanasas se midió por la detección de azúcares reductores usando el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959). Para realizar la curva estándar (Cuadro 11) se usó como sustrato xilano a 0.5% en medio litro de buffer de citrato 50 mM y pH 5.3 se disuelven 2.5 g de xilano; además se preparó una solución concentrada de xilosa 10 mM, 0.15 g de xilosa/100 ml de buffer de citrato 50 mM y pH 5.3 descrito por Loera y Córdova (2003) y la actividad enzimática se determinó de acuerdo a lo descrito en el Cuadro 12.

Cuadro 11. Diluciones y concentraciones de xilosa $\mu\text{mol/ml}$ para la elaboración de curva estándar.

Dilución de xilosa	Concentración de xilosa $\mu\text{mol/ml}$
Sin diluir	10
1:2	5
1:3	3.33
1:5	2
Blanco	0

Cuadro 12. Metodología para medir la actividad de la xilanasas.

	Sustrato Xilano	Buffer Citratos pH 5.3	Extracto crudo	Incubación	DNS	Extracto crudo	Hervir	Hielo
Blanco general	0.9 ml	0.1 ml	-----	50°C, 5 min	1.5 ml	-----	5 min	✓
Muestra	0.9 ml	-----	0.1 ml	50°C, 5 min	1.5 ml	-----	5 min	✓
Blanco muestra	0.9 ml	-----	-----	50°C, 5 min	1.5 ml	0.1 ml	5 min	✓

3.6. Determinación de la curva estándar de celulasas

La actividad de celulasas se midió por la detección de azúcares reductores usando el método de DNS (Miller, 1959). El sustrato es carboximetilcelulosa al 0.5% en medio litro de buffer 4.8 se disuelve 2.5 g de carboximetil celulosa; además se preparó una

solución concentrada de glucosa 10 mM (0.18 g de glucosa/100 ml de buffer pH 4.8) para realizar la curva estándar (Cuadro 13). Posteriormente se prepararan las siguientes diluciones para la realización de la curva estándar (Miller *et al.*, 1960).

Cuadro 13. Diluciones y concentraciones de glucosa para la elaboración de la curva estándar.

Dilución de glucosa	Concentración de glucosa $\mu\text{mol/ml}$
Sin diluir	10
1:2	5
1:3	3.33
1:5	2
Blanco	0

Cuadro14. Metodología para medir la actividad de celulasas.

Substrato	Carboximetil Celulosa	Buffer citratos pH 4.8	Extracto crudo	Incubación	DNS	Extracto crudo	Hervir	Hielo
Blanco general	0.9 ml	0.1 ml	-----	50°C, 30 min.	1.5 ml	-----	5 min.	✓
Muestra	0.9 ml	-----	0.1 ml	50°C, 30 min.	1.5 ml	-----	5 min.	✓
Blanco muestra	0.9 ml	-----	-----	50°C, 30 min.	1.5 ml	0.1 ml	5 min.	✓

3.7. Determinación de la actividad de lacasas

El sistema de reacción de 3 ml para determinar la actividad de lacasas se compone de: 0.3 ml de amortiguador de acetatos 0.1 M pH 5.0, además de 2.1 ml de agua destilada, 0.3ml del extracto enzimático sin diluir y 0.3 ml de substrato ABTS [se disuelven 0.69 g de ácido 2, 2' azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) en 250 ml de buffer de acetatos pH 5.0]. El coeficiente de extinción molar para ABTS es $36,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. (Bressler *et al.*, 2000). El sistema de reacción sin el substrato se preincuba durante un minuto a 40°C. Posteriormente se adiciona el substrato y se miden los incrementos de la absorbancia a una longitud de onda de 420 nm a los 0, 1, 2, 3, 4 y 5 minutos.

Una unidad de actividad (UI) se define como la cantidad de enzima que oxida 1 μmol de sustrato por minuto bajo las condiciones de reacción. La determinación de la actividad de lacasas en todos los casos se hizo por duplicado (Wolfenden y Wilson, 1982).

3.8. Determinación de Proteína extracelular

El sistema de reacción de 3 ml se compuso por 2400 μL del extracto enzimático diluido (1:100) en solución de amortiguador de acetatos 0.1 M pH 5, y se le añadió 600 μL de reactivo de Bradford (Bio-RAD). Se agitó vigorosamente en un vortex, y se dejó reaccionar por 5 minutos, posteriormente se registró la absorbancia a 595 nm en una celdilla de acrílico; se realizó la lectura en un espectrofotómetro (Cari 1E Varian). La cantidad de proteína se calculó en base a una curva patrón utilizando seroalbúmina bovina en agua destilada a concentraciones de 0, 2, 4, 6, 8 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Bradford, 1976).

4. ANALISIS ESTADISTICO

De los datos obtenidos del análisis químico proximal se realizó un análisis de varianza con diseño completamente al azar y una comparación de medias con el método de rango múltiple de Tukey ($P \leq 0,01$).

5. RESULTADOS

5.1 Análisis bromatológico y digestibilidad de la materia seca del rastrojo de cebada

Antes de realizar la FSS se realizó un análisis del rastrojo de cebada (% MS) para saber las características nutritivas del sustrato. En el Cuadro 15 quedan representados los valores del análisis en cuestión.

Cuadro 15. Análisis bromatológico del rastrojo de cebada.

VARIABLES BROMATOLOGICAS	% MS
FDN	77.35±0.53
FDA	54.38±0.10
Lignina	19.10±0.39
Celulosa	33.87±0.46
Hemicelulosa	22.05±0.42
Proteína	3.62±0.121
MS	97.04±0.08
MO	87.89±0.05
Cenizas	8.23±0.08
DIVMS (24 h)	39.66±1.05

Nota: Rastrojo de cebada, sin pre-tratamiento y con tamaño de partícula 0.05mm. N

5.2 Análisis bromatológico y digestibilidad de la materia seca del rastrojo de cebada fermentado con *P. ostreatus*.

En el Cuadro 16 se presentan los componentes bromatológicos del rastrojo; varían ya que es sabido que el mecanismo fundamental de la degradación de la pared celular esta dado por dos factores importantes: la cantidad de área superficial disponible para colonización y la composición química de la superficie disponible (Din *et al.*, 1991).

En relación a la FDN se observa que disminuye al final del periodo de fermentación, pero no presenta diferencias significativas al ($p \leq 0.05$) con el tiempo cero, al respecto Ortega *et al.* (1986) en un estudio con paja de cebada y *P. ostreatus* observaron una disminución de la FDN el día 45 y 60. De manera similar Adamović *et al.* (1998) analizó la biodegradación de la paja del trigo por *P. ostreatus* los días 15, 30, 45, 60, 90 y 120 después de la inoculación, encontrando una disminución de FND y FAD, y una tendencia similar para hemicelulosa y celulosa, mientras que para la lignina no fue tan pronunciada. De manera similar, Zadrazil (1984; citado por Montañez, 1999) indica que los efectos más notables son para los componentes de la membrana celular aun cuando a *P. ostreatus* se incluye dentro del grupo que metaboliza simultáneamente celulosa, hemicelulosa y lignina.

Cuadro 16. Análisis bromatológico del rastrojo de cebada a los 8, 16, y 30 días de FSS.

VARIABLES (% MS)	0 d	8 d	16d	30d
FDN	75.15±0.00 _{ab}	77.38±0.168 _a	78.34±0.365 _a	72.74±1.464 _b
FDA	51.80±0.00 _b	53.82±0.846 _b	57.97±0.240 _a	56.73±0.985 _a
Lignina	21.15±1.374 _a	20.48±0.571 _a	21.30±0.177 _a	17.36±0.247 _b
Celulosa	29.43±1.677 _b	32.01±0.263 _{ab}	35.21±0.061 _{ab}	37.80±0.708 _a
Hemicelulosa	22.41±1.308 _a	22.62±0.650 _a	19.55±0.581 _{ab}	15.38±2.351 _b
Proteína	3.09±0.091 _b	3.43±0.029 _b	3.31±0.017 _b	3.95±0.081 _a
MS	96.14±0.071 _a	96.10±0.085 _a	95.92±0.017 _a	96.14±0.389 _a
MO	88.58±0.139 _a	88.10±0.080 _{ab}	88.38±0.224 _{ab}	87.89±0.052 _b
Cenizas	7.42±0.139 _a	7.90±0.080 _{ab}	7.62±0.224 _{ab}	8.11±0.052 _a
DIVMS (24 h)	39.64±0.707 _b	42.88±0.041 _a	40.08±0.231 _b	42.36±0.140 _a

a, b, c valores con distintas literales entre hileras son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha=0,05$)

También se observa una disminución de la concentración de lignina y hemicelulosa y un aumento en la celulosa conforme el periodo de incubación avanza similar a lo reportado por Apréaz (1989). Lo anterior se explica en las figuras 11 y 12 de este estudio donde se obtienen las máximas actividades enzimáticas, desdoblando primero la lignina para liberar hemicelulosa y celulosa; lo cual nos indica que la degradación del material se da en función al material expuesto y también de la actividad enzimática que se presente.

La FDA aumenta significativamente los días 16 y 30, con respecto a los componentes de esta fracción, la lignina tiende a disminuir significativamente el día 30 de la fermentación con valores de 17.36% MS; sin embargo la celulosa no presenta diferencias significativas conforme el periodo de incubación avanza, resultados similares fueron encontrados al inocular *P.ostreatus* sobre paja de trigo (Montañez, 1999) y en rastrojo de maíz (Avila, 2005).

Cornel et al. (1995) observaron que las cepas de hongos *P. ostreatus*, inciden en la estructura de la fibra, favoreciendo la digestibilidad de sus componentes, en la digestibilidad in vivo. Sin embargo no encontraron diferencias significativas entre la

paja tratada con *P. ostreatus* y la no tratada, así mismo Moreno *et al.* (1999) reporta que en paja de trigo y urea *P. ostreatus* no incide cambios en la digestibilidad de la FDN.

Por otra parte Jung (1992) evalúa el potencial de cinco basidiomicetos en la degradación ruminal de paja de avena y alfalfa, inoculados por 30 d a 28°C y 90% de humedad, observando pérdidas de MS para todas las especies de basidiomicetos en ambos sustratos. La lignina fue removida de la paja de avena por *Phanerochaete chrysosporium* y *Phlebia tremellosa*, pero no se observó pérdida de lignina para la alfalfa. En este mismo contexto *P. chrysosporium*, *P. ostreatus*, demostraron una alta capacidad para la degradación de la lignina en pH de 9.0 a 11.0 (Wu *et al.*, 2005). En el presente trabajo la digestibilidad *in Vitro* (DIVMS) presenta su máximo el día 8 y 30 de la fermentación con valores superiores a 42 % MS, mostrando diferencias significativas entre los días 0 y 16 de la FSS (Cuadro 16), encontrando un incremento porcentual del 3.0% respecto a la digestibilidad más baja en el día cero. Ávila (2005) al estudiar rastrojo de maíz como sustrato de FSS no encuentra ningún aumento en la DIVMS tras 30 de FSS, lo que indica que el hongo tiene mayor afinidad a ciertos sustratos y con ello se activan algunas enzimas, es decir la actividad enzimática se define por el tipo de sustrato, lo que la hace específica.

