



COLEGIO DE POSTGRADUADOS
INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRICOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA

**PRODUCCIÓN DE ENZIMAS LACASAS E ISOFORMAS DEL GÉNERO
PLEUROTUS SPP SOBRE BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR POR CULTIVO
SÓLIDO**

M.C. ARMANDO PELÁEZ ACERO

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2010

La presente tesis, titulada: **PRODUCCIÓN DE ENZIMAS LACASAS E ISOFORMAS DEL GÉNERO *PLEUROTUS* SOBRE BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR POR CULTIVO SÓLIDO**, realizada por el alumno **ARMANDO PELÁEZ ACERO**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

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

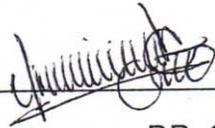
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



DR. MARCOS MENESES MAYO

ASESOR:



DR. OCTAVIO LOERA CORRAL

ASESOR:



DRA. MARÍA DOLORES MEGÍAS RIVAS

ASESOR:



DR. SERGIO S. GONZÁLEZ MUÑOZ

ASESOR:



DR. BALDOMERO ALARCÓN ZÚÑIGA

Montecillo, Texcoco, México diciembre de 2010

DEDICATORIA

A mis padres que desde niño me han enseñado que el principal límite lo pone uno mismo. Gracias papá por tu ejemplo, y a ti madre por tu amor.

A mi abuelita Fela, gracias por motivarme todo el tiempo.

A mis hermanos, Gaby, Pedro y a ti Mary; saben que no tengo palabras para agradecer todo el apoyo que me han brindado. ¡Por fin lo logramos!

A mi esposa Anaís; gracias por ser parte de este sueño, que sin ti no se hubiera realizado, gracias por todo tu amor y comprensión, por aguantar tiempo lejos para que yo pudiera terminar y por que en la lejanía se fortaleció más nuestro amor, siempre estuviste a mi lado. Te amo.

También dedico este esfuerzo a mis hijos, Mari José y Diego; los invito a tomar riesgos, por que solo de ellos aprendemos y nos fortalecemos, no se detengan que ¡no hay sueño pequeño! Los amo.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca No. 169134 otorgada para la realización de mis estudios de Doctorado.

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

Al Dr. Marcos Meneses Mayo, por el tiempo, desveladas, consejos y sobre todo por su amistad dedicado a mi formación profesional. Gracias por que siempre estuvo creyó en mí, a pesar de que en muchas ocasiones no cumplí los compromisos.

Al Dr. Sergio S. González Muñoz por su gran apoyo, consejos, observaciones y conocimiento que transmite en cada charla.

Al Dr. Octavio Loera Corral por su tiempo dedicado a mi formación, por sus comentarios siempre tan atinados tratando de hacer que fuera más analítico. Dr. ha sido un honor ser parte de su equipo de trabajo. Gracias.

A la Dra. María Dolores Megías Rivas, por sus observaciones y consejos, así como por abrirme las puertas para hacer una estancia en su país, sin embargo por causas de fuerza mayor no me fue posible realizar.

Al Dr. Baldomero Alarcón Zúñiga, por su tiempo y consejos, le agradezco su paciencia.

Al Dr. Luis A. Miranda Romero, gracias por su apoyo, tiempo, confianza y amistad, me ha enseñado que la paciencia y humildad son cualidades que solo las poseen los grandes seres humanos.

A la Dra. María Magdalena Crosby Galván, por su amistad y apoyo.

A todos mis profesores por sus enseñanzas, sobre todo a la Dra. María Esther Cerrilla.

A mis amigos que desde la maestría me brindaron su amistad y apoyo, Javier Piloni, Pedro Zetina, Samuel López, Paulino Sánchez, Oscar Arce, Isaac Almaraz, Gilberto, Marcela Villegas, Angélica Nayud, Nallely, y atí, Rocio Serrano (r.i.p.).

A mis amigos en el laboratorio; Dra. Rosario Venegas que con toda paciencia me explicaba mis dudas. Gracias a Don José, Braulio y sus pollos.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. JUSTIFICACIÓN	2
3. OBJETIVOS	3
Objetivo general.....	3
Objetivos específicos.....	3
4. HIPÓTESIS.....	3
Esquema de trabajo.....	4
5. REVISIÓN DE LITERATURA	5
Subproductos agroindustriales	5
Constituyentes de la pared celular de las plantas de los subproductos agroindustriales.....	6
Organización de la pared celular	7
Composición y estructura de los materiales lignocelulósicos.....	8
Estrategias para mejorar el valor nutricional de residuos agroindustriales	10
Tratamientos químicos	11
Alcalinos.....	11
Ácidos	11
Bagazo de caña de azúcar (BC).....	12
Composición química y morfológica	12
Producción nacional de caña de azúcar	12
Principales usos del bagazo	13
Hongos de la pudrición blanca (pb)	13
Características morfológicas en el género <i>Pleurotus spp.</i>	14
Enzimas ligninolíticas	15
Isoenzimas ó isoformas	15
Lacasas (EC.1.10.3.2).....	16
Características de las lacasas	16
Función de las lacasas en los hongos	17
Cultivo sólido (CS).....	17
Literatura citada	19
CAPITULO 1. ADAPTACIÓN Y DESARROLLO DE <i>PLEUROTUS SPP</i> EN UN MEDIO DE CULTIVO OBTENIDO DE EXTRACTOS DE BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR	24
1.1. RESUMEN.....	24

1.2. INTRODUCCIÓN.....	25
1.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
1.3.1. Medios de cultivo	26
1.3.2. Velocidad de crecimiento radial (VCR)	26
1.3.3. Diseño experimental y análisis estadístico.....	27
1.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
1.5. CONCLUSIONES	28
LITERATURA CITADA	29
CAPITULO 2. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE <i>PLEUROTUS SPP</i> EN CULTIVO SÓLIDO CON BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR PRE-TRATADO CON AGENTES QUÍMICOS.....	31
2.1. RESUMEN.....	31
2.2. INTRODUCCIÓN.....	32
2.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
2.3.1. Material biológico	33
2.3.2. Material vegetativo.....	33
2.3.3. Elaboración de inóculo de <i>Pleurotus spp</i>	34
2.3.4. Pre-tratamientos del bagazo de caña de azúcar.....	34
2.3.5. Pasteurización y cultivo sólido (CS).....	34
2.3.6. Tratamientos experimentales.....	35
2.3.7. Medición de la actividad enzimática.....	35
2.3.8. Actividad enzimática de xilanasas.....	35
2.3.9. Actividad enzimática de lacasas	36
2.3.10. Actividad enzimática para determinar celulasas	37
2.3.11. Determinación de proteína extracelular	37
2.3.12. Diseño experimental y análisis de los datos	37
2.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
2.5. CONCLUSIONES	44
LITERATURA CITADA	45
CAPITULO 3. FERMENTACIÓN RUMINAL Y DESAPARICIÓN DE LA MATERIA SECA “<i>IN VITRO</i>” DEL BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR EN CULTIVO SÓLIDO CON <i>PLEUROTUS SPP</i>	50
3.1. INTRODUCCIÓN.....	50
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	51
3.3. Cinética de producción de gas <i>in vitro</i>	52
3.3.1. Determinación de las variables químicas nutritivas.....	53
Desaparición <i>in vitro</i> de la materia seca (DIVMS)	53
Análisis estadístico	53

3.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	54
3.5. CONCLUSIONES	60
LITERATURA CITADA	61
CAPITULO 4. ISOFORMAS DE LA ENZIMA LACASA DE <i>PLEUROTUS SPP</i> SOBRE BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR PRE-TRATADO CON QUÍMICOS	64
4.1. INTRODUCCIÓN	64
4.1.1. Sistema de electroforesis desnaturalizante.....	65
4.1.2. Sistema de electroforesis no desnaturalizante.....	66
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	67
4.2.1. Material biológico	67
4.3. Material vegetativo.....	67
4.4. Tratamientos.....	67
4.4.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS-PAGE.....	68
4.4.2. Condiciones de corrida	69
4.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	70
4.6. CONCLUSIONES	73
LITERATURA CITADA	74
6. CONCLUSIONES GENERALES	76
Anexos.....	77

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Composición química (% MS) de algunos residuos agroindustriales.....	5
Cuadro 2. Composición de la pared celular en plantas superiores	7
Cuadro 3. Principales Estados de México productores de caña de azúcar reportados por SIAP-SAGARPA ciclo productivo 2009	13
Cuadro 4. Velocidad de crecimiento radial y producción de biomasa de especies de <i>Pleurotus spp</i> sobre medio extracto bagazo de caña	28
Cuadro 5. Tratamientos experimentales en cultivo sólido y <i>Pleurotus spp</i>	35
Cuadro 6. Concentración de reactivos para determinar xilanasas.....	36
Cuadro 7. Metodología para determinar lacasas	36
Cuadro 8. Actividad de xilanasas por <i>Pleurotus spp</i> sobre bagazo de caña de azúcar con pre-tratamientos químicos durante 21 días de Cultivo sólido (UI gMS ⁻¹)	38
Cuadro 9. Actividad de lacasas de <i>Pleurotus spp</i> sobre bagazo de caña de azúcar con pre-tratamientos químicos durante 21 días de cultivo sólido (UI g MS ⁻¹).....	39
Cuadro 10. Actividad de celulasas por <i>Pleurotus spp</i> sobre bagazo de caña de azúcar con pre-tratamientos químicos durante 21 días de cultivo sólido (UI g MS ⁻¹)	40

Cuadro 11.	Proteína soluble por <i>Pleurotus spp</i> sobre bagazo de caña de azúcar con pre-tratamientos químicos durante 21 días de cultivo sólido (mg/g MS ⁻¹).....	41
Cuadro 12.	Tratamientos experimentales	51
Cuadro 13.	Análisis químico nutritivo del BC pre-tratado con cal 8 % p/p con diferentes especies de <i>Pleurotus spp</i> durante 7 días de CS (% MS)	54
Cuadro 14.	Análisis químico nutritivo del BC agua y diferentes especies de <i>Pleurotus spp</i> durante 7 días de CS (% MS)	55
Cuadro 15.	Análisis químico nutritivo del BC con yeso al 8 % p/p con diferentes especies de <i>Pleurotus spp</i> durante 7 días de CS (% MS)	55
Cuadro 16.	Análisis de la fermentación de la MS y DIVMS, mediante la prueba de producción de gas <i>in vitro</i>	57
Cuadro 17.	Peso molecular (kDa) punto Isoeléctrico (pI) y pH de lacasas de <i>Pleurotus spp</i>	65
Cuadro 18.	Tratamientos experimentales	68
Cuadro 19.	Elaboración de los geles para electroforesis SDS-PAGE.....	69

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Estructura química de la lignina	9
Figura 2.	Tasa fraccional de producción de gas <i>in vitro</i> del pre-tratamiento cal y <i>Pleurotus spp</i>	59
Figura 3.	Proceso para la realización de los zimogramas	70

INDICE DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía 1.	Zimograma de la enzima lacasa de <i>Pleurotus spp</i> durante el día 3 de CS usando ABTS como sustrato	71
Fotografía 2.	Zimograma de la enzima lacasa de <i>Pleurotus spp</i> durante el día 3 de CS revelado con tinción de comassie.....	71
Fotografía 3.	Zimograma de la enzima lacasa de <i>Pleurotus spp</i> durante el día 7 de CS revelado con tinción de comassie.....	72

PRODUCCIÓN DE ENZIMAS LACASAS E ISOFORMAS DEL GÉNERO *PLEUROTUS SPP* SOBRE BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR POR CULTIVO SÓLIDO

Armando Peláez Acero, Dr.

Colegio de Posgraduados 2010

Los residuos agrícolas son los desechos obtenidos del proceso de la producción de los alimentos y fibras vegetales, y su utilización está limitada principalmente por su bajo contenido de proteína y elevados niveles de lignina. Los hongos basidiomicetos como *Pleurotus spp* disminuyen los componentes de la pared celular debido a su capacidad para sintetizar enzimas fibrolíticas. Los pre-tratamientos alcalinos hidrolizan la hemicelulosa y lignina de materiales fibrosos. El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad de enzimas fibrolíticas por *Pleurotus spp* y su efecto en la composición químico-bromatológica del bagazo de caña pre-tratado con yeso y cal al 8 % p/p y agua, así como la evaluación de la producción de gas y DIVMS “*in vitro*” de la MS, además de identificar isoformas de las enzimas lacasas. El análisis de los resultados muestra que la mayor actividad de enzimas fibrolíticas fue para *P. ostreatus IE8*, y *P. sapidus*. El mejor día de cultivo sólido fue el 3, al presentar la mayor actividad de enzimas fibrolíticas. La mayor actividad de lacasas, fue en el día 3 de CS, con *P. sapidus*, y *P. pulmonarius* con 30.55 y 27.42 UI g MS⁻¹. La mayor actividad de enzimas celulasas fue con *P. sapidus* y *P. ostreatus IE8* con 5.64 y 5.0 UI g MS⁻¹. Para xilanasas los mayores valores fueron para *P. ostreatus IE8* y *P. sapidus* con 18.49; 17.61 UI g MS⁻¹. El análisis químico nutritivo mostró una disminución en los valores de FDN, FDA, lignina y carbohidratos solubles en los tratamientos con cal, y en el día 7 el efecto fue mayor. Para la DIVMS el mejor día de CS fue el 7, destacando *P. sapidus* cal día 7 con 66.32 % MS. Los patrones de isoformas de lacasa fueron diferentes en el tratamiento con cal al día 3. Se concluye que el uso de *P. sapidus* y *P. ostreatus IE8* con bagazo de caña de azúcar pre-tratado con cal al 8 % p/p mejora la síntesis de enzimas fibrolíticas así como la DIVMS, además reduce los componentes de la pared celular y favorece la presentación de isoformas de la enzima lacasa.

Palabras clave: fermentación sólida, enzimas fibrolíticas, xilanasas, digestibilidad *in vitro*, zimograma

LACASSE SYNTHESIS AND PRODUCTION OF PLEUROTUS SP ON SUGARCANE BAGASSE BY SOLID CULTURE

Armando Peláez Acero, Dr.

Colegio de Posgraduados 2010

Agricultural residues are the waste obtained from the food and fiber crops processing, and their utilization is limited mainly by its low protein and high lignin content. The basidiomycetes *Pleurotus* decrease the cell wall components due to their ability to synthesize fibrolytic enzymes. Besides, the alkaline pretreatment hydrolyzes the hemicellulose and lignin of fibrous crops. The main task was to evaluate the fibrolytic enzymes activity of *Pleurotus sp* and its effect in the chemical composition of bagasse pre-treated with lime, gypsum 8% w/w and water. The results show that the increased activity of fibrolytic enzymes was in *P. ostreatus IE8* and *P. sapidus*, at third day. In particular, the laccase activity was high with *P. sapidus*, *P. pulmonarius* with 30.55 and 27.42 IU g MS⁻¹, respectively. The increased activity of cellulases was with *P. sapidus* and *P. ostreatus IE8* with 5.64 and 5.0 IU g MS⁻¹. For xylanases the highest values were for *P. ostreatus IE8* and *P. sapidus* with 18.49, 17.61 IU g MS⁻¹. The chemical analysis showed a decreased in NDF, ADF, lignin and soluble carbohydrates in treatments with lime, and at day 7 the effect was greater. IVDMD increased at day seven of solid culture, highlighting *P. sapidus* pre-treated with lime (66.32 %). The laccase isoforms profiles were different in the lime pre-treatment, at day 3. We conclude that utilization of *P. sapidus* and *P. ostreatus IE8* on sugarcane bagasse pretreated with lime at 8% w/w, improved the fibrolytic enzymes synthesis and IVDMD, reduced the cell wall components and improved the enzyme laccase profile.

Keywords: solid state fermentation, enzymes fibrolytic, xylanases, *in vitro*, zymogram

1. INTRODUCCIÓN

Los esquilmos agrícolas son materiales residuales de la actividad agrícola y agroindustrial, y su producción varía debido a condiciones climáticas y factores como la región donde son cultivados. En México los esquilmos agrícolas más significativos son el rastrojo de maíz, bagazo de caña de azúcar, pajas de trigo, avena, cebada, sorgo y frijol. Estos residuos presentan una pared celular constituida por fibrillas de celulosa embebidas dentro de una matriz de lignina y hemicelulosa (Monties, 1991). Los esquilmos agrícolas son comúnmente utilizados en la alimentación de especies pecuarias para satisfacer sus necesidades nutricionales de fibra. Estos residuos son consumidos por los rumiantes debido a las características fisiológicas de su aparato digestivo, sin embargo, el alto contenido de lignina de los residuos minimiza su aprovechamiento al reducir significativamente su digestibilidad (Hungate, 1988). Las principales técnicas para reducir el contenido del material ligninolítico y aumentar el valor nutritivo de las pajas y rastrojos, son los tratamientos químicos, físicos y biológicos.

Tratamientos físicos: son procesos mecánicos para incrementar el valor nutritivo de las pajas y rastrojos así como la tasa de pasaje de la digesta, mediante la reducción del tamaño partícula, lo que permite que el animal consuma más alimento, los más comunes son el picado, molido y peletizado.

Tratamientos químicos: los más comunes son hidróxido de sodio, amoníaco anhidro, hidróxido de calcio, hidróxido de potasio y urea, que rompen enlaces entre la lignina y la hemicelulosa, su finalidad no es la completa degradación del material lignocelulósico si no la modificación de su estructura física (Sundstol y Coxworth, 1984).

Tratamientos biológicos: la lignina puede ser degradada por hongos de la pudrición blanca como *Trametes sp*, *Fomes fomentarius*, *Aspergillus niger*, *Pleurotus spp* etc. los cuales pueden metabolizar la lignina mediante sus enzimas fibrolíticas (celulasas, xilanasas y lacasas), y aumentar la digestibilidad del forraje y producción láctea; sin embargo, también hay efectos en la ganancia de peso y en la digestibilidad de la materia seca (Dawson y Tricarico, 1999; Beauchemin *et al.*, 2004). Según Tous, (2007)

la diferencia en resultados con las enzimas fibrolíticas se puede deber a que no se considera el origen de las enzimas ni la variedad del forraje en el cual se desarrolló.

Para obtener enzimas capaces de degradar compuestos con alto contenido de fibra se han empleado herramientas biotecnológicas tales como el cultivo sólido utilizando diferentes microorganismos como bacterias, levaduras y hongos Christian *et al.* (2005). Los hongos tienen una función importante en la degradación de la fibra debido a su capacidad para penetrar la cutícula y la pared celular de tejidos lignificados (Varga y Kolver, 1997). Estos son los hongos de la pudrición blanca y poseen un sistema multienzimático formado por enzimas celulasas, xilanasas y lacasas que les permite degradar la lignina (Cohen *et al.* 2002).