Algunos ensayos indican que la materia seca de las pajas es degradada por las enzimas del *P. ostreatus*. Por ejemplo, Adamović *et al.* (1998) analizó la biodegradación de la paja del trigo para los días 15, 30, 45, 60, 90 y 120 después de la inoculación. La FND disminuyó de 824 a 485 g kg⁻¹ y la FAD de 561 a 412 g kg⁻¹; reportando una tendencia similar para hemicelulosa y celulosa, mientras que para la lignina no fue tan pronunciada. Nicolini *et al.* (1993) realizaron la digestibilidad *in vitro* del bagazo de naranja y desperdicios de destilería (uva) después de la fermentación por los basidiomicetos *Pleurotus ostreatus*, *Agrocybe aegerita* y *Armillariella mellea*. Los resultados obtenidos, fueron comparados con los de la fermentación de la paja de trigo. La digestibilidad de desperdicios de destilería se incrementó por el crecimiento de *P. ostreatus* en un 16.22% y para *Agrocybe aegerita* en un 4.24% y se observó la pérdida de lignina y aumento de la proteína bruta en los productos finales.

En relación al contenido de proteína bruta esta se incrementa significativamente al día 30 de la fermentación, enriqueciendo al rastrojo de cebada tratado con *P. ostreatus*, esto se atribuye a un mejor aporte de proteína microbiana. De manera similar, Dianxia *et al.* (2001) y Jung *et al.* (1992) encontraron que el contenido de proteína bruta se incrementa durante el proceso de fermentación de *P. ostreatus*, por otro lado Adamović *et al.* (1998) al inocular en rastrojo de trigo con diferentes cepas de *P. ostreatus*, mencionan que la proteína bruta tiene un incremento progresivo hasta el día 60. Así mismo Montañez (1999) utilizó paja de trigo tratada con *P. florida* encontrando que el crecimiento del hongo incrementa el contenido de materia orgánica y proteína bruta a diferencia de Bonatti *et al.* (2004) quienes utilizan paja de trigo y desechos de plátano para inocular a *P. ostreatus* no reportan un incremento significativo del contenido de proteína durante el periodo de fermentación.

Gurrolla *et al.* (2001) inocula con *Pleurotus ostreatus* sobre rastrojo de maíz incrementando el contenido de proteína cruda durante el proceso de fermentación de substrato sólido mejorando al inicio de la fructificación, pero disminuyendo a medida que el proceso continua.

5.3 Producción de enzimas fibrolíticas por *Pleurotus ostreatus* IE8 en fermentación sólida sobre rastrojo de cebada.

A partir de los datos que se presentan en la figura 8 se obtuvo la línea de regresión, los parámetros de pendiente y ordenada al origen de la ecuación de la recta. Con estos valores es posible relacionar la absorbancia con una concentración de azúcares reductores presentes en la muestra (Miller, 1959).

Con los datos de absorbancia en el espectrofotómetro se elaboró la curva estándar para xilosa (Figura 8).

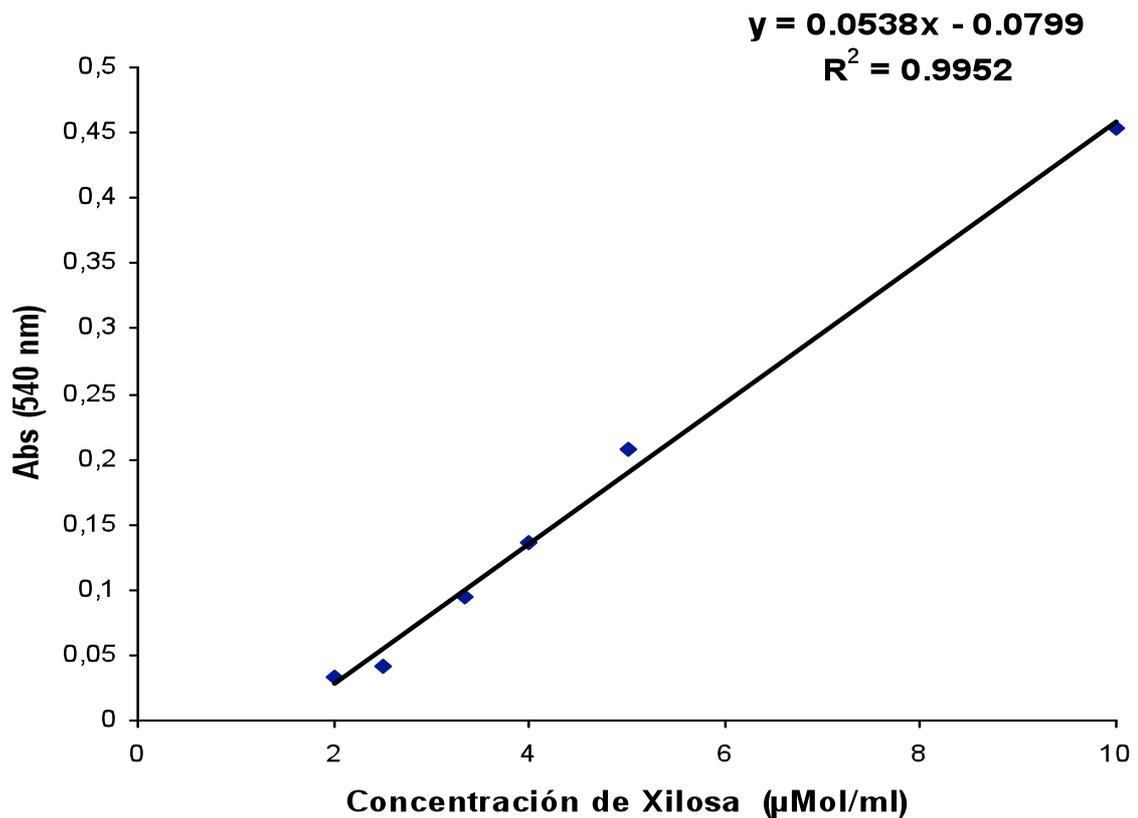


Figura 8. Curva estándar para Xilanasas.

$$y = mx + b$$

Donde:

y = absorbancia

x = concentración de azúcares reductores, con equivalentes de xilosa.

b = ordenada al origen

De la misma manera se elaboró la curva estándar de celulasas (Figura 9) y la curva estándar para proteína (Figura 10) utilizando seroalbumina como patrón de referencia, obteniendo la regresión lineal con los parámetros de pendiente y ordenada al origen de la recta.

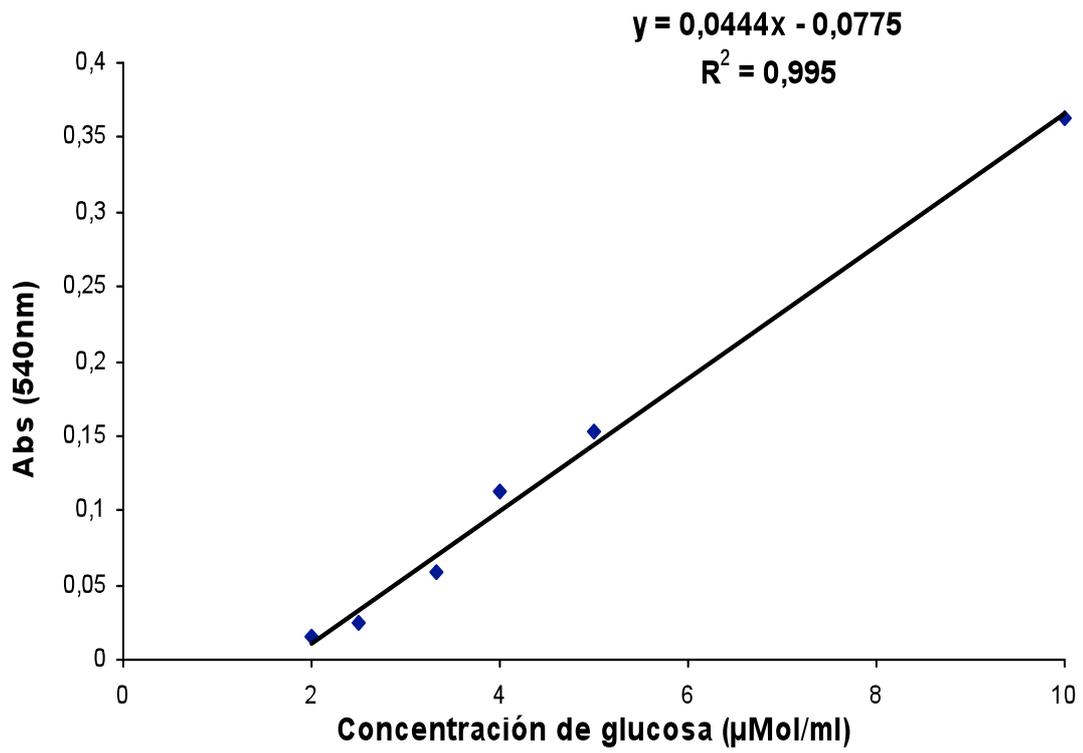


Figura 9. Curva estándar para Celulasas.

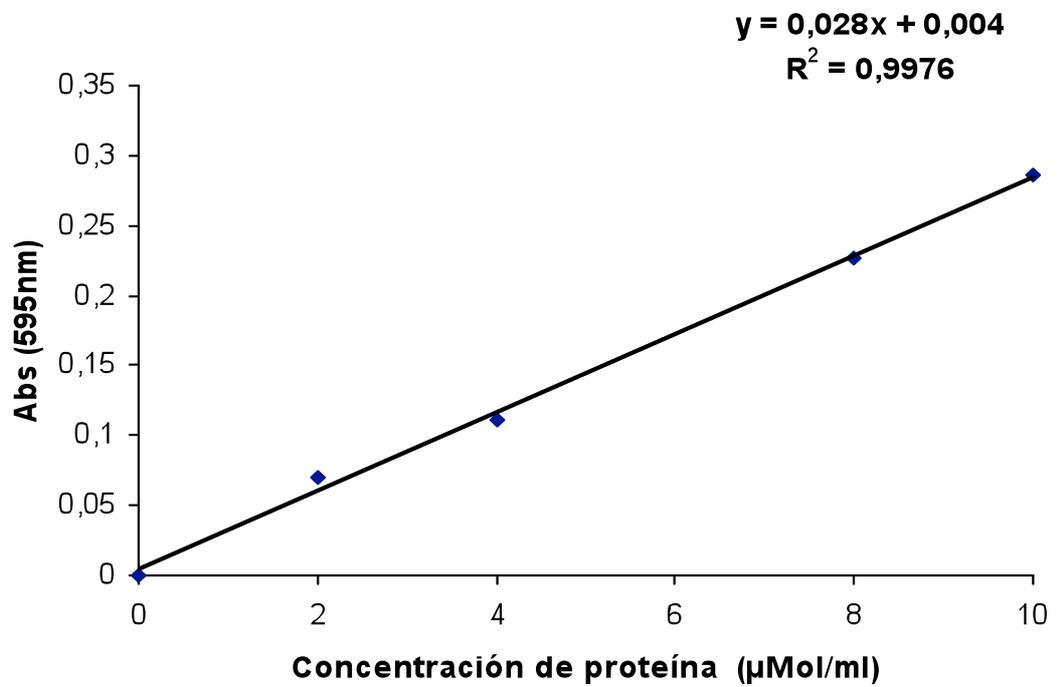


Figura 10. Curva estándar para proteína.

En la figura 11 se muestra que la máxima actividad enzimática para xilanasas fue 80.51 U/gss el día 12 de la fermentación en substrato sólido (FSS); posteriormente ésta empieza a disminuir, para después tener un segundo pico de producción el día 25 con 67.24 U/gss la cinética describe un comportamiento atípico y muestra que la actividad xilanasas puede prolongarse hasta por 24h. En este sentido Cai *et al.* (2004) indican que existe en el perfil enzimático al menos un pico de producción a lo largo de una fermentación.

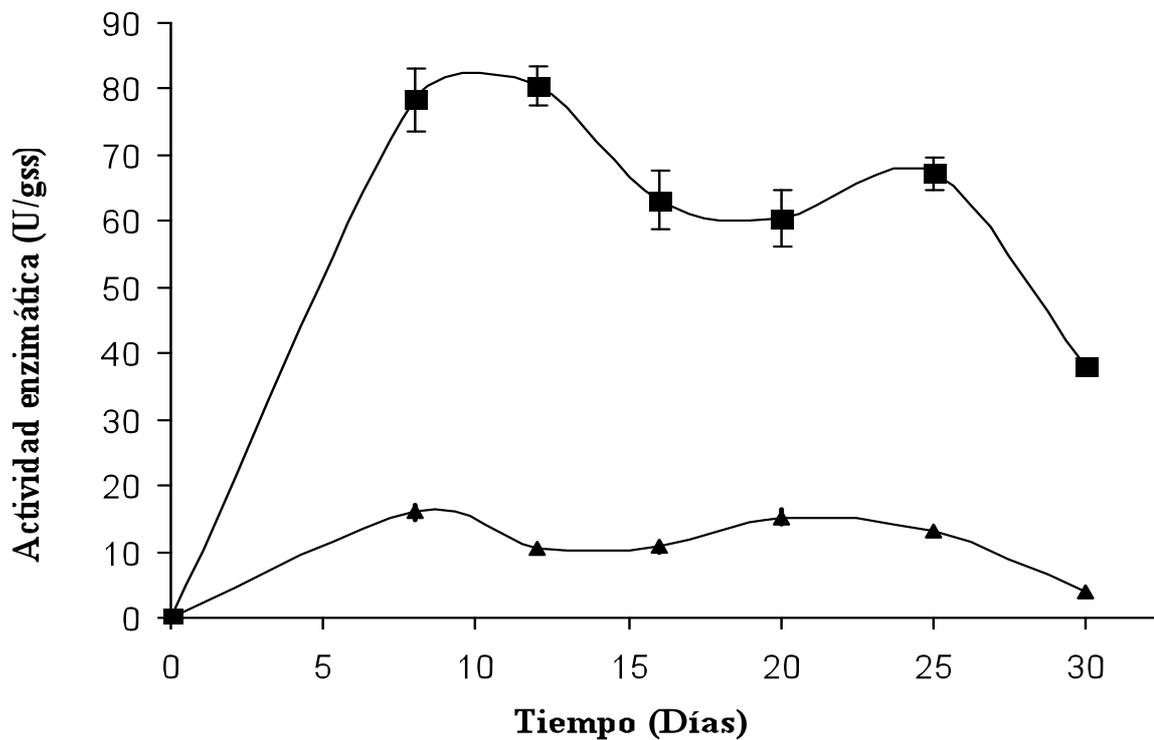


Figura 11. Actividad enzimática de xilanasas (■) y celulasas (▲) a través del tiempo (30 días de FSS), con *Pleurotus ostreatus* (Cepa IE8), y 80% de humedad. Las unidades se reportan por gramo de substrato seco inicial (U/gss).

La actividad máxima reportada por diversos autores no presenta uniformidad, ya que mientras Cia *et al.* (2004) reportan que utilizando un substrato de rastrojo de maíz y salvado de trigo, el perfil enzimático máximo de *P. ostreatus* para xilanasas se presenta el día 7 (24.98 U/ml), disminuyendo posteriormente. Reddy *et al.* (2003) encuentran que la actividad máxima de xilanasas (0.1435 U/mg). En otro estudio realizado en placas de agar enriquecido con glucosa y licor de maíz se reportó para xilanasas una actividad de 22 U/gss (Eichlerová *et al.*, 2000). Lo anterior indica nuevamente que los

hongos que degradan compuestos fibrolíticos tienen un complejo enzimático capaz de degradar una gran diversidad de componentes de la pared celular y en función del tipo de sustrato que se trate y de las condiciones de cultivo, esta actividad puede ser más acentuada ó disminuida.

En la figura 11 se observa que la mayor actividad para celulasas se presenta el día 8 de la fermentación (15.95 U/gss) descendiendo posteriormente y teniendo un segundo pico de producción el día 20 (15.18 U/gss) esta actividad se muestra mucha similitud con los estudios reportados por Kumaran *et al.* (1997) quienes trabajaron con *P. ostreatus* y encontraron una actividad de carboximetil celulasa de 0.56 U/gss en una FSS usando residuos agrícolas enriquecidos con urea y sales de fosfato; mientras que Ávila (2005) empleando rastrojo de maíz reporta la mayor actividad el día 12 (0.073 U/gss) de FSS. La actividad reportada en este estudio es muy similar si se compara con lo encontrado por Amare y Gashaw, (1999) quien reporta altos niveles de celulasas (12.5 U/gss) de la fermentación de *Bacillus sp* AR-009 inoculado sobre salvado de trigo.

En la figura 12 se observa que la máxima actividad de lacasas (3.46 U/gss) fue en el día 12 de FSS, descendiendo para posteriormente tener un segundo pico de producción (2.0 U/gss) el día 20. Esta actividad es similar a lo reportado por Kumaran *et al.* (1997), quienes reportan títulos alcanzados hasta de 4.54 U/gss para lacasas, de la misma forma Avila (2005) reporta una máxima actividad el día 8 de la FSS (5.38 U/gss) para *P. ostreatus* utilizando como sustrato rastrojo de maíz; sin embargo Vay y Molitoris, (1995; citado por Guillen-Navarro *et al.*, 1998) al evaluar a *P. ostreatus* en fermentación sólida en paja, obtienen una actividad máxima de lacasas de 0.015 U/g. Mientras en fermentación líquida Guillen-Navarro *et al.*, (1998) reportan una producción en lacasas de 307 U/l; y Hongman *et al.*, (2004) empleando *P. ostreatus* reporta en el día 14 la mayor actividad enzimática de 130 U/ml utilizando un medio bajo en carbono.

De acuerdo a lo anterior, los perfiles enzimáticos varían de acuerdo al sustrato utilizado en la fermentación, en concreto para producción de lacasas los sustratos con una fuente limitada de nitrógeno favorecen su expresión y la disminuyen en sustratos con altas concentraciones de este (Hongman *et al.*, 2004).

Respecto al contenido de proteína extracelular en este estudio se observó un máximo de 0.114 mg/gss el día 25 de FS (Figura 2). En el trabajo de Gawande y Kamat, (1999) sobre salvado de trigo de *P. ostreatus* reportan un incremento de proteína extracelular con respecto al grupo testigo el día 4 (1.5 mg/ml). Así mismo Avila, (2005) reporta que *P. ostreatus* el día 8 presenta un máximo contenido de proteína extracelular de 6.4 mg/gss, atribuyendo esto a que el hongo transforma la proteína del substrato a proteína microbiana mejorando la calidad del rastrojo de maíz, ya que las enzimas que produce *P. ostreatus* son proteínas globulares que se unen a un substrato (rastros) de tal modo que se ve un incremento en la cantidad de proteína extracelular.

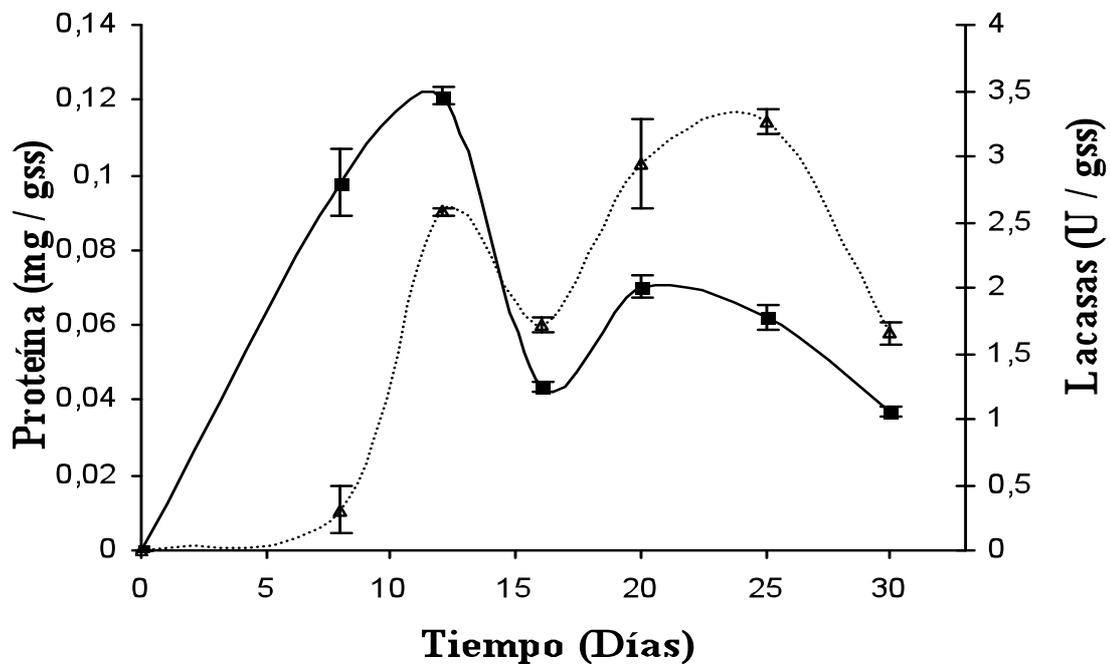


Figura 12. Actividad enzimática de lacasas (■) y contenido de proteína extracelular (▲), a través del tiempo (30 días de FSS) con *Pleurotus ostreatus* (Cepa IE8) y 80% de humedad. Las unidades se reportan por gramo de substrato seco inicial para lacasas (U/gss) y para proteína (mg/gss).