Una herramienta biotecnológica de gran ayuda para la transformación de materiales con alto contenido ligninolítico es el cultivo sólido (CS), que consiste en el desarrollo de microorganismos sobre soportes porosos con capacidad de retener agua bajo distintas condiciones de humedad, pH, relación carbono nitrógeno, e intercambio de oxígeno. De ahí el interés por conocer las condiciones de crecimiento de los microorganismos o su capacidad de adaptación al sustrato.

El alcance de este proyecto es evaluar la actividad de enzimas fibrolíticas por *Pleurotus spp* durante 21 días de cultivo sólido y su efecto en la pared celular y desaparición *in vitro* de la MS del bagazo de caña de azúcar previamente sometido a pre-tratamientos químicos, además de identificar las isoformas de la enzima lacasa que se presentan en estos tratamientos.

2. JUSTIFICACIÓN

Uno de los residuos agroindustriales más abundantes en México es el bagazo de caña de azúcar, con una producción anual de alrededor de 13'000,370 t de bagazo (SAGARPA-SIAP, 2008). A pesar de la gran cantidad de este residuo y su bajo precio, la utilización en la alimentación de rumiantes es bajo debido a que reduce la digestibilidad al alimento por su alto contenido de lignina. Los hongos fibrolíticos como *Pleurotus spp* al crecer sobre residuos ligninolíticos producen enzimas como xilanasas, celulasas y lacasas que favorecen la DIVMS de la fibra, del mismo modo productos

comerciales ofrecen el mismo efecto utilizando celulasas y xilanasas; sin embargo el costo de estos productos es elevado. Se sabe que la producción de las lacasas está influenciada por diversos factores ambientales como el pH, temperatura, tipo de cultivo y composición del medio (Giardiana *et al.* 1999). Existen pocos trabajos en los que se comparen los perfiles de actividad lacasa entre pre-tratamientos químicos y especies de *Pleurotus spp* por lo que este trabajo propone evaluar el efecto de pre-tratamientos con álcalis y biológicos sobre el bagazo de caña de azúcar y evaluar si estos pre-tratamientos promueven la síntesis de isoformas de enzimas lacasas en cultivo sólido.

3. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la actividad fibrolítica de *Pleurotus spp*, identificación de isoformas de enzimas lacasas, y su efecto en las fracciones fibrosas del bagazo de caña de azúcar pre-tratado con agentes químicos y fermentado por cultivo sólido.

Objetivos específicos

- Elegir la mejor especie del hongo *Pleurotus spp.* que se desarrolle en bagazo de caña de azúcar en función de su velocidad de crecimiento y producción de biomasa.
- Medir la actividad de enzimas fibrolíticas en función del tiempo de producción en cultivo sólido sobre bagazo de caña de azúcar pre-tratado químicamente con *Pleurotus spp.*
- Evaluar el efecto de *Pleurotus spp* en los componentes químicos nutritivos de la pared celular del bagazo de caña.
- Identificar isoformas de la enzima lacasa por peso molecular, producidas por *Pleurotus spp* al ser sometido a pre-tratamientos químicos en bagazo de caña de azúcar.
-

4. HIPÓTESIS

Los pre-tratamientos químicos favorecen la producción de enzimas fibrolíticas del hongo *Pleurotus spp*, reducen los componentes de la pared celular del bagazo de caña de azúcar y favorecen la desaparición *in vitro* de la materia seca, además de inducir la producción de isoformas de enzimas lacasas.

Esquema de trabajo



5. REVISIÓN DE LITERATURA

Subproductos agroindustriales

La industria de alimentos para humanos y animales genera una gran cantidad de subproductos agroindustriales cuyo contenido de nutrientes los convierte en una opción para elaborar alimentos para especies pecuarias (Eun *et al.*, 2006). Entre los subproductos agroindustriales están los residuos y pajas de algodón, cacahuate, arroz, caña de azúcar, cítricos, yuca, maíz y sorgo (Graminha *et al.*, 2008). Sin embargo, los residuos lignocelulolíticos, producidos en grandes volúmenes, presentan un bajo contenido de proteína y uno alto de fibra Cuadro 1.

Cuadro 1. Composición química (% MS) de algunos residuos agroindustriales

Residuos	Proteína total	Celulosa	Hemicelulosa	Lignina
Paja de arroz	4.5	36.5	17.4	5.6
Rastrojo de maíz	6.4	31.8	21.7	7.9
Olote de maíz	2.1	40.7	40.7	6.3
Rastrojo de sorgo	7.8	21.4	24.9	5.5
Rastrojo de soya	9.2	35.5	18.4	17.9
Bagazo de caña	1.7	46.0	24.0	20.0

Cabrera, 1995.

Dependiendo de sus características nutricionales los residuos agroindustriales se dividen en dos grupos: alta digestibilidad, pulpa de cítricos, salvado de gluten de maíz, la cáscara de la soja y residuos de fabricación de cerveza (cebada), baja digestibilidad, bagazo de caña de azúcar, pajas de cereales como maíz, soja, algodón, cascara de cacahuate y restos de las cosechas de gramíneas forrajeras (Graminha, 2008).

La composición química de los materiales lignocelulósicos en su mayoría es de tres polímeros estructurales, celulosa, la más abundante, de 35 al 40%, lignina, de 15 a 35 %; y hemicelulosa, con un 20 a 40% según el vegetal. Las fibras de la celulosa se encuentran alternas en una matriz amorfa de lignina y hemicelulosa. En su estado nativo los materiales lignocelulósicos están asociados a otros componentes no estructurales como fenoles, terpenos o alcaloides, que pueden tener un porcentaje

considerable para llegar a tener influencia significativa en los procesos de degradación (Cowling y Kirt, 1976).

Constituyentes de la pared celular de las plantas de los subproductos agroindustriales

Las plantas son complejos heterogéneos que consisten de diferentes órganos, tejidos, células y componentes subcelulares. Las células vegetales presentan una estructura compleja denominada pared celular, constituida por fibrillas de celulosa embebidas dentro de una matriz de lignina y hemicelulosa (Monties, 1991), también contiene proteínas, ceras y compuestos fenólicos que están presentes junto con los carbohidratos dentro de la pared celular (Barton *et al.* 1976).

La pared celular de las plantas presenta un acomodo básico similar, pero con diferencias importantes entre los principales grupos taxonómicos de los forrajes respecto a su composición y estructura (Jung y Allen, 1995). Las hojas de las leguminosas presentan menor contenido de pared celular que las hojas de las gramíneas y no exhiben un incremento en la concentración de constituyentes de pared celular como ocurre en las gramíneas con la edad. Los tallos de los forrajes muestran una concentración en su pared celular mayor que las hojas, la cual aumenta con la madurez (Jung y Vogel, 1992). Así mismo la concentración de la lignina es mayor en las leguminosas que en las gramíneas. En cuanto al tipo y cantidad de los principales polímeros que conforman la pared celular de las plantas existen diferencias entre plantas dicotiledóneas y monocotiledóneas, los arabinogalacturanos y xiloglucanos están en mayor concentración en la pared de las plantas dicotiledóneas, mientras que la celulosa predomina en la pared celular de ambos tipos de plantas (Jung y Allen, 1995). Dentro de las plantas superiores las cantidades aproximadas de celulosa se presentan el Cuadro 2.

Cuadro 2. Composición de la pared celular en plantas superiores

Tipo de planta	Estructura	Celulosa %	Hemicelulosa %	Lignina %
Angiospermas leñosas (maderas duras)	Tallos	40-55	24-40	18-25
Gimnospermas leñosas (maderas blandas)	Tallos	45-50	25-35	25-35
Monocotiledóneas	Tallos de Herbáceas tales como bambú, trigo, arroz, caña de azúcar)	25-40	25-30	10-30
	Parénquima celular no lignificado de las hojas	15-20	80-85	

Negro, 1991.

Organización de la pared celular

El estudio de la arquitectura de la pared celular vegetal revela la existencia de cuatro capas concéntricas morfológicamente distintas. La capa externa llamada pared primaria con un espesor de 0.1 mm contiene la tercera parte del contenido total de celulosa. En esta capa las microfibrillas de celulosa se encuentran orientadas transversalmente a lo largo del eje de la fibra; la capa siguiente es la pared secundaria que se forma durante el crecimiento y madurez de la célula y contiene 3 subcapas originadas en distintas fases del desarrollo, la exterior S_1 , la capa intermedia S_2 y la capa interior S_3 . Cada una de estas subcapas contiene microfibrillas con distintas ordenaciones que dan lugar a la apariencia laminar de la pared celular. Internamente a la pared secundaria se encuentra el lumen, que es una porción de célula viva que contiene las sustancias intracelulares (Sánchez, 2009).

La microfibrilla es la unidad elemental del tejido fibroso vegetal y contiene la mayor parte de celulosa que constituye las distintas capas y subcapas de la pared celular (la porción más elevada del total de celulosa se encuentra localizada en la subcapa S_2 de la pared secundaria). Estas microfibrillas están a su vez constituidas por fibrillas elementales que se unen lateralmente para dar lugar a la estructura superior. Los otros componentes de la fibra, hemicelulosa y lignina, están localizados entre las microfibrillas. La lignina se encuentra también en la lámina intermedia que es la capa

que rodea la célula vegetal, así como en los espacios situados entre las fibras (Negro, 1991).

Composición y estructura de los materiales lignocelulósicos

a) Polisacáridos: Se encuentran la celulosa y la hemicelulosa, carbohidratos de alto peso molecular que constituyen de 60 al 80% del total de la composición de los materiales lignocelulósicos (Janes, 1969).

La celulosa es el principal componente de la pared celular de la fibra vegetal y es un polímero lineal de D-Glucosa con un alto peso molecular de 500 kDa. Las unidades individuales de la molécula están ligadas por enlaces β -1,4 glucosídicos formando cadenas llamadas microfibrillas, que contienen zonas de mayor orden, la fracción cristalina (50-90 %) compuesta por largas cadenas unidas por cadenas de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals, esto la hace más resistente a la acción enzimática (Cowling *et al.* 1976, Fan *et al.* 1980). La celulosa es insoluble en agua, en ácidos diluidos y en álcalis.

La hemicelulosa está compuesta de cadenas cortas de polisacáridos y es la principal fracción no celulósica de los polisacáridos. Su función es suministrar una unión entre la lignina y la celulosa, en su estado natural existe una forma amorfa que puede dividirse en dos categorías: celulosanos y poliuronidos. Los celulosanos incluyen aquellas hemicelulosas que son polímeros de hexosas tales como manosa, galactosa, glucosa y pentosas tales como xilosa y arabinosa. Los poliuronidos son hemicelulosas que contienen grandes cantidades de ácidos hexurónicos y algunos grupos metoxilo, acetilo y carboxilo libres (Janes, 1969).

b) Lignina: es el tercer componente mayoritario de los materiales lignocelulósicos. Es un polímero aromático sintetizado por polimeración oxidativa de tres alcoholes cinamílicos: cumarol, coniferol y sinapol (alcohol 4-hidroxi, 4-hidroxi-3-metoxi y 4-hidroxi-3,5 dimetiloxicinámico respectivamente). La proporción de los tres alcoholes precursores difiere según se trate de angiospermas o gimnospermas, así como los grupos taxonómicos, particularmente entre las primeras (Negro, 1991). En la lignina de gimnospermas el 90% corresponde a derivados de coniferol, mientras que en la de

angiospermas el 90% corresponde a coniferol y sinapol en proporciones similares. Es un polímero tridimensional de unidades de fenilpropano ligadas por enlaces éter y carbono-carbono, comprende de 20 a 35 % de la estructura de la madera su peso molecular es alto y es amorfa en la naturaleza. La red de la lignina está concentrada en las capas exteriores de las fibras. La lignina confiere rigidez estructural al endurecer y sostener las fibras de polisacáridos (Cowling y Kirk, 1976), ver Figura 1. .

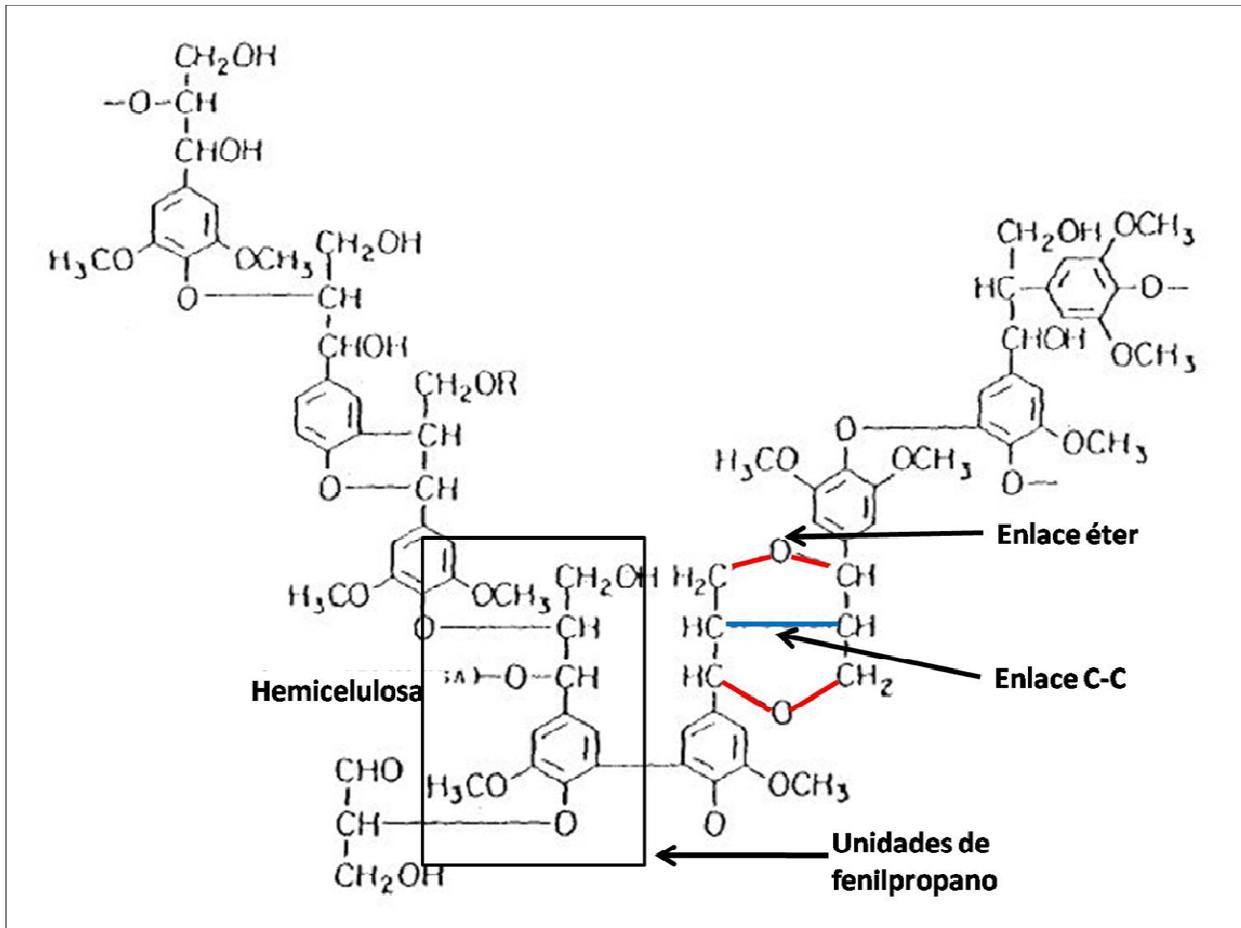


Figura 1. Estructura química de la lignina

c) Otras sustancias o componentes extraños son los materiales que no constituyen las paredes celulares. Estos componentes consisten en una amplia variedad de productos químicos. Atendiendo a sus solubilidades en agua y disolventes orgánicos neutros, pueden clasificarse en productos extraíbles y no extraíbles. A pesar de su presencia en pequeña cantidad, los materiales extraños son muy importantes por que confieren resistencia a la celulosa frente al ataque de los microorganismos y de los

productos químicos. Dentro de la *fracción extraíble*, se encuentran los terpenos que son polímeros de isopreno y tienen importancia dado que son fuente de terpenina en procesos industriales, las resinas, que incluyen gran variedad de compuestos no volátiles como grasas, ácidos grasos, alcoholes, resinas ácidas, fitoesterol, etc. y los fenoles entre los que se encuentran los taninos. Así mismo de esta fracción extraíble se pueden incluir carbohidratos de bajo peso molecular, alcaloides y lignina soluble (Janes, 1969).

En la fracción no extraíble se encuentran las sustancias minerales o cenizas que son principalmente carbonatos alcalinos, alcalinotérreos y oxalatos. Otro componente importante de esta fracción es el sílice que se deposita generalmente, en forma de cristal y es muy abundante en la paja. Pequeñas cantidades de sustancias como almidón pectina y proteínas se encuentran asimismo dentro de la fracción no extraíble (Janes, 1969).

Estrategias para mejorar el valor nutricional de residuos agroindustriales

La biodegradación natural de subproductos agrícolas y su generación no ocurre con la misma velocidad por lo cual se acumulan y se convierten en fuentes de contaminación. El principal obstáculo para el aprovechamiento de la celulosa, hemicelulosa y otros polisacáridos presentes en estos residuos es la lignina la cual reduce su digestibilidad disminuye conforme se encuentre presente. Por lo anterior los residuos agrícolas de naturaleza ligninolítica tienen un potencial bajo para su uso en la alimentación de rumiantes, y la modificación de los componentes de estos residuos se llevan a cabo distintos pre-tratamientos.

El pre-tratamiento es una herramienta importante para llevar a cabo la hidrólisis de la celulosa, su objetivo principal es romper el sello de la lignina y alterar la estructura cristalina de la celulosa (Mosier *et al.* 2005), mediante un pre-tratamiento previo de los residuos ligninolíticos y modificar la estructura de la biomasa celulósica haciendo más accesible la celulosa a las enzimas fibrolíticas que pueden convertir los polímeros de los carbohidratos en azúcares fermentables.

Tratamientos químicos

Método que ha mostrado buenos resultados en la degradación de compuestos fibrosos de los esquilmos agrícolas, en especial aquellos a base de sustancias alcalinas y ácidas como hidróxido de sodio, hidróxido de calcio, amoníaco y sulfato de calcio. (Ramírez *et al.* 2003).