6. CONCLUSIONES

- La cepa IE8 de *Pleurotus ostreatus* produjo una actividad enzimática para xilanasas de 80.51 U/gss y para lacasas de 3.46 U/gss después de 12 días de fermentación en sustrato sólido (FSS), mientras que las celulasas alcanzaron valores de (15.95 U/gss) y el máximo contenido de proteína extracelular (5.74 mg/gss).
- El contenido de proteína bruta se incrementa significativamente el día 30 de la fermentación.
- El contenido de lignina tiende a disminuir significativamente el día 30 de la fermentación y la digestibilidad *in Vitro* (DIVMS) aumenta de forma significativa el día 30 de la fermentación.
- El rastrojo de cebada es un sustrato que beneficia la producción de enzimas celulasas de *P. ostreatus*, no así la producción de xilanasas y lacasas.

ESTUDIO III. ESTABILIDAD DE XILANASAS, CELULASAS Y LACASAS PRODUCIDAS POR *Pleurotus ostreatus* CEPA IE8 A DIFERENTE PH

1. INTRODUCCION

Las medidas de la actividad enzimática se deben realizar bajo condiciones definidas con respecto a temperatura, pH, concentración del substrato, y tipo del substrato, puesto que todos estos factores afectarán la actividad de una enzima. Las actividades enzimáticas de los productos comerciales se miden típicamente (grados óptimos recomendados), a una temperatura de 60 °C y de un pH entre 4 y 5.5, las cuales son condiciones óptimas para la mayoría de las enzimas comerciales (Coughlan, 1985). Sin embargo, la temperatura y el pH óptimos para determinar actividad enzimática no son representativos de las condiciones del rumen, que están más cercano a un pH de 6.0 a de 6.7 y de 39°C (Van Soest, 1994). Hay evidencia que indica que al aplicar enzimas exógenas al alimento antes del consumo, favorece la liberación de carbohidratos solubles (Hristov *et al.*, 1996), y en algunos casos, solubilidad parcial de FND (Krause *et al.*, 1998).

Nsereko *et al.* (2000) demostraron que la aplicación de las enzimas al alimento provoca cambios estructurales, de tal modo que hace la alimentación más favorable a la degradación. La hidrólisis de los carbohidratos de la pared celular en el rumen procede de una manera erosiva, y una parte principal para que se lleve a cabo de manera eficiente la digestión es la colonización y la penetración microbios celulolíticos, junto con sus enzimas hidrolíticas sobre las superficies expuestas de las partículas del alimento. En situaciones donde la degradación de la fibra se ve comprometida, las enzimas exógenas pueden mejorar la degradación de los carbohidratos estructurales (Krause *et al.*, 1998).

2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

2.1 Localización geográfica del estudio

El presente estudio se realizó en las instalaciones del laboratorio de Biotecnología y Enzimología de hongos de la UAM Iztapalapa, y el Laboratorio de Nutrición Animal del Colegio de Postgraduados, localizado en la Carretera México-Texcoco km. 35.5, en Montecillo, Municipio de Texcoco, Edo. de México, México

2.2. Diagrama de flujo experimental para la evaluación de la estabilidad de enzimas fibrolíticas fúngicas obtenidas de la FSS con *P. ostreatus* cepa IE8.

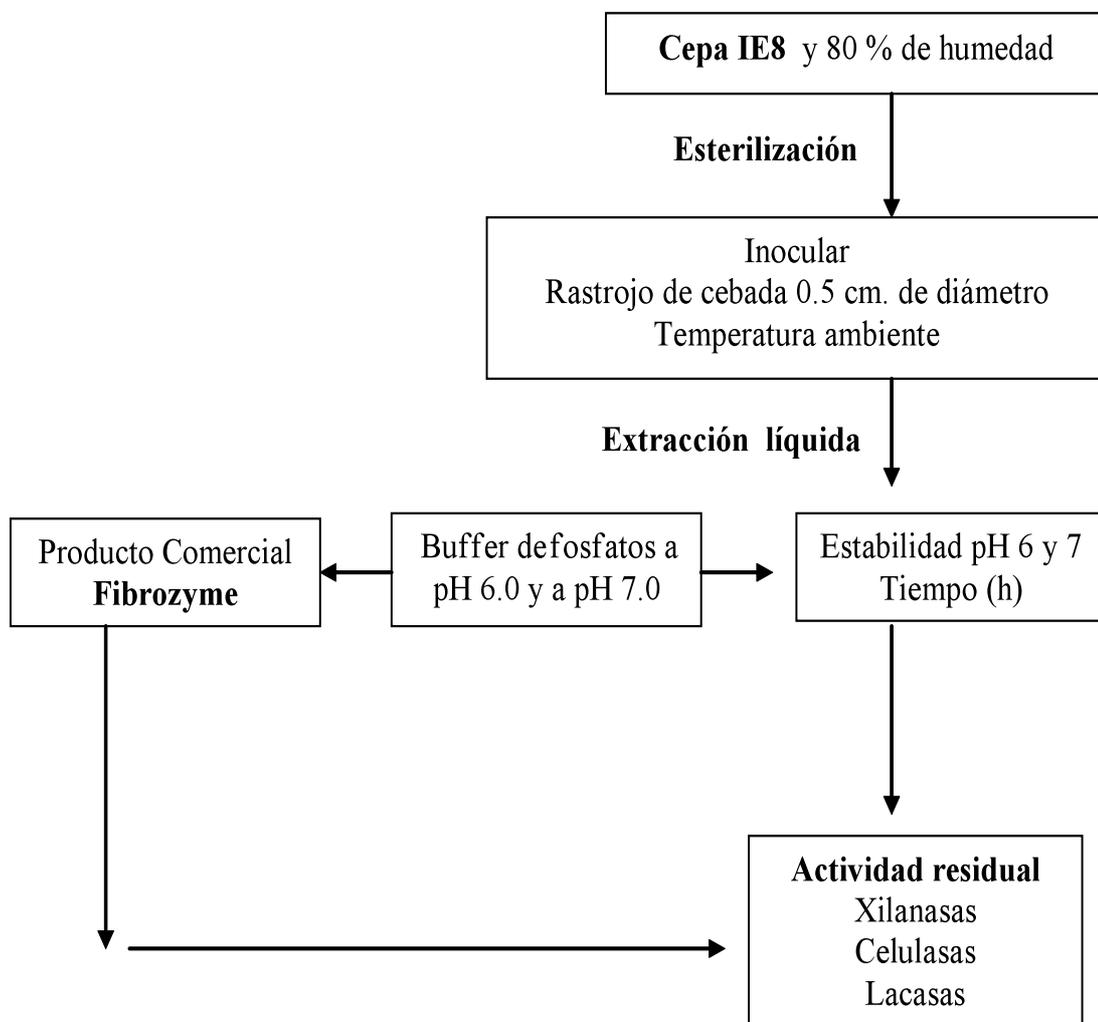


Figura 13. Evaluación de la estabilidad de las enzimas producidas por *P. ostreatus* IE8, xilanasas, celulasas, lacasas y proteína sobre el rastrojo de cebada, comparando su estabilidad con un extracto comercial (*Fibrozyme*)

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material biológico

Se utilizó la cepa IE8 del hongo *P. ostreatus*, debido a su mejor desempeño al evaluar la V_r y la producción de biomasa.

3.2. Estabilidad de las actividades enzimáticas xilanasas, celulasas y lacasas a pH 6 y 7 de *P. ostreatus* sobre rastrojo de cebada

Se estudió la estabilidad a pH 6 y 7, con las técnicas antes mencionadas (Estudio II) determinando las actividades enzimáticas lacasas, celulasas y xilanasas del extracto enzimático de *P. ostreatus* y *Fibrozyme*. Se utilizó un buffer de fosfatos a pH 6.0 y a pH 7.0, a una concentración de 0.1M, la actividad enzimática se analizó a intervalos de tiempo hasta que perdieron su actividad (0, 0.5, 1, 2, 4, 8, ..., 15 h).

3.3. Producto comercial enzimático

Fibrozyme, producido por Alltech es un extracto que proviene de la fermentación de *Aspergillus niger* y *Trichoderma viride*.

3.4. Preparación del extracto crudo para las pruebas de estabilidad a distinto pH

Se estudio la estabilidad a pH 6 y 7, midiendo el tiempo de vida media ($t_{1/2}$) de las actividades xilanasas, celulasas y lacasas obtenida del extracto enzimático. Se utilizó un amortiguador de citratos a pH 6.0 y un amortiguador de fosfatos a pH 7.0, a una concentración de 0.05 M, (Miller, 1959; Loera y Córdova, 2003). Se empleó extracto crudo de los días 8 y 12 de FSS (para celulasas el día 8 y para lacasas y xilanasas el día 12), mismos que se diluyeron en 50 ml de amortiguador de citrato 50 mM a pH 5.3 en 450 mL con agua destilada; se tomaron 50 mL de la dilución para realizar la extracción enzimática, se agitó durante 30 min y se centrifugó a 10,000 rpm durante 20 min. y se adicionaron 50 mL del buffer a pH 6 o pH 7 y se incubo a 39 °C. Se realizaron mediciones en un espectrofotómetro cada 60 minutos hasta observar perdida de actividad. Se realizaron triplicados para cada medición.

4. ANALISIS ESTADISTICO

Para medir la actividad residual se ajustaron los datos a una cinética de primer orden.

La ecuación de primer orden es:

$$\frac{-d [A]}{d t} = k [A]$$

Donde:

[A]= Cantidad de enzima (u/mL)

$\frac{-d[A]}{d t}$ = Velocidad a la que disminuye la actividad enzimática

k= Constante de velocidad (h⁻¹)

La constante de velocidad de primer orden posee las dimensiones del recíproco del tiempo, habitualmente h⁻¹. La forma integral de esta ecuación es:

$$\frac{\ln [A_0]}{[A]} = k t$$

Donde:

A₀ = Actividad enzimática al tiempo cero

[A] = Actividad enzimática al tiempo “ t ”. De aquí se puede calcular el t^{1/2} que es el tiempo que la enzima pierde el 50% de su actividad.

5. RESULTADOS Y DISCUSION

El presente estudio evaluó la estabilidad enzimática a temperatura y pH representativos de las condiciones del rumen (pH de 6.0 a 7.0 y 39 °C) (Church, 1996 y Van Soest, 1994). El estudio se realizó pensando en que estas temperaturas pueden llegar a alcanzarse en zonas tropicales al realizar un pretratamiento de substratos con *P. ostreatus*, o con sus enzimas. Cuando se midió la estabilidad enzimática para las xilanasas por 15 h de incubación a 39 °C, la actividad a pH 6 de xilanasas presentó una $k = -0.017 \text{ h}^{-1}$ y una $t_{1/2} = 40.79 \text{ h}$; sin embargo, cuando se analizó el extracto a pH 7 la enzima presentó una constante de decaimiento $k = -0.067 \text{ h}^{-1}$ y una $t_{1/2} = 10.32 \text{ h}$ lo cual indica que a pH 7 existe una disminución en la vida media del 74.51%, respecto a lo observado a pH 6. (figura 14). En otra investigación de manera similar se observa que las xilanasas a pH 6 alcanza una mayor $t_{1/2}$ (1.28 h^{-1}), lo que indica que es la actividad de xilanasas es más estable en estas condiciones (Ávila, 2005). Aunado a esto Cai *et al.* (2004) observaron que a pH alcalinos las xilanasas se vuelven más inestables.

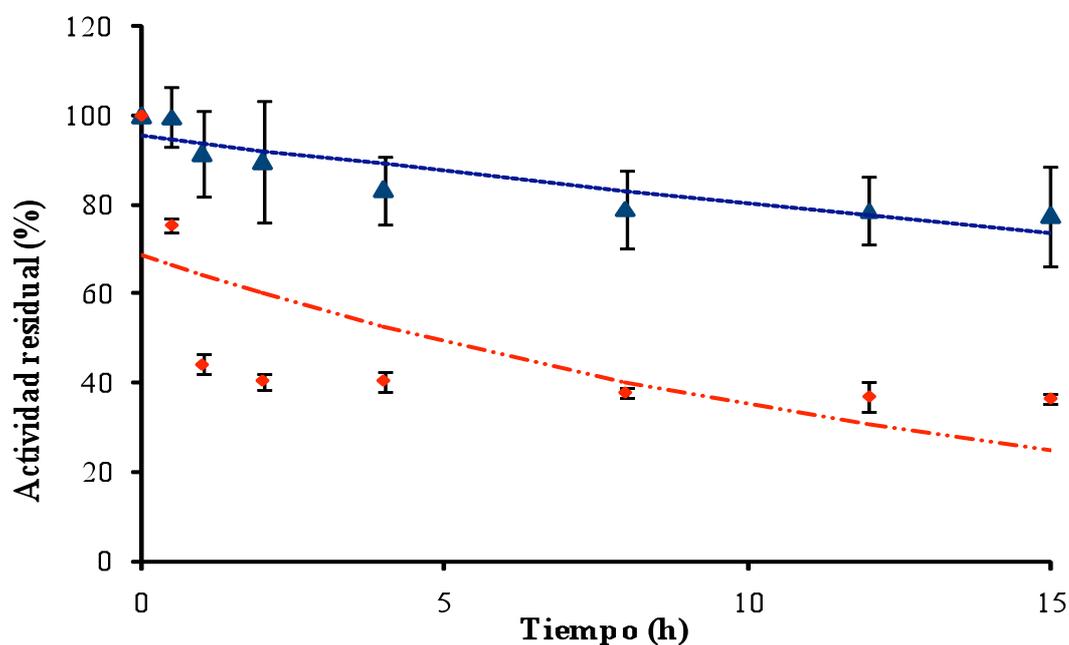


Figura 14. Comportamiento de la actividad enzimática de xilanasas a través del tiempo en pH7 ◆ ($k = -0.067 \text{ h}^{-1}$ y $t_{1/2} = 10.32 \text{ h}$) y pH6 ▲ ($k = -0.017 \text{ h}^{-1}$ y $t_{1/2} = 40.79 \text{ h}$) incubada a 39 °C. La línea punteada corresponde al ajuste del modelo matemático.

Las pruebas de estabilidad para celulasas a pH 6 presentaron una $k = -0.06 \text{ h}^{-1}$ y una $t_{1/2} = 11.55 \text{ h}$, esta misma enzima presenta a pH 7 una $k = -0.069 \text{ h}^{-1}$ y $t_{1/2} = 10.0 \text{ h}$; lo que corresponde a una disminución en la vida media del 13.41% respecto a lo observado a pH 6 (Figura 15). De manera similar Ávila (2004) observó que las celulasas son más estables y presentan un $t_{1/2}$ (67.9 h^{-1}) más elevado a pH 6. En cuanto a la estabilidad enzimática a pH 6 en lacasa se presenta una $k = -0.09 \text{ h}^{-1}$ y $t_{1/2} = 7.33 \text{ h}$ (Cuadro 17); sin embargo, cuando se analizó el extracto a pH 7 la enzima presentó una $k = -0.052 \text{ h}^{-1}$ y $t_{1/2} = 13.31 \text{ h}$ lo que indica que este tipo de enzima es más estable a pH neutro. A pH 6 existe una disminución de la vida media del 49.36% respecto a pH 7; de manera similar Ávila (2005) encontró una $t_{1/2}$ menor a pH 6.

Cuadro 17. Valores de velocidad de decaimiento (k) y tiempo de vida media ($t_{1/2}$) para los extractos enzimáticos producidos por *P. ostreatus* cepa IE8 y su comparación con un complejo enzimático fibrolítico a pH 6 y 7 a 39 °C.

Enzima	<i>P. ostreatus</i> cepa IE8				C. E. F	
	* $t_{1/2}$ (h)	* k (h^{-1})	** $t_{1/2}$ (h)	** k (h^{-1})	$t_{1/2}$ (h)	K (h^{-1})
pH 6						
Xilanasas	40.49	- 0.017	1.28	-0.5406	12.8	-0.054
Celulasas	11.55	- 0.060	67.9	-0.0102	87.7	-0.0079
Lacasas	6.57	- 0.105	42.25	-1.08	N.D	N. D.
pH 7						
Xilanasas	10.32	- 0.067	0.6	-1.056	9.9	-0.07
Celulasas	10.0	- 0.069	3.15	-0.219	77	-0.009
Lacasas	13.31	- 0.052	28.4	-2.04	N.D	N. D.

* Inoculación sobre paja de cebada

** Inoculación sobre rastrojo de maíz (Ávila,2004)

C.E.F: Complejo enzimático fibrolítico

N. D: No determinado ya que C.E. F. no presenta actividad de lacasas

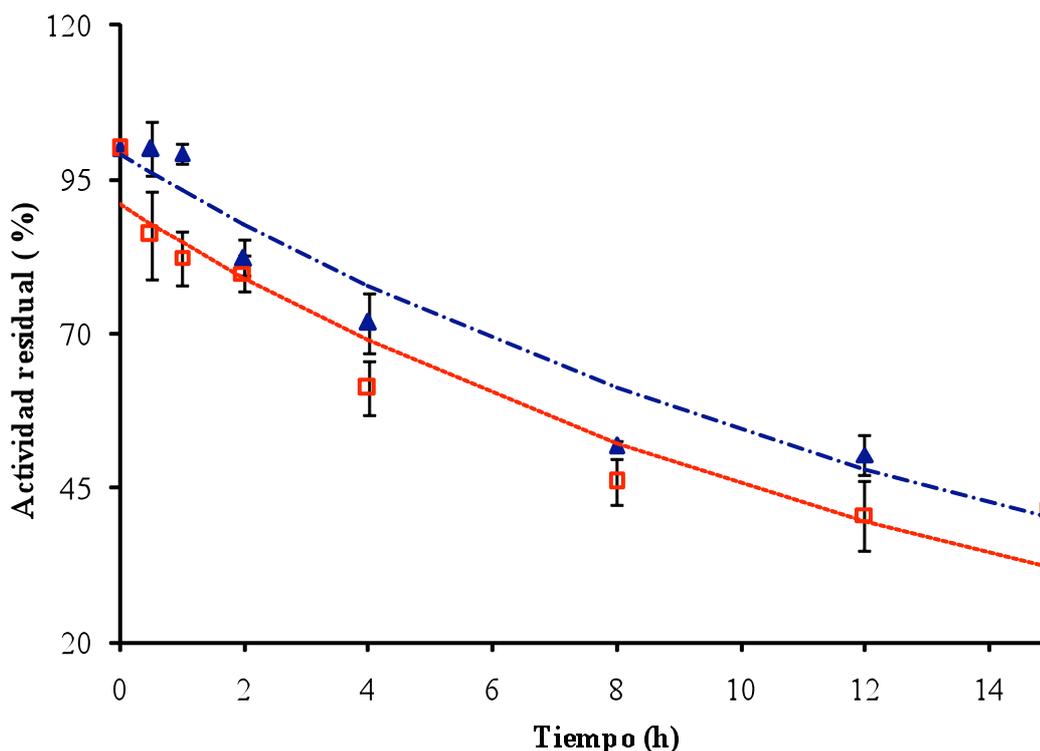


Figura 15. Comportamiento de la actividad enzimática de Celulasas a través del tiempo en pH 7 ($k = -0.069 \text{ h}^{-1}$ y $t_{1/2} = 10.0 \text{ h}$) y pH 6 \blacktriangle ($k = -0.06 \text{ h}^{-1}$ y $t_{1/2} = 11.55 \text{ h}$) incubada a 39° C . La línea punteada corresponde al ajuste del modelo matemático.

Con rangos de pH iguales, probando un complejo enzimático fibrolítico comercial (Fibrozyme) las xilanasas a pH 6 se comportan inestables comparadas con las celulasas (cuadro 17). De lo anterior se puede deducir que las enzimas fibrolíticas exógenas producidas por hongos, a diferencia de las secretadas por los microorganismos en rumen, tienen un pH óptimo de actividad, lo que concuerda con los resultados de Morgavi *et al.* (2001) donde la actividad xilanasas de *Trichoderma longibrachiatum* fue de pH 5.0 y Krause *et al.*, (1998) indican que en situaciones donde la degradación de la fibra se ve comprometida, las enzimas exógenas pueden mejorar la degradación de los carbohidratos estructurales.

En el presente estudio la actividad enzimática a pH 6 los resultados muestran que la actividad residual fue mayor que para pH 7 en xilanasas (77.57 % de actividad residual), seguida de las celulasas (49.13%) y menor en lacasas (27.57%) de forma

contraria cuando se utilizó un buffer con pH 7 la actividad enzimática residual fue similar en xilanasas, celulasas y lacasas (36.8%, 41.16% y 42.17%) (Figura 14, 15 y 16). Los resultados de estabilidad son diferentes a los reportados por Morgavi *et al.* (2000) quienes observaron que las xilanasas producidas por *A. niger* mantuvieron el 100% o más de su actividad (después de 6 h de incubación) a diferencia de lo encontrado en este trabajo debido a que las condiciones no fueron las mismas. Comparado esto con las xilanasas producidas por *P. ostreatus* se mantienen con más del 80% de su actividad residual después de 8 h de incubación y llegando a tener más del 70% a las 15 h de incubación (figura 14). Beauchemin *et al.*, (2003) atribuye mayor estabilidad cuando se incuba con sustrato lo cual permite la formación del complejo enzima-sustrato.