Alcalinos

El hidróxido de sodio constituye el álcali más efectivo en el tratamiento de esquilmos agrícolas, sin embargo su elevado costo y particularmente su difícil manejo han contribuido a su escasa utilización, por lo que se han planteado otros álcalis como el amoníaco (NH_3) y el hidróxido de calcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) que aunque menos efectivos en términos de digestibilidad, son más viables de utilizarse por su costo, disponibilidad y más fácil manejo (Ortega, 1987). Existen procesos de hidrólisis alcalina de materiales lignocelulósicos que son conocidos desde hace tiempo, cuya finalidad no es la completa degradación del material lignocelulósico sino la transformación y modificación de su estructura física (Sundstol y Coxworth, 1984; Silva y Orskov, 1988).

Ácidos

El pre-tratamiento de la lignocelulosa con ácidos (ácido fórmico) se realiza para mejorar la digestibilidad de sustratos con alto contenido de material ligninolítico, el objetivo es solubilizar la hemicelulosa, y con ello tener acceso a la celulosa (Hendriks y Zeeman, 2009). El pre-tratamiento se puede hacer con ácidos fuertes o diluidos, la principal reacción que se produce a llevar a cabo este pre-tratamiento ácido, es la hidrólisis de la hemicelulosa, principalmente los xilanos. Durante el pre-tratamiento ácido se solubiliza la lignina rápidamente condensado y precipitado en ácido al medio (Liu y Wyman, 2003; Shevchenko *et al.*, 1999). La solubilización de la hemicelulosa y la precipitación de la lignina son más pronunciados durante el pre-tratamiento con ácidos sin diluir en comparación de pre-tratamiento con ácidos diluidos Xiao y Clarkson (1997) demostraron que la adición de ácido nítrico durante el pre-tratamiento ácido tuvo un buen efecto en la solubilización de la lignina de periódico.

Bagazo de caña de azúcar (BC)

El Bagazo de caña de azúcar es un residuo fibroso de los tallos de la caña de azúcar que quedan después de la trituración y extracción del jugo, es uno de los residuos agro-industriales más abundante en los trópicos. Se trata de un residuo lignocelulósico que en su mayoría en los ingenios se usa como combustible para las calderas. En comparación con otros residuos agrícolas el bagazo de caña de azúcar puede ser considerado como un rico reservorio de energía solar debido a sus altos rendimientos (alrededor de 80 t ha⁻¹) en comparación con alrededor de 1.2 y 20 t ha⁻¹ para el trigo, otras gramíneas y árboles. (Pandey *et al.* 2000).

Composición química y morfológica

El bagazo esta compuesto aproximadamente 50% de celulosa, 25% de hemicelulosa y 25% de lignina. Químicamente, el bagazo de caña contiene aproximadamente el 50% α -celulosa, el 30% de pentosanos y el 2.4% de cenizas. Desde el punto de vista morfológico el bagazo se define como el conjunto de epidermis, fibras de la corteza, parénquima y haces fibrovasculares que conforman la planta según Barquinero, (1980) mencionado por Anderson, (1988), estos elementos se encuentran en la siguiente proporción: (Base seca) fibras largas de la corteza (50%), parénquima (30%), haces fibrovasculares (15%), células epidérmicas (5%). Mijalkovich y Lara, (1981) plantean que el contenido de fibra útil del bagazo es alrededor del 60%, la medula del 30% y el 10% restante corresponde a los finos (tierra y solubles).

Producción nacional de caña de azúcar

En México durante el 2009 se reporto una producción de 51.1 millones de toneladas (SIAP, 2009), la agroindustria azucarera ocupa el quinto lugar dentro de la producción nacional y cuenta con 60 ingenios distribuidos en 15 estados, de los cuales el estado de Veracruz es el que mayor producción de caña molida así como hectáreas sembradas seguido por Jalisco y San Luis Potosí Cuadro 3.

Cuadro 3. Principales Estados de México productores de caña de azúcar reportados por SIAP-SAGARPA ciclo productivo 2009

Estados productores de caña	Caña molida (t)	Hectáreas cosechadas	Bagazo (t)
Veracruz	42,516,838	663,057	5'102, 020
Jalisco	16,040,753	267,606	1'924,890
San Luis Potosí	5,472,870	64,314	656,744
Chiapas	3,503,863	68,669	420,463
Oaxaca	2,377,703	28,534	285,324
Tamaulipas	2,091,562	40,818	250,987
Sinaloa	2,075,753	31,045	249,090
Nayarit	1,774,361	21,527	212,923
Puebla	1,649,288	26,839	197,914
Morelos	1,612,727	15,451	193,474

SIAP-SAGARPA 2009. t= Toneladas; ha= hectáreas.

Principales usos del bagazo

El bagazo representa cerca del 12% del peso total de la planta, se utiliza por el ingenio como combustible, o bien puede venderse para ser utilizado como cubierta protectora de cultivos o abono, así mismo la fibra se usa para obtener celulosa, papel, cartón, tablas, producción de etanol e hidrogeno. También se utiliza en procesos de bioconversión como la producción de químicos, metabolitos secundarios, hongos comestibles, alimentación de ganado, enzimas, fertilizantes y gas metano (Meunchang *et al.* 2005).

Hongos de la pudrición blanca (pb)

Los macromicetos están formados por largas hifas ramificadas que se reúnen en cordones rizomorfos y cuerpos de reproducción (ascomas, basidiomas) visibles y medibles en centímetros. Son organismos saprobios que absorben la materia orgánica muerta de los residuos donde crecen, o son parásitos de árboles, o viven en simbiosis con plantas formando ectomicorrizas (Carrillo, 2003). En el reino fungí los macromicetos son los más eficientes para descomponer el carbono orgánico, dado el

mecanismo para degradar la celulosa, hemicelulosa y lignina. Durante sus procesos metabólicos degradan la celulosa y la hemicelulosa a diferentes niveles de pH, desde 3.0 para los hongos de pudrición café, hasta 6.0 para los hongos de pudrición blanca. Estos últimos descomponen y mineralizan los constituyentes de la pared celular no celulósicos (Rayner y Boddy, 1988). Entre las ventajas del empleo de estos hongos, destaca su capacidad de degradación de muchos sustratos ya que produce gran cantidad de enzimas como lacasas, xilanasas, lignina peroxidasas (LiPs) y manganeso peroxidasas (MnPs), entre otras, las cuales son responsables de la degradación de lignina; durante el proceso, primero desdoblan la celulosa, hemicelulosa y lignina, a pequeñas sub-unidades monómeras, mediante la secreción de exoenzimas. De igual manera son transformados los polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos, lignina, lípidos y otros compuestos de cadenas largas o insolubles (Griffin, 1994).

Varias especies de basidiomicetos, han sido estudiadas debido a su capacidad de degradar la lignina, entre ellos destaca el hongo *Trametes versicolor*, cuyo sistema enzimático está comprendido por las enzimas lignina peroxidasa, Mn-peroxidasa y lacasa, las cuales tienen un potencial industrial, en el tratamiento de aguas residuales de la industria papelera; además de la producción de enzimas ligninolíticas capaces de desarrollarse en compuestos altos en fibra y por tener la capacidad de crecer en un amplio rango de temperaturas de 30-40 °C (Martínez *et al.* 1996).

Características morfológicas en el género Pleurotus spp.

Las setas como comercialmente se le conoce a éste hongo, pertenece al grupo de basidiomicetos llamado *Pleurotus spp.* La morfología y las diferencias fisiológicas son pocas entre especies, por ejemplo *Pleurotus pulmonarius* tiene en el píleo una extensión lateral de 10 – 13 cm y su superficie es lisa, puede crecer en forma solitaria o en racimo de color blanco, fructifica en verano o en etapas tempranas del otoño. El hongo tiene un olor parecido al anís. *Pleurotus ostreatus* tiene el sombrero en forma de ménsula semicircular, color blanco y en la parte proximal al sombrero es abultado; crece en forma silvestre y fructifica de marzo a septiembre, crece sobre troncos. La materia que utilizan estos hongos para su desarrollo son desechos agrícolas, principalmente bagazos, pulpas y rastrojos.

Enzimas ligninolíticas

Se han identificado dos familias de enzimas ligninolíticas extracelulares, las peroxidasas (Lignina peroxidasa (LiP) y Manganeso peroxidasa (MnP)) y las lacasas. Estas enzimas son capaces de oxidar una gran variedad de compuestos aromáticos y se diferencian en sus requerimientos catalíticos, potencial de oxido-reducción, y en su modo de acción que puede ser directo o indirecto (mediante la cooperación de intermediarios (Daniel *et al.*, 1989; Sutherland *et al.* 1991).

Las principales aplicaciones de las lacasas se encuentran en la industria del papel, concretamente en el blanqueo biológico y en la detoxificación de efluentes. Técnicas de ingeniería genética permitirán obtener lacasas recombinantes modificadas con alto potencial de oxidación, amplio rango de sustratos, o pH neutro.

Las ventajas del uso de la enzima lacasa es que pueden trabajar en la presencia de oxígeno, además pueden degradar lignina en ausencia de otras enzimas como la lignina peroxidasa (LiP) y la manganeso peroxidasa (MnP) (Mayer y Staples, 2002). Por lo que el estudio sobre su empleo para mejorar la calidad de residuos agrícolas para uso en la alimentación animal es promisorio.

Isoenzimas ó isoformas

El intervalo de pH al que la enzima puede actuar es de 3.0 a 9.0 (Xu, 1997).

Las diferentes formas de la enzima difieren generalmente en sus propiedades cinéticas o reguladoras, en la forma del cofactor que utilizan o en su distribución subcelular. Normalmente las isoenzimas tienen secuencias de aminoácidos similares pero no idénticas y en muchos casos comparten claramente el origen evolutivo (Karp y Van der Geer, 2005).

La capacidad de las enzimas para cambiar de forma y ejercer fuerzas sobre los sustratos ilustra una importante característica de estas moléculas: No son rígidas e inflexibles, más bien muestran una capacidad considerable de movimiento interno.

Lacasas (EC.1.10.3.2)

Las lacasas (p-difenol-dioxígeno reductasa) han sido muy estudiadas. Se les ha llamado enzima cupro-proteíca con cobre. Este grupo de enzimas utiliza oxígeno como un aceptor de electrones para remover hidrógenos de los grupos hidroxilo fenólicos, reacción que conduce a la formación de radicales libres, como los obtenidos con compuestos parecidos a las unidades fenólicas de la lignina (Loera *et al.* 2006).

Las lacasas pueden degradar lignina en ausencia de las enzimas lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa, su actividad está ligada a sus tres sitios de cobre que le proporciona un amplio rango para su utilización en diversos procesos industriales (Mayer y Staples, 2002). Las reacciones oxidativas que pueden llevar a cabo las lacasas para despolimerizar la lignina incluyen: rompimiento entre enlaces C α - C β , hidroxilación, rompimiento de estructuras aromáticas y desmetilación (Farnet *et al.*, 2000). Las lacasas son fenoloxidasas ampliamente distribuidas en plantas, hongos de diferentes clases y algunas bacterias (Diamantidis *et al.* 2000).

Características de las lacasas

Las lacasas (p-difenol: dioxígeno oxidoreductasa), junto con las ferroxidasas, ascorbato oxidasas, ceruplasmina y otras enzimas constituyen las proteínas multicobre oxidasas (MCOs). Las MCOs poseen secuencias y estructuras similares que intervienen en los sistemas redox relacionados con el ión cobre. Históricamente los átomos de cobre en proteínas multicobre han sido clasificadas en tres tipos (tipo 1, tipo 2 y tipo 3) por sus propiedades espectroscópicas (Solomon *et al.*, 1996). En el espectro UV-visible, el cobre tipo 1 (azul) muestra máxima absorción cerca de 610 nm y el cobre tipo 3 muestra máxima absorción cerca de 330 nm. Los cobre tipo 1 y 2 son detectables por resonancia electrónica paramagnética, mientras el cobre dinuclear tipo 3 no es detectable.

Los aminoácidos de estos centros de unión al cobre están distribuidos en cuatro regiones altamente conservadas (L1, L2, L3 y L4), típicas de las lacasas que se extienden desde 8 hasta 24 residuos a lo largo de la secuencia de la proteína e

incluyen tanto los aminoácidos específicos de unión al cobre como otros no específicos.

Cobre tipo 1 (T1): es responsable del color azul de la proteína. Tiene una alta absorbancia en la región del visible (605 nm) provocada por la unión covalente cobre-cisteína. Debido al alto potencial redox de este cobre es el sitio donde ocurre la oxidación del sustrato.

Cobre tipo 2 (T2): se caracteriza por no presentar absorbancia detectable en la región visible y por tener una afinidad por aniones (F⁻, CN⁻...) que actúan como inhibidores de la actividad de la enzima.

Cobre tipo 3 (T3): es un complejo binario formado por un par de iones Cu²⁺ -Cu²⁺ unidos por un puente hidróxido con un máximo de absorbancia de 330 nm y un espectro de fluorescencia característico. (Shin et al., 1996).

El intervalo de pH al que la enzima puede actuar es de 3.0 a 9.0 (Xu, 1997).

Los puntos isoeléctricos (pI) de estas enzimas tienen un intervalo que va desde 3.0 hasta 7.0 en los hongos; mientras que en las lacasas de plantas el pI es generalmente de 9.0. El intervalo de pH al que la enzima puede actuar es de 3.0 a 9.0 (Xu, 1997).

Función de las lacasas en los hongos

La función de la lacasa en los hongos no está clara, se ha relacionado con la morfogénesis, con la pigmentación de los conidios, con la formación de rizomorfos, con el desarrollo de cuerpos fructíferos (Thurston, 1994), con la patogénesis (Lewis y Yamamoto, 1990) y en la protección frente a compuestos fenólicos tóxicos liberados durante la degradación de la lignina (Bollag *et al.*, 1988).

Cultivo sólido (CS)

Los procesos de CS existen de manera natural desde el comienzo de la vida en el planeta desde hace siglos para la elaboración de alimentos. El objetivo fundamental es no solo aumentar el contenido proteico de los alimentos, sino mejorar las posibilidades de conservación, cambiar las características físicas, el color, el olor o el sabor de los mismos. La definición más general fue formulada por Viniegra-González (1997), donde

se plantea que "es un proceso microbiológico que ocurre comúnmente en la superficie de materiales sólidos que tienen la propiedad de absorber y contener agua, con o sin nutrientes solubles". Esta definición abarca a procesos donde el soporte sólido es inerte y los sustratos que utiliza el microorganismo pueden ser sustancias solubles en agua.

Ventajas y desventajas del cultivo sólido

- Los medios de cultivo son simples, generalmente subproductos agrícolas que presentan un alto contenido de los nutrientes necesarios.
- La aireación forzada es facilitada por la porosidad del soporte, lo que permite una alta transferencia de oxígeno al microorganismo.
- Pueden emplearse, frecuentemente conidios como inóculo en los procesos de crecimiento de hongos, lo cual disminuye los costos y las manipulaciones en la preparación del inóculo.
- Algunos productos del CS son utilizados integralmente, como alimento animal.
- Los procesos se consideran generalmente como tecnologías limpias.
- Se generan en grandes volúmenes, y se encuentra una gran variedad de ellos en diferentes épocas del año
- Reducen problemas de contaminación

Entre las principales desventajas se encuentran:

- Su aplicación se limita a microorganismos que crecen en bajos contenidos de humedad.
- La extracción del calor metabólico puede ser un problema, sobre todo cuando se trabaja a gran escala y no se controla el proceso.
- Los sustratos que se usan en los procesos de CS son subproductos agrícolas o agroindustriales y algunos requieren pre-tratamientos (Pandey y Mitchell, 2000).

Las condiciones ambientales tales como la humedad, la actividad del agua, el pH, la temperatura, la concentración y disponibilidad del sustrato, la aireación, el tamaño de partículas y la forma de inoculación afectan significativamente el crecimiento y la formación de productos (Doelle *et al.* 1992).

Literatura citada

- Barquinero, E. 1980. Composición física, química y morfológica del bagazo. En: Los derivados de la caña de azúcar. ICIDCA, Ed. Científico-Técnica: 11-13p.
- Barton, F.E., H.E. Amos, D. Burdick and R.L. Wilson. 1976. Relationship of chemical analysis to in vitro digestibility for selected tropical and temperate grasses. J. Anim. Sci. 43:504-512.
- Beauchemin, K. D., Colombatto, D. and Morgavi, D.P. 2004. A rationale for the development of feed enzyme products for ruminants. Can. J. Anim. Sci. 84:23-36.
- Bollag, J-M., K. Shuttleworth., D. Anderson. 1988. Laccase/mediated detoxification of phenolic compounds. Appl. Environ. Microbiol. 54: 3086-3091.
- Cabrera A. 1995. El cultivo de la caña de azúcar en un modelo de agricultura sostenible. II Encuentro Nacional de Agricultura Orgánica. La Habana, 35 p.
- Carrillo L. 2003. Los hongos de los alimentos y forrajes. Ed. 1a edición, 44-69, Universidad de Salta, Salta, Argentina.
- Cohen, R.; Persky, L.; Hadar, Y., 2002. "Biotechnological Applications and Potential of Wood-Degrading Mushrooms of the Genus *Pleurotus*", Appl Microbiol Biotechnol. 58: 582-594.
- Colombatto, D. y K. A. Beauchemin. 2003. A proposed methodology to standardize the determination of enzymic activities present in enzyme additives used in ruminant diets. Can. J. Anim. Sci. 83: 559-568
- Cowling, E.B. y Kirk, T,K., 1976. Properties of cellulose and lignocellulosic materials as substrates for enzymatic conversion processes. Biotechnol. Bioeng. Symp. (6), 95-123
- Daniel, G., Nilsson, T., Pettersson, B. 1989. Intra and extracellular localization of lignin peroxidasa during the degradation of solid wood and wood and fragments by immune-gold labeling. Appl. Environ. Microbiol. 55: 871-881.
- Dawson, K.A. and Tricarico, J.M. 1999. The use of exogenous fibrolytic enzymes to enhance microbial activities in the ruman and the performance on ruminant animals. In: Lyons, T.P. and K.A. Jacques, editors. Biotechnology in the feed Industry. Proc. 15 th Annu Symp Nottingham University Pres. pp. 303-312.