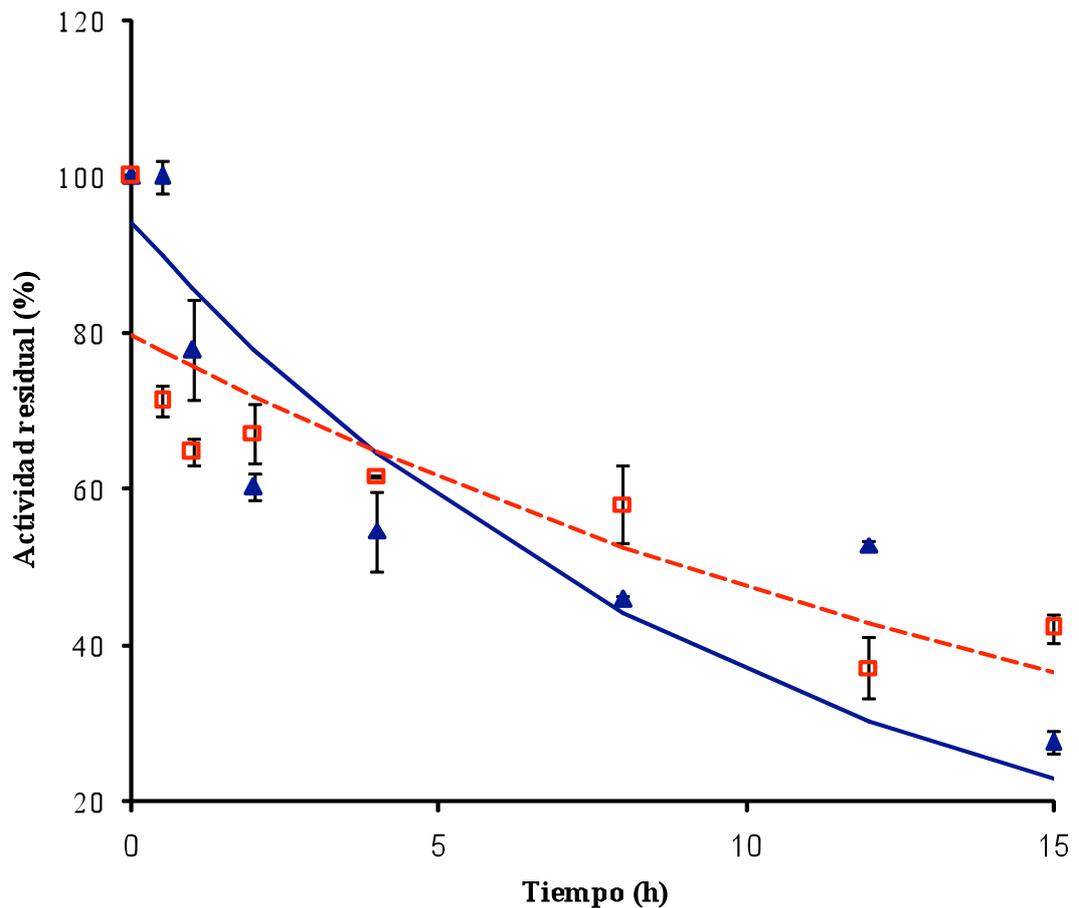


Figura 16. Comportamiento de la actividad enzimática de lacasas a través del tiempo en pH 7 ($k = -0.052 \text{ h}^{-1}$ y $t_{1/2} = 13.31 \text{ h}$) y pH 6 \blacktriangle ($k = -0.09 \text{ h}^{-1}$ y $t_{1/2} = 7.33 \text{ h}$) incubada a $39 \text{ }^\circ\text{C}$. La línea punteada corresponde al ajuste del modelo matemático.

Por último el cuadro 17 presenta los valores de velocidad de decaimiento, observando que a pH 7 se la vida media ($t_{1/2}$) de las enzimas (xilanasas celulasas y lacasas) producidas por *P. ostreatus* en paja de cebada y rastrojo de maíz es mas corta; dado que el valor de decaimiento de primer orden es mayor, comparadas con el extracto comercial no se ven favorecidas. Sin embargo a pH 6 los valores de $t_{1/2}$ se incrementan para xilanasas en FSS con rastrojo de cebada al igual que celulasas y lacasas en rastrojo de maíz (Ávila, 2004) y para el complejo enzimático fibrolítico comercial se favorecen las celulasas.

6. CONCLUSIONES

- La producción de lacasas por FSS sobre rastrojo de cebada es importante para su deslignificación, sin embargo las celulasas a pH 6 muestran una mayor estabilidad.
- Las xilanasas mostraron una actividad residual cercana al 80% y una vida media de 40h; lo que podría convertir a este extracto en una fuente factible de xilanasas.
- El extracto enzimático (líquido) producido por *P. ostreatus* tiene ventajas sobre el producto comercial Fibrozyme, dado que tiene además de xilanasas y celulasas un contenido de lacasas importante.
- El complejo enzimático producido por *P. ostreatus* sobre rastrojo de cebada puede aplicarse como pretratamiento en residuos agrícolas cuya actividad puede ser promovida por periodos entre 6 y 40h a pH 6.

VIII. LITERATURA CITADA

- Aceves, O. J., M. E. Ortega-Cerilla, G. Mendoza-Martínez. 1997. Evaluación nutricional de la paja de trigo, tratada con hongo *P. ostreatus* en ovinos. Tesis de Maestría Colegio de Posgraduados. Montecillos, Edo. México.
- Ashok, P. C. R., J. A. Soccol, P. Rodríguez-León. 2001. Solid-State Fermentation in biotechnology. Fundamentals and Applications. 1st Ed. Asistech Publishers, INC. New Delhi. pp:14.
- Adamović, M., G. Grubić, I. Milenković, R. Jovanović, R. Protić, L. Sretenović and L. Stoićević. 1998. The biodegradation of wheat straw by *Pleurotus ostreatus* mushrooms and its use in cattle feeding. *Animal Feed Science and Technology*. 7(3-4): 357-362.
- Amare G. and M. Gashaw. 1999. High-level xylanase production by an alkaliphilic *Bacillus sp.* By using solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*. 25:68-72.
- A.O.A.C. 1995. Official methods of analysis of the Association of official Analytical Chemists. Washington, D.C. USA.
- Apráez, G. J. E. 1989. Evaluación de la digestibilidad y pared celular de la pulpa de café inoculada con el hongo *Pleurotus ostreatus*. Tesis de Maestría, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. División de estudios de Posgrado. UNAM. México, D.F. 65pp.
- Ávila, M. H. 2004. Enzimas fibrolíticas de *Pleurotus ostreatus* y su actividad en rastrojo de maíz. Tesis de Maestría en ciencias. Especialidad Ganadería. Colegio de Posgraduados, Montecillo, México.
- Beauchemin, K. A., L. M. Rode and V. J. H. Sewalt. 1995. Fibrolytic enzymes increase fiber digestibility and growth rate of steers fed dry forages. *Can. J. Anim. Sci.* 75:641-644.
- Beauchemin, K. A., S. D. Jones, L. M. and V. J. H. Sewalt. 1997. Effects of fibrolic enzymes in corn or barley diets on performance and carcass characteristics of feedlot cattle. *Can. J. Anim. Sci.* 77:645-653.
- Beauchemin, K. A., L. M. Rode, M. Maekawa, D. P. Morgavi and R. Kampen. 2000. Evaluation of non starch polysaccharides feed enzyme in dairy cow diets. *J. Dairy Sci.* 83:543-553.
- Beauchemin, K. A., D. Colombatto, D. P. Morgavi, and W. Z. Yang. 2002. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. *J. Anim. Sci.* 81: (Suppl. 2):E37-E47.

- Beauchemin, K. A., Colombatto D., Morgavi D. P., and Yang W.Z. 2003. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. *J. Anim. Sci.* 81: (Suppl. 2):E37-E47.
- Bedford, M. R. 1993 Mode of action of enzymes. *J. Appl. Poult. Res.* 2:85-92
- Béguin, P., and J. P. Aubert. The biological degradation of cellulose. *FEMS. Microbiol. Rev.* 13:25-58.
- Beverman, J. B. S., 1980. Introducción a la Bioquímica de los alimentos de Manual Moderno, S.A. de C.V., México.
- Bonneau M. and B. Laarveld. 1999. Biotechnology in animal nutrition, physiology and health. *Livest, Prod. Sci.* 59:223-241.
- Bonilla, A. L. 1991. Engorda de novillos alimentados con diferentes niveles de nitrógeno y grano de maíz. Tesis Profesional Departamento de Zootecnia. Chapingo, México. 98p.
- Bonatti, M., P. Karnopp, H. M. Soares and S. A. Furlan. 2004. Evaluation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* nutritional characteristics when cultivated in different lignocellulosic wastes . *Food Chemistry.* 88(3): 425-428.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248 – 254.
- Bressler, D. C., P. M. Federak, and M. A. Pickard. 2000. Oxidation of carbazole, N-ethylcarbazole, fluorene, and dibenzotiofene by the laccase of *coriolopsis gallica*. *Biotechnol. Lett.* 14(22):1119-1125.
- Cai, Q., X. Yue and T. Niu. 2004. The screening of culture condition and properties of xilanasas by white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Process Biochemi.* 39:1561-1566.
- Camarero, S., C. G. Gallett and T. A. Martínez. 1997. Demonstration of *In Situ* Oxidative Degradation of Lignin Side Chains by Two White-rot Fungi Using Analytical Pyrolysis of Methylated Wheat Straw. *RCMS.* 11: 331–334.
- Chesson, A., C. S. Stewart, K. Dalgarno and T. P. King. 1986. Degradation of isolated grass mesophyll, epidermis and fiber cell walls in the rumen and by cellulolytic rumen bacteria in anoxic culture. *J. Appl. Bacteriol.* 60:327-336.
- Chen, K. H., J. T. Huber, J. Simas, C. B. Theurer, P. Yu, S. C. Chan, F. Santos, Z. Wu and R. S. Swingle. 1995. Effect of enzyme treatment or steam-flaking of sorghum grain on lactation and digestion in dairy cows. *J. Dairy Sci* 78:1721-1727.
- Church, D.C. & Pond, W.G. 1996. Fundamentos de nutrición y alimentación de animales. Editorial UTEHA, Noriega Editores. México. 438 p.