- Diamantidis, G., Effosse, a., Potier, P., Bally, R. 2000. Purification and characterization of the first bacterial laccase in the *rhizospheric bacterium Azopirillum lipoferumk*. Soil Biol. Biochem. 32: 919-927
- Doelle H. W., Mitchell D. A. y Rolz C. E. 1992. Solid Substrate Cultivation. Elsevier Applied Science, London, N. York, Chapter 3, 35.
- Eun, J.S., Beauchemin, K.A., Hong, S.H., Bauer, M.W., 2006. Exogenous enzymes added to untreated or ammoniated rice straw: effects on *in vitro* fermentation characteristics and degradability. Anim. Feed Sci. Technol. 131, 87–102.
- Fan, L, T., Lee, Y.H., Beardmore, D.H. 1980. Mechanism of the enzymic hydrolysis of cellulose; effects of major structural features of cellulose on enzymic hydrolysis. Biochnol. Bioeng. (22), 177-199.
- Farnet, A., Criquet, s., Tagger, s., Gil, g., Le Petit, J. 2000. Purification, partial characterization, and reactivity with aromatic compounds of two laccases from *Marasmius quercophilus* strain-17. Can. J. Microbiol. 46: 189-194.
- Graminha, E.BN., Gonçalves.A.Z.L.,Pirota.R.D.P.B., Balsalore M.A.A., Da Silva.R. Gomes.E. 2008. Enzyme production by solid-state fermentation: Aplication to animal nutrition. Animal Feed Science and technology. 144 1-22.
- Griffin, H. D., 1994. Fungal Physiology. Wily-Liss. A John Willey and Sons. Inc. Publishing Second Edition. New York. 102-107 pp.
- Hakala..Terhi K. 2007. Characterization of the lignin-modifying enzymes of the selective White-rot fungus *Physisporinus rivulosus*. Academic dissertation. Faculty of Agriculture and Forestry and Viikki graduate School in Biosciences University of Helsinki.
- Hendriks. A. T. W. M., Zeeman G. 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. Bioresource Technology (100) 10-18
- Hungate, R.E. 1988. Introduction: The ruminant and the rumen. In: Hobson, P.N. editor. The Rumen Microbial Ecosystem. Elsevier Applied Science. London and New York. pp. 1-19.
- Janes, R, L., 1969. The pulping of wood. 2a Ed., Mc Graw Hiil, New York (1), 34.
- Jung, H.G. y Allen. M. S 1995. Characteristics of plant cell walls affecting intake and digestibility of forage by ruminants. J. Anim. Sci. 73:2774-2790.

- Jung H. G. y Vogel K. P. 1992. Lignification of switchgrass (*Panicum virgatum L.*) and big bluestem (*Andropogon gerardii Vitman*) plant parts during maturation on its effects on fibre degradability". *J. Sci. Food Agric.* 59: 169-179.
- Karp, G y Van der Geer. 2005. *Biología celular y molecular*. Ed. Mc graw Hill. Cuarta edición. 899 p.
- Lewis, N., Yamamoto E. 1990. Lignin: occurrence biogénesis and biodegration. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 41: 455-496
- Liu, C., Wyman, C.E., 2003. The effect of flow rate of compressed hot water on xylan, lignin and total mass removal from corn stover. *Ind. Eng. Chem. Res.* 42, 5409–5416.
- Liyama, K., T.B. Lam, P.J. Meike, D. I. Rhodes and B.A, Stone. 1993. Cell wall biosynthesis and its regulation. In: Jung, H.G., R.R. Buxton. R.D. Hatfield and J. Ralph, editors. *Forage Cell Wall Structure and Digestibility*. ASA-CSSA-ASSA. Madison, Wi. pp. 621-683.
- Loera, C. O., Pérez, P. Ma., Barbosa, R, J., Villaseñor. O. F. 2006. Laccases. *Advances in agricultural and Food Biotechnology*, 2006: 323-340 ISBN: 81-7736-269-0.
- Martínez, M., Bockle B. Camarero S., Guillen F., Martínez A. 1996. MnP isoenzymes produced by two *Pleurotus* species in liquid cultura and during wheat-straw solid-state fermentation. P.p. 183-196.
- Mayer, M, Alfred. Staples, C, Richard. 2002. Lacasse: New functions an old enzyme. *Phytochemistry* 60 551-565.
- Meunchang, S. Panichssakpatana, S., Weaver, R. W. 2005. Co-composting of filter cake and bagasse by-products from a sugar mill. *Bioresourse Technology* 96: 437-442.
- Mijalkovich, E. y Lara, L. (1981). Estudio de los rendimientos en la hidrólisis del bagazo de caña. *Rev. C. Biológicas.* 12:2:203-209.
- Monties, B. 1991. Plant cell walls as fibrous lignocelulosic composities: relations with lignin structure and function. *Anim. Feed Sci. Technol.* 32:159-175.
- Mosier. N., Wyman. C., Dale. B., elander. R., Lee.Y.Y., Holtzapple.M., Ladisch.M. 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource technology.* 96. 673-686.

- Negro, Álvarez, M.J. 1991. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia.
- Ortega M. 1987. Factores que afectan la digestibilidad del alimento en rumiantes. *Vet. Méx.* 18:55-60.
- Pandey, A., Soccol, C. R. and Mitchell, D. 2000. New developments in solid state fermentation: I-Bioprocesses and products. *Process Biochemistry.* 35: 1153-1169.
- Ramírez R. G. L. 2003. Nutrición de rumiantes; sistemas extensivos. Ed. Trillas. México: UANL. p. 304.
- Rayner, A., L. Boddy, 1988. Fungal decomposition of Wood. Jhon Wiley. Chichester, New York. 4-5 pp.
- Rode, L. M., W. Z. Yang y K. A. Beauchemin. 1999. Fibrolytic enzyme supplements for dairy cows in early lactation. *J. Dairy Sci.* 82: 2121-2126
- Royce DJ. 1992. Recycling of spent shiitake substrate for production of the oyster mushroom, *Pleurotus sajor-caju*. *Appl Microbiol Biotechnol*;38:179–82.
- Sánchez, C. 2009. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances.* 27: 185-194
- Shevchenko, S.M., Beatson, R.P., Saddler, J.N., 1999. The nature of lignin from steam explosion/enzymatic hydrolysis of softwood. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 867–876.
- Shin, W. Sundaran U., Cole J., Zhang M., Hedman B., Hodgson K., Solomon E. 1996. Chemical and spectroscopic definition of the peroxide level intermediate in the multicopper oxidases. Relevance to catalytic mechanism of dioxygen reduction of water. *J. Am. Chem. Society* 118: 3202-3215.
- SIAP_SAGARPA. Anuario de producción agrícola. 2009. Consultado el 23/12/2009. www.siap.gob.mx
- Silva, A. T. y Orskov E. R. 1988. Optimisation of treatment conditions of wheat straw with lime: Effect of concentration, moisture content and treatment time on chemical composition and *in vitro* digestibility. *Animal Feed Science and Technology* (74) 57-62.
- Solomon, and Sundaram, U., Machonkin, T. 1996. Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem. Rev.* 96: 2563-2605

- Sundstol, F. y Coxworth, E. M. 1984. Ammonia treatment. In Sundstol F and Owen E. C. (Eds) Straw and other by-products as feed. Elsevier. Amsterdam. 196-247 p.
- Sundstol, F., y coxworth, E. M. 1984. Ammonia treatment. In Sundstol F and Owen E. c. (Eds) Straw and Other By-products as Feed. Elsevier. Amsterdam. 196-247 p.
- Sutherland, J., Selby, A., Freeman, J., Evans, F., Cerniglia,c., 1991. Metabolism of Phenanthrene by *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. 57: 3310-3316.
- Thurston, C. 1994. Th estructure and function of fungal laccases. Microbiology. 140: 19-26
- Tous, Rivera., Karla M. 2007. Enzimas exógenas tipo fibrolíticas sobre el consumo voluntario y digestibilidad de nutrientes de heno de pasto guinea (*Panicum maximum jacq*). Tesis de maestría de Ciencias en Industria Pecuaria. Universidad de Puerto Rico recinto universitario de Mayagüez.
- Kimble M, Pasedeloup MV, Spencer C. 2008. UN Foundation Report. Sustainable bioenergy development in UEMOA member countries by; Chapter 5. (www.globalproblems-globalsolutions-files.org/gpgs_files/pdf/UNF_Bioenergy/UNF_Bioenergy_5.pdf).
- Varga, G. A., and E. S. Kolver. 1997. Microbial and animal limitations to fiber digestion and utilization. J. Nutr. 127: 819-823.
- Viniegra, Gonzalez, G. 1997. Solid State Fermentation: Definition, Characteristics, limitations and monitoring. In Roussos, S.; Lonsane B. K.; Raimbault M. and Viniegra-González, G. Eds. Advances in Solid State Fermentation, Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, Chapter 2: pp. 5-22.
- Xiao, W., Clarkson, W.W., 1997. Acid solubilization of lignin and bioconversion of treated newsprint to methane. Biodegradation 8, 61–66.
- Xu, F., Berka, R., Wahleithner, J., Nelson, B., Shuster, J., Brown, S. 1998. Site-direct mutations in fungal laccase: effect on redox potential, activity and pH profile. Biochem. J. 334: 63-70
- Yang, W. Z., K. A. Beachemin y L. M. Rode. 2000. A comparasion of methods of adding fibrolytic enzymes to lactating cow diets. J. Dairy Sci. 83: 2512-2520.
- Zhang R, Li X, Fadel JG. 2002. Oyster mushroom cultivation with rice and wheat straw. Bioresour Technol;82:277–84.

CAPITULO 1. ADAPTACIÓN Y DESARROLLO DE *PLEUROTUS SPP* EN UN MEDIO DE CULTIVO OBTENIDO DE EXTRACTOS DE BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR

1.1. RESUMEN

La capacidad de los hongos para adaptar rápidamente su metabolismo a diversas fuentes de carbono y nitrógeno depende de la habilidad del hongo para formación de micelio y permitir su desarrollo. *Pleurotus spp* es un hongo capaz de crecer en sustratos ligninolíticos con bajos niveles de proteína mediante la síntesis de enzimas fibrolíticas (Zadrazil, 1978). El objetivo de este estudio fue evaluar la producción de biomasa y velocidad de crecimiento radial (VCR) de distintas especies del hongo *Pleurotus spp* al desarrollarse en cajas de petri con agar extracto de bagazo de caña de azúcar. Las especies fueron: *P. ostreatus IE8*, *P. sapidus*, *P. ostreatus CP50*, *P. djamour* y *P. pulmonarius*. La mejor VCR (mm h^{-1}) la mostró *P. ostreatus IE8* y *P. pulmonarius* no existiendo diferencias significativas entre estas (0.647 y 0.623). *P. ostreatus IE8*, presentó la mejor producción de biomasa (0.193), seguida por *P. pulmonarius* (0.168 g^{-1} gss). Existe una gran variabilidad de adaptación y desarrollo entre especies de *Pleurotus spp*, los estudios de VCR y producción de biomasa son un primer paso cuando se requiere seleccionar la mejor especie de hongo que se adapte a un sustrato y poderla emplear en cultivo sólido. Por lo anterior las cepas que mejor se adaptaron al medio agar bagazo de caña de azúcar fueron *P. ostreatus IE8* y *P. pulmonarius*.

1.2. INTRODUCCIÓN

El aumento de residuos agroindustriales ha tenido un impacto positivo para el uso de herramientas biotecnológicas que pueden mejorar estos residuos, obtener metabolitos secundarios para su comercialización o la mejora de dichos residuos.

En este sentido es fundamental conocer y aplicar técnicas que ayuden a comprender el grado de adaptación y desarrollo de los microorganismos a distintos sustratos comúnmente empleados en el cultivo sólido (CS). Una de las pruebas más utilizadas es el análisis de la velocidad de crecimiento radial (VCR) y la producción de biomasa. La VCR es la capacidad que tiene un microorganismo para colonizar el sustrato Gutiérrez *et al.* (1999), este método es comúnmente utilizado para evaluar la capacidad del hongo para adaptarse y poder invadir el sustrato. Mientras que la producción de biomasa está relacionada con el crecimiento de la biomasa fúngica bajo las condiciones ambientales y del medio de cultivo (Marquina, 1991). Así mismo existen factores de variabilidad entre especies de *Pleurotus spp* siendo un factor importante el tomar en cuenta las diferentes características como selectividad por el sustrato, temperatura, aporte de nutrientes en el medio, pH, humedad y adaptabilidad.

El objetivo de este estudio fue evaluar la velocidad de crecimiento radial y producción de biomasa de distintas especies del hongo *Pleurotus spp* utilizando agar-agar y extracto de bagazo de caña de azúcar como sustrato para su desarrollo.

1.3. MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos experimentales

Se utilizaron cinco especies del hongo *Pleurotus*:

1. *P. ostreatus* IE8 (colección de cultivos de la UAM Iztapalapa),
2. *P. sapidus* (laboratorio Prodicet (México).
3. *P. djamour* CDBB-H-981 (colección nacional de cepas microbianas y cultivos celulares)
4. *P. pulmonarius* CDBB-H-1406 (colección nacional de cepas microbianas y cultivos celulares)

5. *P. ostreatus* CP50 Cepa obtenida del la colección de cepas del Colegio de Posgraduados. México.

El bagazo de caña de azúcar fue adquirido del ingenio azucarero Emiliano Zapata en el Municipio de Zacatepec estado de Morelos.

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

1.3.1. Medios de cultivo

Para la reactivación y propagación de las cepas se uso el medio de cultivo agar-extracto de malta, disolviendo 20 g de extracto de malta, 5 g de peptona de caseína y 15 g de agar-agar en 1 L de agua destilada. Se inoculo una fracción de las cepas en la caja de Petri y se dejo incubando a 28 °C durante 7 días.

Para determinar la VCR y producción de biomasa se elaboró el medio Agar – extracto de bagazo.

Se pesaron 25 g de bagazo de caña de azúcar y posteriormente se hirvió en 1 litro de agua durante una hora, se tapo con papel aluminio para evitar pérdidas excesivas por evaporación; el extracto se filtró, se midió el volumen del extracto obtenido y se aforó a 1 L. Se agregaron 15 g de agar – agar, a continuación se esterilizó el medio durante 15 minutos a 121 °C y 15 PSI, se vertió el medio en cajas de petri y se dejó solidificar; de cada especie reactivada a evaluar se inoculó un 1 cm de diámetro de agar invadido en el centro de una caja de Petri en el medio agar extracto de bagazo y se procedió a incubar durante 7 días a 28°C.

1.3.2. Velocidad de crecimiento radial (VCR)

La VCR se midió con un vernier cada 24 h a partir del día 2 y hasta el día 7 de incubación, tomando al menos 2 medidas en diferente dirección. Con los datos de tiempo y diámetro se obtuvo la regresión y la pendiente representó la VCR (Trinci, 1969). Transcurridos 7 d de incubación, el contenido de la caja Petri se colocó en un vaso de precipitado con 200 mL de agua corriente, se calentó durante 4 minutos en un horno de microondas domestico (LG MS-1742DP), y se filtró en papel filtro Whatman

(No. 541) utilizando una bomba de vacío. El residuo se lavó con 100 mL de agua caliente para eliminar residuos de agar adheridos al micelio. Finalmente la biomasa obtenida se secó por 24 h a 60 °C en una estufa de aire forzado y se pesó. El valor de biomasa se obtuvo por diferencia de peso del peso inicial menos el peso final (Ashok *et al.* 2001).

1.3.3. Diseño experimental y análisis estadístico

Para la velocidad radial y la biomasa se utilizó un diseño experimental completamente al azar, las variables de respuesta fueron la VCR y la producción de biomasa. El procesamiento de los datos se realizó mediante el procedimiento GLM (SAS versión 9.0, 2002) y la comparación de medias mediante la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$; Steel y Torrie, 1986).

1.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Técnicas que ayuden a comprender el grado de adaptación y desarrollo de los microorganismos a distintos sustratos comúnmente empleados en el cultivo sólido son la VCR y producción de biomasa, en este estudio la invasión total de la cajas de Petri sobre los medios de cultivo fue al sexto día y no todas las especies de *Pleurotus* alcanzaron a invadir la caja de Petri; la mayor VCR fue para las especies *P. ostreatus IE8* y *P. pulmonarius* no existiendo diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre estas, sin embargo, *P. pulmonarius* no difirió ($p \leq 0.05$) de *P. sapidus*; los menores valores los mostraron *P. ostreatus CP50* y *P. djamour*. En cuanto a la producción de biomasa *P. ostreatus IE8* fue superior ($p \leq 0.05$) seguida por *P. pulmonarius* y *P. sapidus*. En el Cuadro 4. se presentan los resultados de VCR y producción de biomasa.

Cuadro 4. Velocidad de crecimiento radial y producción de biomasa de especies de *Pleurotus* spp sobre medio extracto bagazo de caña

Especie de <i>Pleurotus</i>	VCR (mm h ⁻¹)	Producción de biomasa (g/gss)
<i>P. ostreatus IE8</i>	0.647 ± 0.008 ^a	0.193 ± 0.033 ^a
<i>P. ostreatus CP50</i>	0.421 ± 0.030 ^c	0.052 ± 0.010 ^d
<i>P. sapidus</i>	0.573 ± 0.018 ^b	0.130 ± 0.038 ^c
<i>P. pulmonarius</i>	0.623 ± 0.021 ^{ab}	0.168 ± 0.029 ^b
<i>P. djamour</i>	0.320 ± 0.031 ^d	0.031 ± 0.041 ^e

Medias con diferente literal por columna son diferentes (p<0.05). VCR= Velocidad de crecimiento radial. gss= gramos de sustrato seco.

Luna, (2006) al utilizar rastrojo de cebada y diferentes fuentes de nitrógeno con el hongo *Pleurotus ostreatus CP50* obtuvo una VCR de 0.67 mm h⁻¹ velocidad superior a la encontrada en este estudio con *Pleurotus ostreatus IE8* (0.647) y *P. ostreatus CP50* (0.421 mm h⁻¹), sin embargo, en el presente estudio no se empleo ninguna fuente de nitrógeno externa. Por otro lado Villegas, (2010) utilizó *Pleurotus sapidus* con un medio de cultivo de extracto de paja de sorgo, y reportó una VCR de 0.606 mm h⁻¹ valores inferiores para *Pleurotus ostreatus IE8* en este trabajo, pero no así para *Pleurotus sapidus* (0.573 mm h⁻¹); así mismo Santillán reportó una VCR de 0.6 mm/h para *Pleurotus ostreatus IE8* incorporando como fuente de nitrógeno peptona de caseína siendo inferior su resultado al mostrado en el presente trabajo para la misma cepa 0.647 mm/h. por lo que existen diferencias entre el sustrato utilizado a pesar de utilizar la misma especie. Respecto a la biomasa Villegas, (2010) con *P. sapidus* reportó una producción de 0.217 g/gss y Santillán de 35.6 mg al utilizar *P. ostreatus IE8* incorporando como fuente de nitrógeno peptona de caseína valores superiores en ambos casos a los presentados en el presente estudio.