- Church, D.C. 1988. The ruminant animal digestive physiology and nutrition. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey USA. 564 p.
- Colombatto, D., F. L. Mould, M. K. Bhat, D. P. Morgavi, K. A. Beuchemin and E. Owen. 2003. Influence of fibrolytic enzymes on the hydrolysis and fermentation of pure cellulose and xilan by mixed ruminal microorganims in vitro. *J. Anim. Sci.* 81:1040-1050.
- Colombatto, D., F. L. Mould, M. K. Bhat, R. H. Phipps and E. Owen. 2004. In vitro evaluation of fibrolytic enzymes as additives for maize (*Zea mays L.*) silage. I Effects of ensiling temperature, enzyme source and addition level. *Anim. Feed Sci. Technol.* 111:129-143.
- Coronel, U., M. E. Ortega C., G. Mendoza M. , M. T. Sánchez, J. Ayala and C. Becerril. 2001. Effect of two strains of *Saccharomyces cerevisiae* on productive performance of heifers. Nutrition Society, England, 10-12 July. Abstract.
- Cornel, U., J. M. Silvestre, y M. E Ortega C. 1995. 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.
- Coughlan, M. P. 1985. The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 3: 39 – 109.
- De la Torre, L. M. 1985. Aprovechamiento de esquilmos agrícolas y residuos industriales. Prospectiva de la biotecnología en México. CONACYT. México. p.219.
- Dianxia, W., S. Akiyoshi and S. Motoyuki. 2001. Biological efficiency and nutritional value of *Pleurotus ostreatus* cultivated on spent beer grain. *Bioressource Technology* 78:293-300.
- Din, N., Gilkes, N. R., Tekant, B., Miller, R. C. Jr, Warren, R. A. J., and Kilburn, D. G. 1991. Non-hydrolytic disruption of cellulose fibres by the binding domain of a bacterial cellulose. *Bio Technology.* 9:1096-1099.
- Diodoro, L. A., F. Forchiassin, V. L. Papanutti y D. V. Sueldo. 2003 Actividad enzimática de diferentes tipos de residuos orgánicos por *Saccobolus saccoboloides* (fungi, Ascomycotina). *Rev. Iberoam. Micol.* 20:11-15.
- Eng, F., M. Gutiérrez-Rojas y E. Favela-Torres. 2003. Efecto de la temperatura y el pH en el crecimiento superficial de *Botryodiplodia theobromae* RC1. *Rev Iberoam. Micol.* 20: 172-175.
- Eichlerová I., K. Ruel, L. Homolka, J. P. Joseleau and F. Nerud. 2000. Ligninolytic characteristics of *Pleurotus ostreatus* strain F6 and its monokaryotic protoplast derivate P19. *Can J. microbial.* 46:1153-1158.

- Fan, L., A. Pandey, R. Mohan and C. R. Soccol. 2000. Use of various coffee industry residues for the cultivation of *Pleurotus ostreatus* in solid state fermentation Acta Biotechnologica, 20: (1)41-52.
- Feng, P., C. W. Hunt G. T. Pritchard and W. E. Julien. 1996. Effect of enzyme preparations on *in situ* and *in vitro* degradation and *in vivo* digestive characteristics of mature cool - season grass forage in beef steers. J. Anim. Sci. 74: 1349-1357
- Fernández R. S., E. Riquelme y S. González M. 1981. Utilización del rastrojo de maíz. 2. Efectos del procesamiento físico y del nivel de alimentación. Memoria de la VIII Reunión de la Asociación Latinoamericana de Producción Animal. Santo Domingo.p. 33.
- Gashe, B. A. 1992. Cellulase production and activity by *Trichoderma sp* A-001. J. Appl. Bacteriol 73:79-82.
- Gawande, P. V. and M. Y. Kamat. 1999. Production de *Aspergillus* xylanase by lignocellulosic waste fermentation and its application. Journal Applied Microbiology. 87:511-519.
- Gardner, P. T., T. J. Word, A. Chesson and T. Stuchbury. 1999. Effect of degradation on the porosity and surface area of forage cells walls of differing lignin content. J. Sci. of Food and Agricult. 79:11-18.
- González, G. E. 2004. Utilización de enzimas fibrolíticas en cabras lecheras. Evaluación de su actividad y características fermentativas *in Vitro*. Departament de ciencia animal i dels aliments de la Universitat Barcelona España. Tesis Doctoral.
- Guzmán, G., G. Mata, D. Salmones, C. Soto-Velásquez y L. Guzmán-Dávalos. 2002. El cultivo de hongos comestibles. Primera edición. Instituto Politécnico Nacional. SEP. México.
- Guillen, F., C. Muñoz, V. Gómez-Toribio, A. T. Martínez, M. J. Martínez. 2000. Oxygen Activation during Oxidation of Methoxyhydroquinones by Laccase from *Pleurotus eryngii*. Applied and Environmental Microbiology. 66(1):170-175.
- Guillen-Navarro K. G., F. J. Márquez-Rocha y J. E. Sánchez-Vázquez. 1998. Producción de biomasa y enzimas ligninolíticas por *Pleurotus ostreatus* en cultivo sumergido. Rev. Iberoam. Micol. 15:302-306.
- Guzmán, D. L., C. Soto, D. Martínez. 1987. El bagazo de caña de azúcar como substrato para la producción de *Pleurotus ostreatus* en Jalisco. Rev. Méx. Micología 3:79
- Gurrolla, M. R. 2001. Comportamiento y solubilidad de la proteína cruda de rastrojo de maíz inoculado con *Pleurotus ostreatus* a diferentes tiempos de comportado. Resumen IX Congreso nacional de biotecnología y bioingeniería 10-14 de septiembre, Veracruz, Ver. México.

- Hadar, Y., and E. Cohen-Arazi. 1986. Chemical composition of the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* produced by fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 51:1352-1354.
- Harris, B. 1998. The umerging role of enzymes in ruminants diets: at long last, a breakthrough. Udder information. Dr. Harris, Guide to maximizing dairy performance. www.altech-bio.com/udder98.htm. pp1-3
- Herderson, N. 1993. Silages additives. *Anim. Feed Sci. Technol.* 45:35-56.
- Hongman, H., Z. Jiti, W. Jing, D. Cuihong and Y. Bin. 2004. Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. *Process biochem.* 39:2425-2419.
- Hristov, A. N., L. M. Rode, K. A. Beauchemin, and R. L. Wuerfel. 1996. Effect of a commercial enzyme preparation on barley silage *in vitro* and in sacco dry matter degradability. In *Proc. Western Section, Am. Soc Anim. Sci.* 47:282-284
- Iriarte, H. C. 2003. Estudio de la producción y secreción de enzimas celulolíticas en micelios "rápidos" y "lentos" de. Ingeniero Técnico Agrícola. Universidad Pública de Navarra. ww.unavarra.es/germic/publicaciones.
- Juárez, A. S., O. M. Murillo, M. M. Vázquez. 2000. Mejoramiento del valor alimenticio de forrajes y esquilmos agrícola. *México Ganadero* no. 462
- Jung, H. G., F. R. Valdez, A. R. Abad, R. A. Blanchette and R. D. Hatfield. 1992. Effect of white rot basidiomycetes on chemical composition and *in vitro* digestibility of oat straw and alfalfa stems. *Journal of Animal Science*, 70 (6): 1928-1935.
- Jung, H. G., D. R. Mertens and A. J. Payne. 1997. Correlation of acid detergent lignin and klason lignin whit digestibility of forage dry matter and neutral detergent fiber. *J. Dairy Sci* 80: 1622-1628.
- Karnezos, P. 2000. Una nueva tecnología para enzimas estables al rumen y su aplicación en la producción de ganado de carne y leche. In: memorias del curso de nutrición y manejo de la alimentación en ganado bovino productor de carne Asociación mexicana de especialistas en Nutrición Animal. A. C. Guadalajara Jalisco, México. Pp:237-247.
- Kumaran, S., C. A. Sastry and S. Vikineswary. 1997. Laccase, celulase and xilanase activities during growth of *Pleurotus ostretus sajor-caju* on *sago hampas* , *Word J. Microbiol Biotech.* 14: 43-49.

- Krause, M., K. A. Beauchemin, L. M. Rode, B. I. Farr and P. Norgaard. 1998. Fibrolytic enzyme treatment of barley grain and source of forage in high grains diets fed to growing cattle. *J. Anim. Sci.* 76: 2912-2920.
- Kung, L., R. J. Jr. Treacher, G. A. Nauman, A. M. Smagala, K. M. Endres and M. A. Cohen. 2000. The effect of treating forages with fibrolytic enzymes on its nutritive value and lactation performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 83:115-122.
- Kung, L. 2001. Enzymes for Lactating Dairy Cows: New Theories and Applications. In: Proceedings, 12th Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium. Department of Animal & Food Sciences, University of Delaware, Florida USA, pp. 29-43
- Leonowicz, A., J. Rogalski and J. Fiedurek 1986. The possible key role of glucose oxidase in transformation of lignocellulose in Proc 3rd int. conf. Biotechnol. Pulp paper ind., pp160-162. Stockholm, Sweden.
- Leonowicz, A., N. S. Cho, M. Wojtas-Wasilewska, J. Rogalski and J. Leterek. 1997. Enzymes of white-rot fungi cooperate in bio deterioration of lignin barrier. *J. Kor. Wood Sci. Technol.* 25:1-20.
- Leonowicz, A. 1999. Biodegradation of lignin by white rot fungi. *Fungal Genetics and Biology.* 27: 175-185.
- Lewis, G. E., C. W. Hunt, W. K. Sanchez, R. Treacher, G. T. Pritchard and P. Feng. 1996. Effect of direct-fed fibrolytic on the digestive characteristics of a forage based diet fed to beef steers. *J. Anim. Sci.* 74:3020-3028.
- Lewis, G. E., W. K. Sanchez, C. W. Hunt, M. A. Guy, G. T. Pritchard, B. I. Swanson and R. J. Treacher. 1999. Effect of direct-fed fibrolytic enzymes on the lactational performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82:611-617.
- Loera, O. and J. Córdova. 2003. Improvement of xylanase production by a parasexual cross between *Aspergillus niger* strain. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 46 (2): 177 – 181.
- López, C. C. A. y A. González. 1997. Cultivo de hongos comestibles (setas) Manual técnico para el cultivo de hongos setas (*Pleurotus ostreatus*) Programa de capacitación y extensión. Alianza para el campo México. pp:6-15.
- Luchini N. D., G. A. Broderick, D. L. Hefner, R. Derosa, S. Reynal and R. Theacher, 1997. Production response to treating forage with fibrolytic enzymes prior to feeding to lactating cows. *J. Dairy Sci.* 80 (suppl.1):262
- Lynd, L. R., P. J. Weimer, W. H. Van Zyl, and I. S. Pretorius. 2002. Microbial use Of the Cellulose: Fundamental and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Rev.* Vol. 66, No. 3, 506-577p.
- Mao, Y., and B. Tyler. 1992. Genoma organization of *Phytophthora megasperma f. sp. Glycine*. *Exp. Mycology.* 15:83-291.

- Martin, C. and D. Nisbet. 1992. Effect of direct fed microbials on rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.* 75:1736-1744.
- McAllister, T., A. Stanford, H. D. Bae, R. J. Treacher, A. N. Hristov, J. Baah, J. A. Shelford and K. J. Cheng. 2000. Effect of exogenous enzymes on digestibility of barley silage and growth performance of feedlot cattle. *Can. J. Anim. Sci.* 80:35-44.
- McAllister, T., A. Hristov, K. Beuchemin, L. Rode and K. Cheng. 2001. Enzymes in ruminant diets In: M. Bedford and G. Partridge. *Enzyme in Farm Animal Nutrition*. CABI Publishing. pp: 273-298.
- Moo Young, M., A. R. Moreira, and R. P. Tengerty. 1983. Principles of solid-substrate fermentation. In the filamentous fungi. Vol IV *Fungal Technology*, Esis, E., E. Smith, Berry, D. R. and Kristiansen, B. Edit. Arnold, London. 117-143.
- Montañez, C. O. 1999. Efecto de la alimentación de ovinos con paja de trigo tratada con *Pleurotas florida* en la flora ruminal. Tesis de Maestría. Colegio de Posgraduados montecillos. México.
- Moreno S. J. R., M. E. Ortega C., y R. B. Gama. 1999. Uso de paja de trigo tratada con el hongo *Pleurotus ostreatus* y urea en la alimentación de cabritos. Tesis de Maestría. Colegio de Posgraduados Montecillo. México.
- Morgavi, D. P., K. A. Beauchemin, V. L. Nsereko, L. M. Rode, A. D. Iwaasa, W. Z. Yang, T. A. McCallister and W. Yang. 2000 Synergy between ruminal fibrolitic enzymes and enzymes from *Trichoderma longibrachiatum*. *J. Dairy Sci.* 83: 1310 – 1321.
- Morgavi, D. P., K. A. Beauchemin, V. L. Nsereko, L. M. Rode, T. A. McAllister, A. D. Iwaasa, Y. Wang, and W. Z. Yang. 2001. Resistance of feed enzymes to proteolytic inactivation by rumen microorganisms and gastrointestinal proteases. *J. Anim. Sci.* 79: 1621 – 1630
- Meneses M. M. y Montalvo P. C. 1995. Tratamiento biotecnológico de un material compuesto formado polietileno y bagazo de caña de azúcar. Tesis de licenciatura. Ciencias químicas. Departamento de Bioquímica. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Anal. Chem.* 31:426-428.
- Miller, G. L., R. Blue, Glannon E. W., Burton A. L. 1960. Measurement of carboximetil celulosa activity. *Anal. Chem.* 2:127 – 132.
- Nsereko, L. V. Morgavi P. D., Rode M.L. Beauchemin A. K. McAllister A. T. 2000. Effects of fungal enzyme preparations on hydrolysis and subsequent degradation of alfalfas hay fiber by mixed rumen microorganisms in vitro. *Anim Feed Sci Techn.* 88:153-170.

- Nicolini, L., C. Volpe, A. Pezzotti and A. Carilli. 1993. Changes in in-vitro digestibility of orange peels and distillery grape stalks after solid-state fermentation by higher fungi *Bioresource Technology*. 45(1): 17-20.
- Nussio, L. G., J. T. Huber, C. B. Theurer, C. B. Nussio, J. Santos, M. Tarazon, R. O. Lima-Fhilo, B. Riggs, M. Lamoreaux and R. J. Theacher, 1997. Influence of a cellulase/xylanase complex (C/X) on lactational performance of dairy cows fed alfalfa hay based diets. *J. Dairy Sci.* 80: (Suppl. 1):210.
- Ortega, C. M. E., B. C. Acosta, F. H. Patiño, F. P. G. Romo. 1986. Efecto de la inoculación del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* en la composición química y digestibilidad en la paja de cebada. *Archivo Latinoamericano de nutrición*. Pp:345-350.
- Orzua-González M. C., Aguilar-González C. Rodríguez-Herrera R. 2001. Velocidad de crecimiento de *Aspergillus Niger* (Aa20) sobre diversos Residuos Agroindustriales. Departamento de Investigación en alimentos. Universidad Autónoma de Coahuila. Resúmenes IX Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Veracruz, Ver. México.
- Orzua, G. M. C. 2003. Aprovechamiento de residuos industriales como soporte de crecimiento fúngico para la fermentación en medio sólido. Universidad Autónoma de Coahuila, Facultad de ciencias químicas. Saltillo, Coahuila. México.
- Plata, P. F., G. Mendoza M., J. R. Bárcena-Gama, S. González M. 1994. Effect of a yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on neutral detergent fiber digestion in steers fed oat straw based diets. *Anim. Feed Sci. Technol.* 49: 203-210.
- Pérez-Leblic, M. I., A. T. Martínez y M. J. Martínez, XX Congreso Nacional de Microbiología Aceres, Septiembre. 2005. Análisis proteómico preliminar de las proteínas extracelulares producidas por *Pleurotus eryngii* en diferentes condiciones de cultivo. micelio.unex.es/sem2005/comunicaweb/M261.htm - 8k
- Pinos, R. J. M. 1999. Caracterización de enzimas fibrolíticas exógenas en la fermentación ruminal y digestibilidad de la alfalfa y ballico. Tesis de Doctor en ciencias. Especialidad Ganadería. Colegio de Posgraduados, Montecillo, México. 96p.
- Raimbault, M. 1998. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*. 1(3):1-15.
- Rayner, A. and L. Boddy, 1998 Fungal decomposition of wood. John Wiley. Chichester, New York. pp:4-5
- Reddy, P., R. Babu, P. Komaraiah, K. M. Rpy, and I. L. Kothari. 2003. Utilization of banana wastes for the production of lignolytic and cellulolytic enzymes by substrate fermentation using two *Pleurotus* species (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*). *Process Biochem.* 38: 1457-1464.

- Roa, V. M. L., J. R. Bárcena-Gama, S. González M., G. Mendoza M., M. E. Ortega C. C. García B. 1997. Effect of fiber source and a yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on digestion and the environment in the rumen cattle. *Anim. Feed Sci. Technol.* 64:327-336.
- Rodríguez S., M. Fernandez, C. R. Bermudez y H. Morris. 2003. Tratamiento de efluentes industriales coloreados con *Pleurotus spp.* *Rev. Iberoam. Micol.* 20:164-168.
- Rodríguez-Vázquez R., T. Cruz-Córdoba, J. M. Fernández-Sánchez, T. Roldan-Carrillo, A. Mendoza-Cantu, G. Saucedo-Castañeda, y A. Tomasini-Campocoso. 1999. Use of sugarcane bagasse pith as solid substrate for *P. Chrysosporium* Growth. *Microbiol.* 44(2):213-218.
- Romero, G. S. J., C. Augur and C. Viniegra-González. 2000. Invertase production by *Aspergillus Níger* in submerged and solid-state fermentation. *Biotechnology Letters* 22:1255-1258.
- Selinger L., C. Forsberg and K. Cheng 1996. The rumen: a unique source of enzymes for enhancing livestock production. *Anaerobe* 2:263-284.
- Sosa, M. C., y R. C. Soto. 2001. Respuesta de toretes en pastoreo a la suplementación de un concentrado adicionado con enzimas celulolíticas en el trópico. In XXIX Reunión anual de la Asociación Mexicana de Producción Animal. Cd. Victoria Tamaulipas, México. pp: 220-224.
- Soto A., G. Díaz-Godínez y C. Sánchez. 2001. digestibilidad *in situ* de zacate de maíz postcultivo de *Pleurotus ostreatus* evaluada en ovinos. Resúmenes IX congreso nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Veracruz, México.
- Stokes, M. R. 1992. Effect of a mixture, an inoculant, and their interaction on silaje fermentation and dairy production. *J. Dairy sci.* 75:764-773.
- Steel, R. G. D. y J. H. Torrie. 1986. Bioestadística: Principios y Procedimientos. 2da. Edición. Editorial McGraw Hill. México. 622.
- Thurston, Ch. 1994. The structure and function of fungal lacasses. *Microbiology* 140:19-26.
- Tirado-Estrada, G., I. Mejía-Haro, C. Cruz-Vazquez, G. Mendoza Martínez, I. Tovar-Luna and J. Fajardo-Peña 2001. Effects of exogenous enzymes on fiber degradation of corn stalks. *J. Dairy Sci.* 84 (Suppl. 1):283(Abstr).
- Treacher, R., T.A. MacAllister, J. D. Pop, Z. Mir and K. J. Cheng. 1996 Effect of exogenous cellulases and xylanase on feed utilization and growth performance of feedlot steers. *Can. J. Anim. Sci.* 77:541.
- Tricarico, J. M., K. A., Dawson and K. E. Newman. 1998. Effects of a microbial enzyme preparation (Fibrozyme) on ruminal digestion of fescue hay. *J. Anim. Sci.* 76(suppl. 1):289

- Tilley J. M. and Terry R. A. 1963. a two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. J. Britis Grassl. Socc. 28pp 104-111.
- Trinci A. P. J. 1969. A kinetic study of the growth of *Aspergillus nidulans* and other fungi. J Gen Microbiol; 57:11-24.
- Van Soest, P. J., J. B. Robertson and B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber neutral detergent fiber, and nonstrrch polysaccharides in relation to animal nutrition. J. Animal Sci. 74:3583-3597.
- Van Soest, P. J., and R. H. Wine. 1991. Determination of lignin and cellulose in acid detergent fibre whit permanganate. J. Assoc. Oficial Anal. Chem. 51:780-785.
- Van Soest, P. J. 1994. Nutritional Ecology of the Ruminant. 2nd. ed. Cornell Univ. Press, Ithaca, NY.
- Van Soest, P. J. 1994. Nutritional Ecology of the rumiant. 2nd. Ed. Ithaca Cornell University Press. 4776p.
- Wolfenden B. S. y R. L. Wilson. 1982. Radical cations as reference chromogens in studies of one electron transfer reactions: pulse radiolysis studies of 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) J. Chem.. Soc. Perkin Trans. II:805-812.
- Wu, Juan, X. Ya-Zhong and Y. Han-Qing. 2005. Degradation of lignin in pulp mill wastewaters by white-rot fungi on biofilm. Bioresource Technology. 96(12):1357-1363.
- Yang, W. Z., K. A. Beauchemin and L. M. Rode. 1999. Effects of an enzyme feed additive on extent of digestion and milk production of lactanting dairy cows. J. Dairy Sci. 82:391-403.
- Yescas, Y. R. 2002 Digestibilidad *in situ* de dietas con rastrojo de maíz o paja de avena con enzimas fibrolíticas Programa en Ganadería. Instituto de Recursos Genéticos y Productividad. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México.
- Zadrazil F. 1992 Iter solid Sustrate cultivation. H. W. Doelle, D. A. Mitchell and C. E. Rolz elsevier Aplied science london and New York, pp321.