1.5. CONCLUSIONES

Existe una gran variabilidad en el comportamiento entre cepas de la misma especie lo que hace difícil determinar el comportamiento de estas dada la individualidad que se manifiesta entre especies. Las cepas que mejor se adaptaron al medio agar bagazo de caña de azúcar fueron *P. ostreatus IE8* y *P. pulmonarius* y *P. sapidus*. la especies *P.*

ostreatus CP50 y *P. djamour* no se adaptaron al medio de cultivo de bagazo de caña debido a que presentaron los menores valores de VCR y producción de biomasa.

LITERATURA CITADA

- Gutierrez. S. G., Saucedo. C.G., Gaime.P.I., Augur.C. 1999. Comparación de dos métodos para la selección de cepas para su uso en fermentaciones en medio solido: Crecimiento radial y longitudinal. Memorias VIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Oaxaca. Sociedad Mexicana de Bioingeniería. A.C. p.104.
- Luna Rodríguez L. 2006. Estudio de la actividad lignocelulósica del hongo *Pleurotus ostreatus* sobre el rastrojo de cebada. Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Estado de México.
- Marquina. D. D. 2005. Producción de biomasa de hongos celulolíticos para la degradación de residuos celulósicos. España. Universidad Comptense de Madrid, pp.26.
- Sánchez H., M. C. 1994. Estudio fisiológico de la fase micelial de crecimiento de *Pleurotus ostreatus*. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa Departamento de Biotecnología. 92 p.
- Santillán Sánchez P. 2010. Extractos fibrolíticos fúngicos como modificadores de la fermentación ruminal *in vitro*. Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Estado de México.
- SAS. SAS/STAT. 2000. Guide for personal computer. Vers. 8. SAS Institute Cary, NC. USA.
- Steel, R. G. D. y Torrie. 1986. Bioestadística: Principios y procedimientos. 2da Edición. Editorial Mc Graw Hill. México. pp. 622.
- Trinci. A.P.J. 1974. A study of kinetics of hyphal extension and branch initiation of fungal mycelia. Journal of General Microbiology 81: 225-236.
- Villegas Castañeda M. 2010. Estudio del cultivo sólido de paja de sorgo en la producción de enzimas fibrolíticas y digestibilidad ruminal *in vitro* con *Fomes fomentarius* EUM1 y *Pleurotus sapidus*. Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Estado de México. pp 98.

Zadrazil, F. 1978. Cultivation of *Pleurotus ostreatus*. In S. TChang, W. A. Hayes (Eds).
The biology and cultivation of edible Mushrooms. London: Academic Press. 521-
557 p.

CAPITULO 2. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE *PLEUROTUS SPP* EN CULTIVO SÓLIDO CON BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR PRE-TRATADO CON AGENTES QUÍMICOS

2.1. RESUMEN

El hongo *Pleurotus spp* posee un sistema multienzimático complejo, conformado por las lacasas, celulasas y xilanasas. La síntesis de estas enzimas fibrolíticas sobre sustratos ligninolíticos le permite degradar además de la lignina, numerosos compuestos de estructuras disímiles y complejas (Jalç *et al* 1999). El objetivo del presente estudio fue producir y evaluar la actividad enzimática de estas enzimas provenientes de los hongos *P. ostreatus IE8*, *P. sapidus*, *P. pulmonarius* y *P. djamour* durante 21 días de cultivo sólido (CS) en bagazo de caña de azúcar pre-tratado durante 4 días con cal, agua y yeso. El pH presentado por los pre-tratamientos fue: 1) con cal al día cero de CS, cercano a 9.0 hasta llegar a 6.8 al día 21; 2) con yeso inicio con 6.8 estabilizándose al día 14; 3) con agua inicio con 7.5 disminuyendo a 5.8 al día 21. Para la actividad de xilanasas, la mayor producción en todos los tratamientos fue en el día 3, con excepción de *P. djamour* que alcanzó su mayor actividad al día 21 con el pre-tratamiento con agua (8.81 UI g MS⁻¹). La especie de *Pleurotus* que obtuvo mayores valores fue *P. ostreatus IE8* con cal (18.49) y *P. sapidus* cal con (17.61 UI g MS⁻¹), sin diferencias significativas entre éstos. La actividad de lacasas fue mayor durante el día 3, seguida por el día 7, y disminuyendo significativamente en el día 14 y 21. De todos los pre-tratamientos el mejor fue cal; y la especie que mostró mayor actividad fue *P. sapidus* con cal en el día 3 (30.55 UI g MS⁻¹) seguida por *P. pulmonarius* (27.42 UI g MS⁻¹). La mayor actividad enzimática para celulasas se presentó durante el día 3 con *P. ostreatus IE8* (5.64) y *P. sapidus* (5.0 UI g MS⁻¹) sin diferencias significativas entre ellos. Los mayores valores de proteína soluble se presentaron en el pre-tratamiento cal día 3 con *P. sapidus* y *P. pulmonarius* (0.82 y 0.81mg g MS⁻¹). Existió un efecto positivo al pre-tratar durante 4 días el bagazo de caña de azúcar con cal al 8 % p/p debido a que mostró la mayor actividad de enzimas fibrolíticas. Estos resultados coinciden con lo reportado por Wu *et al.* (2005) quienes indicaron una eficiencia del 78% para la degradación de lignina por enzimas fibrolíticas a un pH 9.0 y a un pH de 8.0 de 65 % en experimentos alcalinos. Además, al usar *P. ostreatus* para biorremediación a pH de 8.4

y 9.0, este hongo tuvo un buen desarrollo y disminuyeron los metales pesados en los suelos (Rodríguez, 2005). *P. ostreatus IE8* y *P. sapidus* mostraron la mayor actividad enzimática, adaptándose rápidamente al pH del pre-tratamiento y al sustrato.

2.2. INTRODUCCIÓN

Los esquilmos agrícolas se obtienen después de la cosecha de granos y forrajes (Cajal, 1986). Su principal limitante son contenidos bajos de proteína, baja digestibilidad (25–50 %) y bajo consumo, lo que implica una deficiente productividad animal (Carrillo, 1982). Diferentes pre-tratamientos se han sugerido para mejorar la digestibilidad de materiales con alto contenido de lignocelulosa: picado, humectación, humectación y calor, tratamientos alcalinos, ácidos, biológicos y sus combinaciones; estos pre-tratamientos pueden mostrar diferentes niveles de solubilización de la hemicelulosa y lignina, debido a las diferentes concentraciones de material lignocelulósico que presentan los diferentes residuos agrícolas así como del tiempo y tipo de pre-tratamiento (Hendriks y Zeeman, 2009).

El pre-tratamiento alcalino de materiales lignocelulósicos produce un esponjamiento e hidrolizado de la celulosa debido a la pérdida parcial de su fracción cristalina que se transforma en celulosa amorfa, mucho más fácilmente atacable; así mismo produce un efecto de saponificación de ésteres del ácido urónico de los xilanos (Tarkow y Feist, 1969; Fan, 1980) haciendo más accesible la celulosa para las enzimas y las bacterias. (Fengel y Wegener, 1984).

Otra alternativa para incrementar la digestibilidad de residuos ligninolíticos es el uso de enzimas fibrolíticas obtenidas por cultivo sólido (CS) de hongos aeróbicos, bacterias, levaduras naturales o modificadas por ingeniería genética. La utilización de estas enzimas reduce el uso de granos en las dietas formuladas para rumiantes, debido a una mayor eficiencia en el aporte de energía por parte de los sustratos fibrosos (Stokes, 1992; Feng *et al.*, 1996; Gómez, 2003).

El cultivo sólido (CS) es una herramienta que se puede utilizar para mejorar rastrojos o residuos agroindustriales agrícolas (Meneses, 1998). Sin embargo, no todos los

microorganismos pueden crecer o desarrollarse de la misma manera en un mismo sustrato, debido a características propias de actividad del microorganismo y a su adaptación al sustrato. Productos de estas fermentaciones son los complejos de enzimas fibrolíticas que principalmente se obtienen a partir de extractos de fermentación de hongos aeróbicos. Los más utilizados son *Aspergillus niger* (Márquez, 2008), *Trichoderma longibrachiatum* (Beauchemin *et al.*, 1995; Nadeau *et al.*, 2000; Liu y Orskov, 2000) así como *Pleurotus spp* (Villegas, 2010).

El objetivo del presente estudio fue estudiar la actividad enzimática de las enzimas fibrolíticas lacasas, celulasas y xilanasas provenientes de los hongos *P. ostreatus IE8*, *P. sapidus*, *P. pulmonarius* y *P. djamour* durante 21 días de cultivo sólido en bagazo de caña de azúcar pretratado con cal, agua y yeso.

2.3. MATERIALES Y MÉTODOS

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

2.3.1. Material biológico

Se utilizaron cuatro especies del género *Pleurotus spp*

- *P. ostreatus IE8* (colección de cultivos de la UAM Iztapalapa),
- *P. sapidus* (laboratorio Prodicet (México)).
- *P. djamour* CDBB-H-981 (colección nacional de cepas microbianas y cultivos celulares).
- *P. pulmonarius* CDBB-H-1406 (colección nacional de cepas microbianas y cultivos celulares).

2.3.2. Material vegetativo

Se utilizó bagazo de caña de azúcar (BC) proveniente del ingenio Emiliano Zapata, perteneciente en el municipio de Zacatepec en el Estado de Morelos, México. El bagazo tenía un tamaño de partícula de 8 ± 12 cm y 92 % de materia seca (MS).

2.3.3. Elaboración de inóculo de *Pleurotus spp*

Se colocó aproximadamente 300 g de sorgo entero lavado con agua en un recipiente de aluminio con 3/4 partes de agua y se hirvió durante 45 min, se dejó enfriar y escurrir durante 30 min y a continuación los granos de sorgo se colocaron en frascos de vidrio (de 500 g) con tapa (previamente lavados y esterilizados) y se esterilizaron durante 50 min. Al enfriarse los granos de sorgo se incorporó en cada frasco 5 cuadros de aproximadamente 1 cm de agar invadido por el hongo *Pleurotus sapidus*, *P. ostreatus* IE8, *P. pulmonarius* y *P. djamour*. Luego los frascos se colocaron en una incubadora a 28°C durante 12 días.

2.3.4. Pre-tratamientos del bagazo de caña de azúcar

Para el pre-tratamiento con agua se pesaron 105 g de bagazo y se le adiciono 4 veces su peso en seco para alcanzar una humedad de 80 % (420 mL de agua), se colocó en una charola de plástico y se dejó a temperatura ambiente (25 °C) durante 4 días. Aproximadamente cada 8 h se realizaban volteos para evitar una fermentación anaerobia.

Para los pre-tratamientos con cal ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) y yeso (CaSO_4) se utilizaron 105 g de bagazo, 420 mL de agua con 8.4 g del material químico (cal o yeso) que representa el 8 % p/p del bagazo (base seca) Luego el material se colocó en charolas de plástico y se dejaron a temperatura ambiente (25 °C) durante 4 días, con volteos durante cada 8 h.

El anterior procedimiento se llevo a cabo para cada especie de *Pleurotus* evaluada.

2.3.5. Pasteurización y cultivo sólido (CS)

Pasados los 4 días de pre-tratamiento el material de pasteurizó con vapor a una temperatura aproximada de 85 °C durante 90 min. El material se dejó enfriar hasta 25 °C y se inoculó con 5 % p/p de micelio activado de la especie de *Pleurotus* a evaluar. En bolsas plásticas con sello e identificadas se colocaron 28 g del material y se incubó a una temperatura de 28 °C. Los tratamientos se evaluaron a los días 0, 3, 7, 14 y 21. A partir de este momento se considero el día cero de CS.

2.3.6. Tratamientos experimentales

Los tratamientos se describen en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Tratamientos experimentales en cultivo sólido y *Pleurotus spp*

Descripción del tratamiento	Tratamiento	Días de CS
BC con Cal 8 % + <i>Pleurotus ostreatus IE8</i>	calie8	0, 3, 7, 14 y 21
BC con yeso 8 % + <i>Pleurotus ostreatus IE8</i>	yesoie8	0, 3, 7, 14 y 21
BC con agua + <i>Pleurotus ostreatus IE8</i>	aguaie8	0, 3, 7, 14 y 21
BC con Cal 8 % + <i>Pleurotus sapidus</i>	calsap	0, 3, 7, 14 y 21
BC con yeso 8 % + <i>Pleurotus sapidus</i>	yesosap	0, 3, 7, 14 y 21
BC con agua + <i>Pleurotus sapidus</i>	aguasap	0, 3, 7, 14 y 21
BC con Cal 8 % + <i>Pleurotus pulmonarius</i>	calpulmon	0, 3, 7, 14 y 21
BC con yeso 8 % + <i>Pleurotus pulmonarius</i>	yesopulmon	0, 3, 7, 14 y 21
BC con agua + <i>Pleurotus pulmonarius</i>	aguapulmon	0, 3, 7, 14 y 21
BC con Cal 8 % + <i>Pleurotus djamour</i>	caldjamour.	0, 3, 7, 14 y 21
BC con yeso 8 % + <i>Pleurotus djamour</i>	yesodjamour	0, 3, 7, 14 y 21
BC con agua + <i>Pleurotus djamour</i>	aguadjamour	0, 3, 7, 14 y 21

BC= Bagazo de caña de azúcar. CS=cultivo sólido

2.3.7. Medición de la actividad enzimática

Extracto enzimático

Después de obtener el CS en distintos días, se midió la MS y luego se elaboró el extracto enzimático colocando sobre un mortero 30 g de CS y 45 mL de agua destilada macerándose durante 30 min, se filtró utilizando gasa y se recolectó el líquido en probetas para medir el pH. Se colocó el extracto en tubos de plástico con tapa que se centrifugaron a 4 °C durante 15 min a una velocidad de 10 000 G. Luego se recolectó el sobrenadante y se colocaron los tubos en una hilera para el análisis de actividad enzimática.

2.3.8. Actividad enzimática de xilanasas

La actividad de xilanasas se determinó por el método de detección de azúcares reductores utilizando el reactivo DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) como agente reductor (Miller, 1959). Cada muestra se cuantificó por triplicado. El color desarrollado por la reacción se midió por absorbancia a 540 nm, con un espectrofotómetro (Perkin Elmer

UV/VIS). La actividad enzimática se expresó en unidades internacionales (UI g MS⁻¹) donde una UI se definió como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de xilosa por min en las condiciones de reacción indicadas.

Cuadro 6. Concentración de reactivos para determinar xilanasas

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

ECE= Extracto crudo enzimático.

2.3.9. Actividad enzimática de lacasas

La actividad de lacasas se determinó usando como sustrato ABTS (2,2' azino-bis [3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico], 420nm=36,000 M⁻¹ cm⁻¹) según Bressler *et al.* (2000) (Cuadro 7.). La absorbancia se midió cada 30 s durante 5 min a 420 nm con un espectrofotómetro (Perkin Elmer UV/VIS). Una UI se definió como la cantidad de enzima que oxida 1 μmol de sustrato por minuto bajo las condiciones de reacción. La determinación de lacasas se hizo por triplicado (Wolfenden y Wilson, 1982); una vez, realizado el procedimiento anterior se obtuvo una línea de regresión, utilizando los valores de la pendiente y ordenada al origen de la ecuación de la recta para calcular las concentraciones enzimáticas maestras.

Cuadro 7. Metodología para determinar lacasas

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

ECE= Extracto crudo enzimático

2.3.10. Actividad enzimática para determinar celulasas

La metodología para determinar la actividad de celulasas fue similar al del apartado de xilanasas, sin embargo el tiempo de incubación cambia a 50 °C durante 60 min y el sustrato fue carboximetilcelulosa (0.5%) disuelto en amortiguador de citratos (pH 4.8 - 50 mM); así mismo se realizó una curva patrón de glucosa. Los resultados se expresaron en UI por gramo de materia seca (UI g MS⁻¹), donde UI se definió como la cantidad de enzima que libera 1 μmol min⁻¹ de glucosa en las condiciones de reacción mencionadas.

2.3.11. Determinación de proteína extracelular

Se utilizó el método de Bradford (1976) para lo cual a 1.6 mL de extracto crudo enzimático (ECE) se adicionaron 0.4 mL de reactivo de Bradford (Sigma-Aldrich). La cantidad de proteína extracelular soluble se calculó con base en una curva patrón en la que se utilizó seroalbumina bovina. El color desarrollado se midió por absorbancia a 595 nm con un espectrofotómetro (Perkin Elmer UV/VIS).

2.3.12. Diseño experimental y análisis de los datos

Se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial con tres repeticiones por tratamiento (Steel y Torrie, 1986): los factores fueron la especie del hongo (4 especies), el tiempo de fermentación (0, 3, 7, 14 y 21) y pre-tratamiento (cal, yeso y agua). Los datos se analizaron mediante el procedimiento GLM (SAS, 9.0; 2002) y la comparación de medias con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

2.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Existieron interacciones entre pre-tratamiento y cepa ($p \leq 0.05$) y día de cultivo sólido con pre-tratamiento en la actividad enzimática (xilanasas, celulasas y lacasas) y proteína soluble, por lo que su producción dependió del tipo de cepa, día de cultivo sólido y pre-tratamiento.

Los resultados del análisis de varianza mostraron que los pre-tratamientos tuvieron efecto sobre la producción de la actividad enzimática (lacasas, celulasas y xilanasas) y proteína soluble siendo el pre-tratamiento con cal el que presentó mayor actividad. Los

días de CS mostraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) presentando el día 3 la mayor actividad, las especies *P. ostreatus IE8* y *P. sapidus* tuvieron una mayor adaptabilidad a los distintos pH, no así las cepas *P. pulmonarius* y *P. djamour* que en pH alcalino mostró una baja actividad enzimática.

Cuadro 8. Actividad de xilanasas por *Pleurotus spp* sobre bagazo de caña de azúcar con pre-tratamientos químicos durante 21 días de Cultivo sólido (UI gMS⁻¹)

Tratamiento	día 0	día 3	día 7	día 14	día 21
pH cal	9.25 ± 0.23	7.73 ± 0.21	6.72 ± 0.18	6.98 ± 0.15	6.71 ± 0.13
calsap	4.04 ± 1.3 ^c	17.61 ± 2.4^a	4.76 ± 1.4 ^d	7.59 ± 1.8 ^{ab}	5.18 ± 0.8 ^d
calie8	6.11 ± 0.9 ^a	18.49 ± 1.5^a	6.72 ± 0.6 ^b	3.31 ± 0.5 ^e	4.84 ± 0.8 ^d
calpulmon	1.54 ± 0.5 ^f	15.45 ± 2.1^b	7.23 ± 1.5 ^a	5.82 ± 0.4 ^c	4.36 ± 0.3 ^e
caldjamour	1.9 ± 0.06 ^{ef}	6.49 ± 1.3 ^{fg}	5.89 ± 2.3 ^{bc}	4.78 ± 1.4 ^{cd}	9.2 ± 1.5 ^a
pH agua	7.2 ± 0.021	6.53 ± 0.14	6.1 ± 0.18	5.84 ± 0.31	5.61 ± 0.23
aguasap	5.33 ± 1.1 ^{ab}	7.05 ± 1.3 ^f	2.91 ± 0.7 ^f	5.42 ± 0.7 ^c	5.24 ± 0.5 ^d
aguaie8	5.03 ± 1.5 ^b	10.39 ± 3.1 ^c	4.93 ± 0.9 ^{cd}	4.24 ± 0.2 ^d	5.09 ± 0.9 ^d
aguapulmon	2.1 ± 0.4 ^e	6.42 ± 1.4 ^{fg}	3.4 ± 0.7 ^e	3.84 ± 0.8 ^e	3.7 ± 0.6 ^e
aguadjamour	2.2 ± 0.9 ^e	6.59 ± 1.3 ^f	4.77 ± 0.9 ^d	7.22 ± 1.2 ^b	8.81 ± 1.7 ^b
pH yeso	6.9 ± 0.21	6.25 ± 0.34	5.94 ± 0.22	5.6 ± 0.21	5.06 ± 0.31
yesosap	5.06 ± 1.2 ^b	11.5 ± 2.9 ^c	3.7 ± 0.7 ^e	8.24 ± 1.4 ^a	5.16 ± 1.2 ^d
yesoie8	4.79 ± 2.1 ^c	9.63 ± 1.8 ^{de}	5.62 ± 0.9 ^c	5.32 ± 1.1 ^c	4.68 ± 1.2 ^{de}
yesodjamour	2.8 ± 0.4 ^e	8.53 ± 2.1 ^e	7.42 ± .4 ^a	5.08 ± 1.3 ^c	6.56 ± 0.6 ^c
yesopulmon	1.8 ± 0.4 ^f	7.55 ± 1.7 ^{ef}	6.84 ± 0.4 ^b	4.69 ± 0.7 ^d	4.31 ± 0.2 ^e

Medias con diferente literal dentro de columnas son diferentes ($p \leq 0.05$).

El análisis de actividad de xilanasas podemos ver que el mejor tiempo de CS fue durante el día 3 (Cuadro 8.) en el pre-tratamiento con cal con las especies *P. sapidus*, *P. ostreatus IE8* y *P. pulmonarius*; sin embargo *P. djamour* mostró una mayor actividad en los últimos días de CS (14 y 21) en todos los pre-tratamientos, mientras *P. sapidus*, *P. ostreatus IE8* y *P. pulmonarius* manifestaron su mayor actividad durante los primeros días de CS (0, 3 y 7). Así mismo el pH inicial para cal fue de 9.25 y para el día 3 (día de mayor actividad) de 7.7 alcanzando 6.7 al día 21. En el pre-tratamiento agua inicio el pH en 7.2 mostrando al día 21 un valor de 5.61. El pre-tratamiento yeso inicio en 6.9 alcanzando al día 21 de CS 5.06. *P. djamour* durante los días 14 y 21 de CS mostró una actividad mayor que el resto de los tratamientos con agua e incluso que el resto de los días de CS. Esta actividad muestra que necesariamente las pruebas de producción

de biomasa y VCR (realizados en el capítulo anterior, donde *P. djamour* presentó los valores más bajos) son pruebas efectivas para la selección de hongos.

La actividad de las enzimas lacasas (Cuadro 9.) sobre el pre-tratamiento con cal, la máxima actividad se refleja durante el día 3, destacando *P. sapidus* con la mayor actividad durante los días 3 y 7 y 21 de CS, durante el día 14 la mayor actividad la mostró *P. ostreatus IE8* agua (12.58 UI g MS⁻¹). El pH al inicio del CS fue cercano a 9.0, estabilizándose durante el día 7 (7.2) y manteniéndose hasta el día 21 (6.8) de CS.

Cuadro 9. Actividad de lacasas de *Pleurotus spp* sobre bagazo de caña de azúcar con pre-tratamientos químicos durante 21 días de cultivo sólido (UI g MS⁻¹)

Tratamiento	día 0	día 3	día 7	día 14	día 21
pH cal	9.25 ± 0.33	7.73 ± 0.28	6.98 ± 0.19	6.72 ± 0.24	6.7 ± 0.31
calsap	0.27 ± 0.02 ^c	30.55 ± 3.6^a	22.94 ± 4.8 ^a	9.22 ± 2.1 ^b	11.69 ± 2.5 ^a
calie8	0.23 ± 0.04 ^c	21.4 ± 4.3^c	11.96 ± 3.1 ^{cd}	8.81 ± 1.8 ^{bc}	10.02 ± 3.1 ^a
calpulmon	1.3 ± 0.2 ^a	27.42 ± 3.1^b	14.35 ± 2.7 ^b	1.94 ± 0.6 ^e	6 ± 1.6 ^b
caldjamour	1.1 ± 0.21 ^a	15.25 ± 3.6 ^d	10.13 ± 1.9 ^d	2.61 ± 0.8 ^d	1.71 ± 0.8 ^e
pH agua	7.2 ± 0.24	6.51 ± 0.41	6.1 ± 0.32	5.84 ± 0.43	5.61 ± 0.31
aguasap	0.59 ± 0.11 ^{bc}	9.6 ± 1.9 ^e	9.48 ± 1.9 ^{ef}	7.57 ± 0.7 ^c	6.41 ± 1.5 ^b
aguaie8	0.66 ± 0.16 ^b	5.64 ± 1.1 ^f	14.8 ± 2.5 ^b	12.58 ± 1.7 ^a	4.81 ± 0.9 ^c
aguapulmon	0.56 ± 0.008 ^{bc}	17.23 ± 3.5 ^{cd}	14.32 ± 2.9 ^b	2.86 ± 0.9 ^d	0.46 ± 0.1 ^f
aguadjamour	0.89 ± 0.16 ^b	6.9 ± 2.2 ^f	5.81 ± 0.9 ^g	0.4 ± 0.08 ^f	2.7 ± 0.9 ^d
pH yeso	6.9 ± 0.41	6.25 ± 0.21	5.94 ± 0.33	5.66 ± 0.28	5.25 ± 0.36
yesosap	0.2 ± 0.006 ^c	5.07 ± 1.8 ^{fg}	7.99 ± 1.3 ^{fg}	6.73 ± 1.1 ^c	7.56 ± 1.6 ^b
yesoie8	0.25 ± 0.005 ^c	5.88 ± 2.1 ^f	8.42 ± 1.4 ^f	7.81 ± 2.8 ^c	6.42 ± 2.7 ^b
yesopulmon	0.75 ± 0.3 ^b	11.09 ± 1.65 ^{de}	8.39 ± 2.1 ^f	0.24 ± 0.1 ^f	4.83 ± 1.2 ^c
yesodjamour	1.2 ± 0.27 ^a	6.86 ± 2.3 ^f	6.41 ± 0.9 ^g	0.21 ± 0.03 ^f	3.22 ± 0.06 ^d

Medias con diferente literal dentro de columnas son diferentes ($p \leq 0.05$).

La actividad de lacasas durante CS con solo agua inicia con un pH cercano a 7, estabilizándose cerca del día 7 y terminando luego de 21 días de CS cercano a 5.9. La especie que mayor actividad presentó fue *P. pulmonarius* al día 3 de CS, sin embargo *P. ostreatus IE8* mostro mejores valores durante los días 7 y 14 y *P. sapidus* al día 21 de CS. La mayor actividad lacasa con el pre-tratamiento con yeso se mostro al día 3 de CS, con *P. ostreatus IE8*, durante el día 7 los mostro *P. pulmonarius* y *P. ostreatus IE8*,

para el día 14 de CS hubo una disminución en la actividad enzimática por parte de *P. djamour* y *P. pulmonarius*, mejorando estos valores al día 21 de CS.

La actividad de enzimas celulasas se puede observar en el Cuadro 10. observando los mayores valores en el pre-tratamiento cal, así mismo la actividad celulasa inicia a un pH de 9.25 para después estabilizarse al día 7 de CS (6.98); la especie que mayor actividad mostró fue *P. ostreatus IE8* (5.64 UI g MS⁻¹), durante el día 3 y 21 de CS, destacando *P. djamour* al día 7 de CS con 1.8 (UI g MS⁻¹). La actividad celulasa presentó una caída rápida en su actividad, luego del día 3 de CS, indicando que el desarrollo de estas enzimas requiere de una mayor fuente de nutrientes en el sustrato que al parecer el bagazo de caña de azúcar no aporta. El pre-tratamiento agua presentaba un pH de 7.0, estabilizándose durante el día 7 de CS (Cuadro 10.) y terminado al día 21 cercano a 5.8, el día que mejor actividad mostró fue el día 3 por la especie *P. ostreatus IE8*, reduciendo su actividad al día 7, sin embargo para el día 14 de CS repunto nuevamente la actividad y es la especie *P. djamour* la que destaca por su mayor actividad hasta el día 21. La actividad de la enzimas celulasas en el pre-tratamiento con yeso, mostró que durante el día 3 de CS el pH era cercano al 7.0, sin embargo al día 7 se estabilizo cercano a 5.0, al igual que en el pre-tratamiento con cal, el pre-tratamiento con yeso mostro su mayor actividad al día 3 de CS, teniendo después una reducción en su actividad; este comportamiento no se observó en el tratamiento con solo agua, o al menos en menor intensidad. *P. djamour* destaca al día 21 de CS dado que presentó una mayor actividad que el resto de las especies de *Pleurotus* al día 21 de CS.

Cuadro 10. Actividad de celulasas por *Pleurotus spp* sobre bagazo de caña de azúcar con pre-tratamientos químicos durante 21 días de cultivo sólido (UI g MS⁻¹)

Tratamiento	día 0	día 3	día 7	día 14	día 21
pH cal	9.25 ± 0.33	7.73 ± 0.28	6.98 ± 0.19	6.72 ± 0.24	6.7 ± 0.31
calsap	0.35 ± 0.002 ^c	5.0 ± 0.8 ^a	0.72 ± 0.007 ^b	0.64 ± 0.01 ^c	0.92 ± 0.04 ^c
calie8	0.36 ± 0.002 ^c	5.64 ± 0.2^a	0.43 ± 0.003 ^c	0.51 ± 0.003 ^c	2.16 ± 0.2 ^a
calpulmon	0.11 ± 0.002 ^d	2.4 ± 0.2 ^c	1.5 ± 0.03 ^a	0.65 ± 0.08 ^c	0.51 ± 0.01 ^d
caldjamour	0.14 ± 0.004 ^d	2.6 ± 0.2 ^c	1.8 ± 0.003 ^a	0.51 ± 0.7 ^c	0.99 ± 0.02 ^c

pH agua	7.2 ± 0.021	6.53 ± 0.14	6.1 ± 0.18	5.84 ± 0.31	5.61 ± 0.23
aguasap	0.88 ± 0.002 ^a	1.9 ± 0.1 ^d	1.04 ± 0.001 ^a	0.76 ± 0.03 ^c	0.8 ± 0.07 ^c
aguaie8	0.82 ± 0.003 ^a	2.46 ± 0.3 ^c	0.5 ± 0.008 ^{bc}	0.33 ± 0.08 ^d	0.46 ± 0.04 ^d
aguapulmon	0.16 ± 0.002 ^d	0.38 ± 0.006 ^f	0.40 ± 0.003 ^c	0.68 ± 0.02 ^c	0.42 ± 0.03 ^d
aguadjamour	0.12 ± 0.006 ^d	0.45 ± 0.003 ^e	0.81 ± 0.009 ^b	1.6 ± 0.1 ^a	1.02 ± 0.08 ^c
pH yeso	6.9 ± 0.21	6.25 ± 0.34	5.94 ± 0.22	5.6 ± 0.21	5.06 ± 0.31
yesosap	0.72 ± 0.008 ^{ab}	3.61 ± 0.7 ^b	0.59 ± 0.006 ^b	1.25 ± 0.07 ^a	0.54 ± 0.008 ^d
yesoie8	0.75 ± 0.008 ^a	3.71 ± 0.8 ^b	0.28 ± 0.005 ^d	0.32 ± 0.02 ^d	0.53 ± 0.003 ^d
yesopulmon	0.9 ± 0.009 ^e	0.36 ± 0.008 ^f	0.38 ± 0.006 ^c	0.63 ± 0.05 ^c	0.21 ± 0.02 ^e
yesodjamour	0.8 ± 0.003 ^e	0.51 ± 0.008 ^e	0.41 ± 0.006 ^c	1.19 ± 0.02 ^b	1.83 ± 0.3 ^b

Medias con diferente literal dentro de columnas son diferentes ($p \leq 0.05$).

La proteína soluble en los tratamientos con cal y agua mostro un patrón similar entre la cantidad producida y los pH en los que se presentó, sin embargo para el tratamiento con yeso, este patrón es diferente menos estable y con una producción menor, patrón que se relaciona con la actividad enzimática (celulasas, lacasas y xilanasas) que se mostró en este pre-tratamiento (Cuadro 11.).

Cuadro 11. Proteína soluble por *Pleurotus spp* sobre bagazo de caña de azúcar con pre-tratamientos químicos durante 21 días de cultivo sólido (mg/g MS⁻¹)

Tratamiento	día 0	día 3	día 7	día 14	día 21
calsap	0.089 ± 0.002 ^b	0.82 ± 0.01 ^a	0.67 ± 0.009 ^a	0.7 ± 0.01 ^a	0.71 ± 0.005 ^a
calie8	0.085 ± 0.004 ^b	0.68 ± 0.2 ^b	0.59 ± 0.004 ^a	0.7 ± 0.04 ^a	0.69 ± 0.004 ^a
calpulmon	0.08 ± 0.003 ^b	0.81 ± 0.07 ^a	0.77 ± 0.008 ^a	0.61 ± 0.01 ^a	0.58 ± 0.005 ^a
caldjamour	0.069 ± 0.003 ^{bc}	0.7 ± 0.08 ^{ab}	0.62 ± 0.006 ^a	0.63 ± 0.009 ^a	0.61 ± 0.004 ^a
aguasap	0.067 ± 0.008 ^{bc}	0.63 ± 0.021 ^{bc}	0.48 ± 0.07 ^{ab}	0.49 ± 0.008 ^b	0.47 ± 0.02 ^b
aguaie8	0.101 ± 0.004 ^a	0.6 ± 0.008 ^{bc}	0.59 ± 0.002 ^a	0.55 ± 0.02 ^{ab}	0.44 ± 0.01 ^b
aguapulmon	0.07 ± 0.008 ^{bc}	0.76 ± 0.004 ^{ab}	0.31 ± 0.002 ^b	0.38 ± 0.008 ^b	0.44 ± 0.008 ^b
aguadjamour	0.064 ± 0.004 ^{bc}	0.68 ± 0.06 ^b	0.26 ± 0.02 ^{bc}	0.45 ± 0.008 ^b	0.54 ± 0.008 ^{ab}
yesosap	0.069 ± 0.009 ^{bc}	0.27 ± 0.001 ^c	0.11 ± 0.003 ^c	0.3 ± 0.006 ^c	0.29 ± 0.01 ^c
yesoie8	0.068 ± 0.001 ^{bc}	0.24 ± 0.009 ^c	0.14 ± 0.006 ^c	0.37 ± 0.008 ^{bc}	0.42 ± 0.009 ^b
yesopulmon	0.039 ± 0.004 ^c	0.41 ± 0.003 ^c	0.37 ± 0.004 ^b	0.11 ± 0.008 ^d	0.3 ± 0.02 ^c
yesodjamour	0.032 ± 0.002 ^c	0.39 ± 0.007 ^c	0.4 ± 0.001 ^b	0.3 ± 0.007 ^c	0.44 ± 0.02 ^b

Medias con diferente literal dentro de columnas son diferentes ($p \leq 0.05$).

Los valores de pH que se presentaron en el presente estudio fueron diversos, sin embargo la actividad enzimática de *Pleurotus* mostró una buena actividad en todos ellos, lo anterior coincide con estudios en donde emplearon a *Pleurotus ostreatus* para procedimientos de bioremediación, reportando que este hongo obtuvo un buen

desarrollo a pH de 8.4 y 9.0 logrando disminuir metales pesados en los suelos (Rodríguez, 2005). Kùs y Liu, (2000) reportaron que cuando se desarrolla *Pleurotus ostreatus* en aguas contaminadas, puede tolerar niveles altos de sales, pero durante el desarrollo del cuerpo fructífero es mejor su actividad a pH neutro o ligeramente ácido, entre 6 y 7.

En otra investigación Avila, (2005), llevo a acabo un CS con rastrojo de maíz con el hongo *Pleurotus ostreatus IE8* encontrando una actividad lacasa de 0.195 UI g⁻¹ MS siendo superior nuestros resultados. Estudios realizados por Villegas, (2010) realizó un CS con rastrojo de sorgo y cal al 2 % empleando el hongo *Pleurotus sapidus*, y reportó una actividad xilanasa de 24.90 y 2.69 UI g⁻¹ MS para sus tratamiento con cal y con agua respectivamente, siendo superior sus resultados que los nuestros para su tratamiento con cal; sin embargo estos resultados fueron al día 20 de CS y nuestros mejores valores fueron durante el día 3 de CS. Por otro lado, Kotterman, (2003) reportó una actividad de xilanasas de *Pleurotus ostreatus* de 1.1 U⁻¹ mL después 16 días de CS con residuos de plátano siendo este valor muy inferior al nuestro. Eichlerová *et al.* 2000 reportó una actividad de 19.02 y 0.22 UI g⁻¹ MS al llevar a cabo un CS con *Pleurotus P19* y *Pleurotus F6* siendo sus resultados menores a los encontrados en este trabajo. Santillán, 2010 reportó una actividad de 6.32 UI g⁻¹ MS al día 7 de CS con *Pleurotus ostreatus IE8* y bagazo de caña siendo superiores los valores aquí reportados en los tratamientos con cal y durante el día 3 de CS. La actividad de enzimas xilanasas reportados por Márquez *et al.* (2008) al emplear *Pleurotus ostreatus IE8* con bagazo de caña fue de 27.41 UI g⁻¹ MS siendo superior este valor al presentado en este trabajo para los tratamientos con cal y *P. ostreatus IE8* y *P. sapidus* 18.49 y 17.61 UI g⁻¹ MS respectivamente, sin embargo el valor que observamos fue durante el día 3 de CS, reduciendo 11 días el proceso de CS.

Para celulasas: Márquez *et al.* (2008).empelando *Pleurotus ostreatus IE8* con bagazo de caña reportó una actividad a los días 14 y 19 de CS de 0.96 y 1.16 UI g⁻¹ MS, reportando en el presente trabajo actividad de celulasas de 3.52 con pre-tratamientos químicos y 3.24 UI g⁻¹ MS con solo agua en el bagazo para el día 3 de CS siendo mejores estos valores al empleo de la cal así como el pre-acondicionamiento de 4 días

antes de iniciar el CS con *Pleurotus sapidus*. Ávila en el 2005, llevo a cabo un CS con rastrojo de maíz con el hongo *Pleurotus ostreatus IE8* reportando una actividad celulasa de $0.073 \text{ UI g}^{-1} \text{ MS}$ siendo menores estos valores a los reportados en el presente trabajo. Villegas, (2010). realizo un CS con rastrojo de sorgo empleando el hongo *Pleurotus ostreatus IE8*, reportando una actividad celulasa de 0.71 y $6.51 \text{ UI g}^{-1} \text{ MS}$ para sus tratamiento con cal y con agua siendo superior su resultado con su tratamiento con gua que los valores encontrados en nuestro trabajo, sin embargo para celulasas los valores en nuestro trabajo no hay diferencia estadística entre los valores del pre-tratamiento con cal y con solo agua. sin embargo estos resultados fueron al día 20 de CS y los nuestros durante el día 3 de CS. Eichlerová et al. 2000 reportó una actividad de 11.4 y $10.14 \text{ UI g}^{-1} \text{ MS}$ al llevar a cabo un CS con *Pleurotus P19* y *Pleurotus F6* siendo sus resultados superiores a los encontrados en este trabajo. Santillán, (2010) reportó una actividad de $0.55 \text{ UI g}^{-1} \text{ MS}$ al día 7 de CS con *Pleurotus ostreatus IE8* y bagazo de caña siendo superiores los valores aquí reportados en los tratamientos con cal y durante el día 3 de CS.

Para lacasas: Márquez (2008) reportó una actividad de 15.54 y $11.75 \text{ UI g}^{-1} \text{ MS}$ utilizando *Pleurotus ostreatus IE8* con bagazo de caña durante los días 14 y 19 de CS respectivamente, en el presente trabajo encontramos una actividad de 30.55 y $27.42 \text{ UI g}^{-1} \text{ MS}$ durante el día 3 de CS con *Pleurotus sapidus* y *Pleurotus pulmonarius* respectivamente, siendo superiores los valores presentados en este trabajo, resaltando el empelo de la cal para alcanzar estos valores al día 3 de CS. Villegas, (2010) realizo un CS con paja de sorgo empleando el hongo *Pleurotus ostreatus IE8*, reportando que al día 20 de CS una actividad de 4.59 y $0.58 \text{ UI g}^{-1} \text{ MS}$ para sus tratamientos con cal y sin cal respectivamente, siendo superiores nuestros valores, sin embargo este trabajo coincide con una actividad superior para sustratos pre-tratados con cal que sin cal. Santillán, 2010 reporto una actividad de $10.65 \text{ UI g}^{-1} \text{ MS}$ al día 7 de CS con *Pleurotus ostreatus IE8* y bagazo de caña siendo superiores los valores aquí reportados en los tratamientos con cal y durante el día 3 de CS.

2.5. CONCLUSIONES

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

Con los resultados mostrados podemos decir que el tratamiento que produjo mayor actividad enzimática para la enzima lacasa fue cal al 8%, seguido por agua, para la enzima celulasas y xilanasas el mejor tratamiento fue cal, seguido por yeso 2%.

En cuanto al pH, la mayor actividad para lacasa se presentó cuando existió en el cultivo sólido pH de 7.6 y 7.2, correspondientes a los días 3 y 7; para celulasa la mejor actividad se presentó con valores de 7.6 correspondiente al día 3; para xilanasas el mejor valor fue cuando existieron valores de aproximadamente 7.6 que corresponde al día 3.

El mejor día de cultivo sólido independientemente del tratamiento fue el día 3 seguido por el día 7. Existiendo diferencias significativas $p < 0.05$ con el resto de los días.

La mejor variedad del hongo *Pleurotus* para la enzima lacasa fue *pulmonarius*, seguido por *sapidus*; para celulasas la mejor variedad fue *IE8*, seguido por *sapidus* y para xilanasas la mejor variedad fue *IE8* seguida por *sapidus*. Por lo anterior podemos observar que *Pleurotus spp* puede desarrollarse bajo pH alcalino.

LITERATURA CITADA

- Asha P C and Prema P. 2007. Production of cellulose-free endoxylanase from novel alkalophilic thermotolerant *Bacillus pumilus* by solid-state fermentation and its application in wastepaper recycling. *Bioresour Technol.* 98: 485-490.
- Avila Mayo H. Enzimas fibrolíticas de *Pleurotus ostreatus* y su actividad en rastrojo de maíz. Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Estado de México. 2005.
- Baldrian P. 2006. Fungal laccases-occurrence and properties. *FEMS Microbiol Rev.* 30:215-242.
- Beauchemin, K.A., L.M. Rode and V.J. Sewalt. 1995. Fibrolitic enzymes increase fiber and digestibility and growth rate of steers fed dry forages. *Can. J. Anim. Sci.* 75:641-644.
- Biely, P. 1993. Hemicellulose and hemicellulases, Ed. Coughlan y Hazlewood, Portland Press Research Monograph, p. 29.
- Bradford, M. 1976. A quick and sensitive method for the cuantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry.* 72: 248-254.
- Bressler D C, Fedorak P M and Pickerd M A. 2000. Oxidation of carbazole, N-ethylcarbazote, fluorine, and dibenzothiophene by the laccase of *Coriolopsis gallica*. *Biotechnol Lett.* 22:1119-1125.
- Cajal, N.C., 1986. Pre-tratamientos alcalinos de residuos fibrosos y su valor nutritivo para rumiantes, AMENA, México, págs. 61-70.
- Carrillo, M., Vigoroso., 1982. Potencial forrajero de los esquilmos (1), en Cebú , vol. VII, núm.6, págs. 52,53 y 60.
- Chang, V. S., holtzapple, M. t. 2000. Fundamental factors affecting enzymatic reactivity. *Appl. Biochem. Bioechnol.* 5-37.
- Dawson, K.A. and J.M. Tricarico. 1999. The use of exogenous fibrolytic enzymes to enhance microbial activities in the rumen and the performance on ruminant animals. In: Lyons, T.P. and K.A. Jacques, editors. *Biotechnology in the Feed Industry. Proc. 15th Annu Symp. Nottingham University Press.* Pp 303-312.

- Eichlerová I, Ruel K, Homolka L, Joseleau J-P, Nerud F. 2000. Lignolytic characteristics of *Pleurotus ostreatus* strain F6 and its monokaryotic protoplast derivative P19. *Can. J. Microbiol.* 46: 1153-1158.
- Elisashvili V, Kachlishvili E and Penninckx M. 2008. Effect of growth substrate, method of fermentation, and nitrogen source on lignocelluloses-degrading enzymes production by white-rot basidiomycetes. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 35:1531-1538.
- Fan, L, T., Lee, Y.H., Beardmore, D.H. 1980. Mechanism of the enzymic hydrolysis of cellulose; effects of major structural features of cellulose on enzymic hydrolysis. *Biochnol. Bioeng.* (22), 177-199.
- 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 characteristic of mature coolseason grass forage in beef steers. *J. Anim. Sci.* 74 1349-1357.
- Fengel, D., Wegener, G., 1984. *Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions.* De Gruyter, Berlin.
- Gómez-Vázquez, A., J. Pérez, G. D. Mendoza, E. Aranda, and A. Hernández. 2003. Fibrolytic exogenous enzymes improve performance in steers fed sugar cane and stargrass. *Livestok. Prod. Sci.* 82:249-254.
- Hendriks. A. T. W. M., Zeeman G. 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* (100) 10-18
- Jalč Dušan, Peter Siroka, Július Feješ, and Zuzana Čerešňáková. 1999. Effect of three strains of *Pleurotus tuber – regium* (Fr.) Sing. On chemical composition and rumen fermentation of wheat straw. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 45, 277-282.
- Liu. J.X. and E.R. Orskov. 2000. Cellulase treatment of untreated and steam pre-treated rice straw-effect on *in vitro* fermentation characteristics. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 88:189-200.
- Márquez A. A.T. 2008. Evaluación de las enzimas fibrolíticas producidas por los hongos *Trametes sp.*, *Pleurotus ostreatus* y *Aspergillus niger*. Tesis doctoral. Universidad Nacional Autónoma de México. 112 p.
- Membrillo Venegas I. 2008. Efecto de la tipificación del bagazo de caña sobre el perfil de producción de enzimas lignocelulolíticas de *Pleurotus ostreatus*. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana. Ciudad de México, México.

- Meneses. M. M. 1998. Caracterización e identificación bioquímica de un producto de fermentación sólida, con actividad prebiótica. Tesis de Maestría. UAM-I. México. D.F. 134 p.
- Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31: 426-428.
- Monfort A., Blasco A., Prieto J.A. & Sanz P. 1996. "Combined expresión of *Aspergillus nidulans* endoxylanase X-24 and *Aspergillus oryzae* α -amilase in industrial baker's yeast and their use in bread making" Appl. Environ. Microbiol. 62 (10), 3712 – 3715
- Muñoz, C.; Guillén, R; Martínez, A.T.; Martínez, M.J. 1997. Catalytic properties, and Lacasse isoenzymes of *Pleurotus eryngii* characterization, catalytic properties, and participation in activation of molecular oxygen and Mn⁺² oxidation. Applied Environmental Microbiology, 63 (6): 2166-2174
- Nadeau, E.M., J.R. Rusell and D.R. Buxton. 2000. Intake, digestibility and composition of orchard grass and alfalfa silages treated with cellulase inoculant, and formic acid fed to lambs. J. Anim. Sci. 78:2980-2989.
- Ordaz Hernández A. 2008. Efecto de la temperatura en la producción de enzimas lignocelulolíticas por *Trametes sp. EUM1* en cultivo solido. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana. Ciudad de México, México.
- Pandey, A. 1992. Recent process developments in solid-state fermentation. Process biochemistry, 27, 109-117.
- Park, Y.S., S.W. Kang, J.S. Lee, S.I. Hong and S.W. Kim. 2002. Xylanase production in solid state fermentation by *Aspergillus niger* mutant using statistical experimental designs. Appl. Microbiol. Biotechnol. 58:762-766.
- Ponce N T y Pérez A O. Celulasas y xilanasas en la industria. 2002. In: XXX Aniversario de Biotecnología y bioingeniería. Avance y Perspectiva.. 21: 273-277.
- Pozdnyakova N N, Turkovskaya O V, Yudina E N and Radakiewicz-Nowak Y. 2006. Yellow laccase from the fungus *Pleurotus ostreatus D1*: purification and characterization. Appl Biochem Microbiol.. 42(1):56-61.

- Rodríguez P S, Bermúdez S R C, Serrat D M y Kourouma A. 2006. Selección de cepas de *Pleurotus ostreatus* para la decoloración de efluentes industriales. Rev Mex Micol.. 23: 9-15.
- Rodríguez, Z. 2006. Fermentación en estado sólido de la caña de azúcar con una fuente amilácea (*Ipomea batata*). Tesis doctoral en Ciencias Veterinarias. Instituto de Ciencia animal. La habana. Cuba. 132 p.
- Rodríguez R., K. J. 2005. Eficacia del hongo *Pleurotus ostreatus* como biorremediador de suelos contaminados con metales pesados. Tesis de maestría. Universidad de Puerto Rico recinto universitario de Mayagüez.
- Santillán Sánchez P. 2010. Extractos fibrolíticos fúngicos como modificadores de la fermentación ruminal in vitro. Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillos Texcoco, México 102 pp.
- Sánchez A, Esqueda M, Gaitán-Hernández R, Córdova A y Coronado M L. 2008. Uso potencial de rastrojo de tomate como sustrato para el cultivo de *Pleurotus spp.* Rev Mex Micol.. 28: 17-24.
- SAS. SAS/STAT. 2000. Guide for personal computer. Vers. 8. SAS Institute Cary, NC. USA.
- Steel, R. G. D. y Torrie. 1986. Bioestadística: Principios y procedimientos. 2da Edición. Editorial Mc Graw Hill. México. pp. 622.
- Stokes, M. R. 1992. Effect of an enzyme mixture, an inoculant, and their interaction on silage fermentation and dairy production. J. Dairy Sci. 75: 764-773.
- Tarkow, H., Feist, W. C. 1969. A mechanism for improving the digestibility of lignocellulosic materials with dilute alkali and liquid ammonia. Am. Chemical. Society. Advances. Chem. Ser. (95), 197-218.
- Villegas Castañeda M. 2010. Estudio del cultivo sólido de paja de sorgo en la producción de enzimas fibrolíticas y digestibilidad ruminal *in vitro*. Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillos Texcoco, México.
- Wilson D B and Irwin D C. 1999. Genetics and properties of cellulases. In: Recent progress in bioconversion of lignocellulosics. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.: 2-21
- Wolfenden, B. S. y Wilson, S. R. 1982. Radical cations as reference chromogens in studies of one electron transfer reactions: pulse radiolysis studies of 2,2'-azinobis

(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate). Journal of Chemical Society Perkin Transactions. II: 805-812

Wu Juan, Ya-Zhong Xiao , Han-Qing Yu. 2005. Degradation of lignin in pulp mill wastewaters by white-rot fungi on biofilm. Bioresource Technology. 96 1357-1363

Zhang, y., Himmel, M. y Mielenz, J. 2006. Outlook of cellulase improvement: screening and selection strategies. Biotechnology Advances 24, 452-481.

CAPITULO 3. FERMENTACIÓN RUMINAL Y DESAPARICIÓN DE LA MATERIA SECA “IN VITRO” DEL BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR EN CULTIVO SÓLIDO CON *PLEUROTUS SPP*

3.1. INTRODUCCIÓN

El comportamiento productivo en rumiantes está directamente relacionado con el tipo de alimentación que reciben, por ello con el fin de mejorar las variables productivas (carne y leche) se han desarrollado diversas metodologías para mejorar el valor nutritivo de los residuos agrícolas; entre estos tratamientos están el empleo de enzimas fibrolíticas exógenas que aumentan la digestibilidad de los forrajes (Beauchemin *et al.*, 2003; Colombatto *et al.*, 2003; Moreno *et al.*, 2007); así como el empleo de agentes hidrolíticos alcalinos y ácidos que solubilizan la hemicelulosa, lignina y sílice (Klopfestein *et al.*, 1972; Jackson, 1977; Klopfestein, 1978; Chesson *et al.*, 1983; Sundstol, 1988).

Diversos estudios se han llevado a cabo sobre las limitaciones físicas y químicas de los residuos ligninolíticos que impiden mejorar su digestibilidad (Cowling, 1975; Rowland, 1975; Neely, 1984), entre estos incluyen la valoración de la cantidad y estructura de la lignina, así como el grado de cristalinidad. Este último es considerado un factor importante para llevar a cabo la hidrólisis enzimática por microorganismos ruminales (Fan *et al.*, 1981; Buléon y Bertrand, 1982), esto considerándolo que la parte amorfa de la celulosa se degrada más fácilmente que la parte cristalina (Gould, 1984).

El bagazo de caña de azúcar es un sustrato de difícil degradación ó digestión ruminal lenta, sin embargo su valor económico es bajo y de fácil adquisición, lo que lo hace un ingrediente de uso común en las raciones para rumiantes a pesar de sus desventajas; por ello se han efectuado investigaciones que se han enfocado en elevar su digestibilidad usando herramientas biotecnológicas como el cultivo sólido con hongos fibrolíticos como *Trametes sp EUm1*, *Pleurotus ostreatus IE8* y *Aspergillus niger AD964* que sintetizan enzimas fibrolíticas y mejoran su digestibilidad (Yang *et al.*, 2002; Okano *et al.*, 2006; Márquez *et al.*, 2007).

La técnica de producción de gases es un método *in vitro* de evaluación de raciones que permite conocer información detallada de la cinética de digestión de las diferentes

fracciones del alimento, a través del volumen de gas producido durante el proceso fermentativo, tiene la ventaja de ser menos costoso y obtener los resultados en menor tiempo así como tener un mayor control y precisión de las condiciones experimentales a diferencia de las técnicas *in situ* o *in vivo* (Theodorou *et al.*, 1994).

El objetivo principal de este estudio fue la evaluación del efecto en la composición química del bagazo de caña (BC) de azúcar tratado con métodos químicos y sometido a cultivo sólido con distintas especies de *Pleurotus spp*; así como la evaluación de la fermentación ruminal y desaparición *in vitro* de la MS.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron los tratamientos y días de cultivo sólido que mostraron mejor actividad de enzimas fibrolíticas en el estudio 2. Estos fueron *Pleurotus ostreatus IE8*, *Pleurotus sapidus* y *Pleurotus pulmonarius* a los días de cultivo sólido 0, 3 y 7, denominándose de la siguiente manera:

Cuadro 12. Tratamientos experimentales

Descripción del tratamiento	Tratamiento	Días de CS
BC con Cal 8 % + <i>Pleurotus ostreatus IE8</i>	calie8	0, 3, 7
BC con yeso 8 % + <i>Pleurotus ostreatus IE8</i>	yesoie8	0, 3, 7
BC con agua + <i>Pleurotus ostreatus IE8</i>	aguaie8	0, 3, 7
BC con Cal 8 % + <i>Pleurotus sapidus</i>	Calsap	0, 3, 7
BC con yeso 8 % + <i>Pleurotus sapidus</i>	yesosap	0, 3, 7
BC con agua + <i>Pleurotus sapidus</i>	aguasap	0, 3, 7
BC con Cal 8 % + <i>Pleurotus pulmonarius</i>	calpulmon	0, 3, 7
BC con yeso 8 % + <i>Pleurotus pulmonarius</i>	yesopulmon	0, 3, 7
BC con agua + <i>Pleurotus pulmonarius</i>	aguapulmon	0, 3, 7

BC= Bagazo de caña de azúcar. CS=cultivo sólido

Los estudios de fermentación ruminal y desaparición de la materia seca *in vitro* así como el análisis de las variables químicas nutritivas se llevaron a cabo en la Universidad Autónoma Chapingo Departamento de Zootecnia, laboratorio de Microbiología Pecuaria, y laboratorio de biología molecular de la misma institución.

3.3. CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE GAS *IN VITRO*

Se realizó mediante la técnica de producción de gas descrita por Menke y Steigass (1988), en frascos de vidrio color ámbar de 120 mL de capacidad, se colocaron 0.5 g de muestra (MS) se adicionaron 90 mL de líquido ruminal estandarizado existiendo dentro del frasco un flujo constante de CO₂ (para mantener una anaerobiosis); el flujo de CO₂ se retiró y simultáneamente se colocó un tapón de goma, y un arillo de metal, el cual fue sellado con una pistola engargoladora a presión. El aire del interior de cada frasco se extrajo hasta igualar la presión interior a cero e inmediatamente después se colocaron en baño maría a 39 °C. Se usaron 3 frascos como blanco que contenían solo líquido ruminal.

La presión de gas generada por la fermentación del sustrato se midió con un manómetro con escala de 0–1 kg cm⁻², provisto de una llave trifásica y aguja hipodérmica, igualando a cero la presión interior en cada lectura. Las lecturas se realizaron a 0, 1, 2.5, 4, 6, 9, 12, 16, 20, 24, 28, 34, 40, 48 y 72 h de fermentación.

Las constantes estimadas fueron volumen máximo de gas producido (V_{máx}), tasa de producción de gas (s) y tiempo Lag (L). Los datos de volumen de gas (v) para cada tiempo (t) de mediciones se estimaron utilizando el modelo logístico $VA = V_{máx} / (1 + \exp(2 - 4 * s * (t - L)))$ descrito por (Schofield y Pell 1995). Volumen total de producción de gas (V_{máx}), volumen (v), tasa de producción de gas (s), tiempo (t) y tiempo Lag (L). Se utilizó el paquete estadístico SAS versión 6.0 (1994), para obtener los parámetros de producción de gas (volumen máximo (V_{máx}), tasa de producción de gas (s) y tiempo Lag (L). Para el análisis de desaparición de la materia seca *in vitro* (DIVMS) se utilizaron los tratamientos a las 72 h de fermentación.

Para la obtención del líquido ruminal se extrajo de dos animales fistulados, que fueron adaptados a una dieta a base de pastoreo de leguminosas durante la mañana, por la tarde caña de azúcar integral y un concentrado comercial al 12% PC. El líquido ruminal se licuó durante 10 segundos aproximadamente y se filtró a través de ocho capas de gasa manteniendo siempre un flujo constante de CO₂. Finalmente parte de este filtrado de líquido ruminal se mezcló con nueve partes de solución mineral reducida (Menke y Steingass, 1988).

3.3.1. Determinación de las variables químicas nutritivas

Los cálculos de fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácida (FDA) se llevaron a cabo según la metodología recomendada por Ankon Technology Method®, la materia seca (MS), cenizas, y hemicelulosa según (AOAC, 2007), para lignina ácido detergente (LDA) se estimó según (Sosa, 1979) y nitrógeno total se obtuvo por combustión y se convirtió a valor de proteína total multiplicado por 6.25 (analizador de nitrógeno marca Perkin-Elmer®). Carbohidratos solubles en agua según Dubois *et al.*, (1956).

Desaparición *in vitro* de la materia seca (DIVMS)

Una vez terminado el periodo de incubación de 72 h se filtró el residuo de material de los frascos a través de papel filtro No. 54 con ayuda de una bomba de vacío y se secó a 60 °C durante 24 h. La fórmula para la determinación de esta variable fue:

$$\text{DIVMS} = \frac{\text{MS inicial} - \text{MS final}}{\text{MS inicial}} \times 100$$

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de las variables del análisis químico nutritivo de los tratamientos (FDN, FDA, hemicelulosa, cenizas, lignina, carbohidratos solubles, proteína total) se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial y tres repeticiones por tratamiento, los factores fueron las especies de hongos (3 especies), tipo de pre-tratamiento (3 pre-tratamientos) y tiempo de cultivo sólido (3 tiempos). La comparación de medias por pre-tratamiento se llevó a cabo mediante la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

Para el análisis estadístico de la fermentación ruminal *in vitro* y DIVMS se utilizó un diseño completamente al azar con bloques generalizados. Se realizaron tres repeticiones por tratamiento en cada bloque y cada bloque correspondió a una incubación. Las variables de respuesta de cinética de producción de gas fueron: Volumen máximo de gas ($V_{\text{máx}}$; mL g⁻¹), tasa de producción de gas (S ; h⁻¹) y tiempo de retardo (L ; h) así como DIVMS.

3.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos para el pre-tratamiento del bagazo de caña con cal inoculados con tres especies de *Pleurotus* Cuadro 13. Indican que hubo una disminución de FDN, FDA, lignina, hemicelulosa y CHO's conforme transcurrieron los tiempos de CS. La proteína total mostro pocos cambios significativos entre tratamientos sin embargo existió un aumento significativo ($p < 0.05$) en el día tres de CS. Así mismo se pueden observar aumentos en las cenizas conforme transcurre el tiempo de CS, en los distintos pre-tratamientos, para las cenizas los cambios se presentaron entre los días de CS 3 y 7, en la mayoría de los tratamientos.

Cuadro 13. Análisis químico nutritivo del BC pre-tratado con cal 8 % p/p con diferentes especies de *Pleurotus spp* durante 7 días de CS (% MS)

Tratamiento	FDN	FDA	Hemicelulosa	lignina	cenizas	CHO's	PT
calsap0	70.7 ^c	45.9 ^a	24.8 ^b	11.5 ^a	7.77 ^{ab}	0.213 ^a	3.05 ^c
calsap3	63.21 ^e	42.8 ^b	20.41 ^d	7.89 ^c	8.12 ^a	0.203 ^b	3.21 ^b
sapcal7	60.39 ^g	38.06 ^c	22.33 ^c	6.81 ^d	8.87 ^a	0.103 ^g	2.99 ^c
calie8-0	71.59 ^b	47.37 ^a	24.22 ^b	11.73 ^a	6.87 ^c	0.206 ^a	3.28 ^b
calie8-3	61.9 ^f	41.82 ^b	20.08 ^d	9.76 ^b	6.43 ^c	0.179 ^c	3.34 ^a
calie8-7	59.02 ^g	38.81 ^c	20.21 ^c	6.11 ^d	7.32 ^b	0.113 ^f	3.69 ^a
calpulmon0	72.22 ^a	46.03 ^a	26.19 ^a	12.03 ^a	6.87 ^c	0.186 ^c	3.0 ^c
calpulmon3	66.26 ^d	44.03 ^{ab}	22.23 ^c	10.2 ^b	5.39 ^c	0.159 ^d	3.33 ^a
calpulmon7	59.23 ^g	39.33 ^c	19.9 ^d	8.31 ^c	6.27 ^c	0.129 ^f	2.64 ^d

Medias con diferente literal dentro de columnas son diferentes ($p \leq 0.05$). CHO's= Carbohidratos solubles en agua mg/g MS. PT= Proteína total.

En el Cuadro 14. Se presentan los valores del pre-tratamiento con agua, en los diferentes tiempos de CS; los valores de FDN, FDA, hemicelulosa y lignina mostraron disminuciones significativas ($p < 0.05$) en sus valores conforme transcurrió el tiempo de CS, las cenizas mostraron su mayor valor durante el día 3 en todos los tratamientos. Los CHO's mostraron una disminución significativa ($p < 0.05$) conforme transcurrió los tiempos de CS, salvo para el tratamiento de *P. pulmonarius* en los días 3 y 7. La PT presentó pocos cambios en sus valores iniciales, sin embargo el día 3 mostró los valores más altos, no existiendo diferencias significativas.

Cuadro 14. Análisis químico nutritivo del BC agua y diferentes especies de *Pleurotus spp* durante 7 días de CS (% MS)

Tratamiento	FDN	FDA	Hemicelulosa	lignina	cenizas	CHO's	PT
aguasap0	75.22 ^a	49.23 ^a	25.99 ^a	16.21 ^a	6.87 ^b	0.185 ^a	3.56 ^a
aguasap3	70.2 ^b	45.21 ^c	24.99 ^a	14.11 ^b	7.45 ^a	0.111 ^e	3.95 ^a
aguasap7	65.08 ^c	41.26 ^d	23.82 ^{ab}	10.2 ^d	6.76 ^b	0.102 ^f	2.84 ^b
aguaie8-0	74.91 ^a	50.23 ^a	24.68 ^a	15.17 ^{ab}	5.11 ^c	0.160 ^b	3.73 ^a
aguaie8-3	70.1 ^b	46.53 ^b	23.57 ^{ab}	14.03 ^b	5.86 ^c	0.133 ^d	3.51 ^{ab}
aguaie8-7	65.83 ^c	47.2 ^b	18.63 ^c	12.8 ^c	5.36 ^c	0.102 ^f	3.42 ^{ab}
aguapulm0	73.92 ^a	49.14 ^a	24.78 ^a	16.46 ^a	5.23 ^c	0.140 ^c	3.07 ^b
aguapulm3	69.4 ^b	45.82 ^c	23.58 ^{ab}	14.6 ^b	7.87 ^a	0.113 ^e	3.32 ^{ab}
aguapulm7	68.71 ^b	46.0 ^b	22.71 ^b	11.6 ^{cd}	7.45 ^a	0.120 ^e	3.19 ^b

Medias con diferente literal dentro de columnas son diferentes ($p \leq 0.05$). CHO's= Carbohidratos solubles en agua. PT= Proteína total.

Se presentan en el Cuadro 15. los resultados para el pre-tratamiento con yeso, mostrando una disminución de la FDN, FDA, hemicelulosa, lignina y CHO's significativos ($p < 0.05$) conforme transcurre el tiempo de CS, para las cenizas está disminución no es tan notorio, la PT no mostró cambios significativos. Durante el día 7 de CS se observó el mayor efecto en los componentes químicos del BC en todos los tratamientos, lo que revela que existe un efecto benéfico del empleo de técnicas de CS con hongos basidiomicetos sobre este residuo.

Cuadro 15. Análisis químico nutritivo del BC con yeso al 8 % p/p con diferentes especies de *Pleurotus spp* durante 7 días de CS (% MS)

Tratamiento	FDN	FDA	Hemicelulosa	lignina	cenizas	CHO's	PT
yesosap0	72.86 ^a	46.18 ^a	26.68 ^a	13.6 ^a	7.48 ^b	0.187 ^a	3.14 ^a
yesosap3	67.41 ^b	42.34 ^b	25.07 ^a	9.53 ^c	8.65 ^a	0.104 ^b	3.35 ^a
yesosap7	63.81 ^c	43.01 ^b	20.8 ^b	7.42 ^d	5.98 ^c	0.097 ^c	3.7 ^a
yesoie8-0	71.6 ^a	46.88 ^a	24.72 ^{ab}	12.65 ^{ab}	7.43 ^b	0.113 ^b	3.62 ^a
yesoie8-3	68.41 ^b	46.38 ^a	22.03 ^b	10.00 ^{bc}	7.01 ^b	0.127 ^b	2.68 ^b
yesoie8-7	62.38 ^c	42.0 ^b	20.38 ^b	7.54 ^d	8.32 ^a	0.091 ^c	2.65 ^b
yesopulm0	71.11 ^a	46.02 ^a	25.09 ^a	13.9 ^a	7.38 ^b	0.107 ^b	3.03 ^a
yesopulm3	65.98 ^b	44.92 ^b	21.06 ^b	11.8 ^b	8.23 ^a	0.101 ^b	2.32 ^b
yesopulm7	62.82 ^d	41.4 ^c	20.42 ^b	9.45 ^c	8.96 ^a	0.091 ^c	3.02 ^{ab}

Medias con diferente literal dentro de columnas son diferentes ($p \leq 0.05$). CHO's= Carbohidratos solubles en agua. PT= Proteína total.

Las diferencias entre pre-tratamientos cal, yeso y agua fue significativo ($p < 0.05$), mencionando por ejemplo las mayores reducciones en FDN, FDA, hemicelulosa y lignina se presentaron en los pre-tratamientos con yeso y cal, mostrando menores reducciones el pre-tratamiento con agua. El tiempo de cultivo sólido con mayor reducción en componentes ligninocelulósicos fue el día 7. No existieron diferencias notables en cuanto a pre-tratamientos pero si entre días de CS; estos cambios en la proteína total con respecto de su valor inicial se puede deber al aporte del hongo al desarrollarse sobre el sustrato ligninolíticos Akinfemi *et al.*, (2008), este aumento de proteína se ha reportado de un 5 a 10 % al desarrollar sobre paja de trigo *Pleurotus ostreatus* (Shojaosadati *et al.* 1999).

En el presente trabajo los resultados más representativos fueron durante el día 7 de CS con el tratamiento con cal y con agua, observando una disminución en los valores de FDN de 7 %, de FDA del 4 %, hemicelulosa de 8.34 % y para lignina de 38 %. Para los tratamientos con cal la disminución para FDN fue de 15%, FDA de 14 %, hemicelulosa 41 % y lignina de 40.78 %. Estos valores son similares a los reportados por Schmidt *et al.* (2003) al inocular de heno de *Brachiaria* con *Pleurotus ostreatus*, que reporto una degradación de 15 % para FDN y de 33 % para la hemicelulosa, siendo mejores estos valores a los observados en el presente trabajo, sin embargo cabe recordar que se uso bagazo de caña de azúcar material con mayores componentes ligninolíticos.

Por otra parte, Villegas, (2010) al llevar a cabo un CS de 20 días con *Pleurotus sapidus* en paja de sorgo con 2% de cal reporto una disminución de 11.64 % de FDN, aumentos de 6 unidades en FDA, una disminución del 65 % de hemicelulosa y una disminución de 29.2 % de lignina; superando solamente en el valor de hemicelulosa a lo reportado en este trabajo además de considerar que en el presente trabajo el CS de de 7 días. Del mismo modo Membrillo 2008 al realizar un CS durante 15 días con *Pleurotus ostreatus IE8* sobre bagazo de caña a un tamaño de partícula de 2.9 mm encontró una reducción de 35.9 de lignina, 43.5 %de hemicelulosa, siendo cercanos a los reportados en este trabajo 40.48 y 41 % respectivamente para los tratamiento con cal al día 7, reduciéndose en más de la mitad el tiempo de CS. Okano *et al* 2006 llevo a cabo un CS durante 35 días con bagazo de caña y paja de arroz con 0.5 % de cal y el hongo

Pleurotus eringii reportando una disminución de FDN de 16.4 para hemicelulosa 46 y para lignina de 6 % obteniendo mayores reducciones en el presente trabajo durante 3 días de CS, salvo para la FDN (1.4 unidades menor).

Fazaeli, *et al.* (2003) evaluó distintas especies de *Pleurotus spp.* llevando a cabo un CS de 21 días con paja de trigo, encontrando disminución en los valores de FDN, FDA y hemicelulosa. Mismo comportamiento también reportó Jafari *et al.* (2007) al evaluar distintas especies de *Pleurotus spp.* mediante CS durante 60 días con paja de arroz; concordando estos reportes con las disminuciones en los valores de la pared celular observado en el presente trabajo.

Para el análisis de la producción de gas *in vitro*, se puede observar en el Cuadro 16. que los mayores valores de volumen máximo de producción de gas ($V_{m\acute{a}x}$) se presentó en los tratamientos del día 0 de CS, debido a su mayor contenido de azúcares solubles que el resto de los tratamientos. Los valores de S no mostraron diferencias significativas entre los pre-tratamientos y días de CS, sin embargo para los valores de la fase Lag, estos fueron menores durante los días 7 de CS. Por otra parte los mayores valores en $V_{m\acute{a}x}$ los presentó el pre-tratamiento con cal existiendo diferencias significativas entre tratamientos.

Los mejores valores de desaparición de la MS se presentaron durante el día 3, con el tratamiento con cal, de estos el mejor valor para la DIVMS fue con el hongo *Pleurotus sapidus* con 61.41, seguido por *Pleurotus pulmonarius* y al final *Pleurotus ostreatus IE8* (61.41, 58.30 y 58.63 5 MS) respectivamente.

Cuadro 16. Análisis de la fermentación de la MS y DIVMS, mediante la prueba de producción de gas *in vitro*

Tratamiento	$V_{m\acute{a}x}$ (mL g MS ⁻¹)	S (h ⁻¹)	L (h)	DIVMS (% MS)
YESO				
yesosap0	212.66 ^a	0.03	7.67 ^b	54.83 ^c
yesosap3	191.96 ^b	0.03	6.66 ^c	59.32 ^{ab}
yesosap7	157.26 ^{de}	0.03	7.55 ^b	60.42^a
yesoie8-0	173.60 ^c	0.03	5.78 ^d	52.55 ^d
yesoie8-3	131.03 ^e	0.02	4.11 ^d	59.74 ^a

Tratamiento	V _{máx} (mL g MS ⁻¹)	S (h ⁻¹)	L (h)	DIVMS (% MS)
yesoie8-7	131.03 e	0.03	10.23 ^a	60.35 ^a
yesopulm0	194.40 ^b	0.03	4.61 ^d	54.14 ^c
yesopulm3	162.30 ^d	0.03	6.43 ^c	58.11 ^b
yesopulm7	130.13 ^f	0.03	6.18 ^c	60.39 ^a
AGUA				
aguasap0	208.50 ^a	0.03	7.54 ^a	51.32 ^d
aguasap3	193.93 ^b	0.03	6.80 ^b	57.32 ^b
aguasap7	137.16 ^e	0.03	4.52 ^c	63.11 ^a
aguaie8-0	179.00 ^c	0.03	6.97 ^b	50.33 ^d
aguaie8-3	132.33 ^{ef}	0.03	6.15 ^b	55.43 ^c
aguaie8-7	122.86 ^f	0.02	6.35 ^b	61.48^a
aguapulm0	174.03 ^{cd}	0.03	6.26 ^b	53.36 ^{cd}
aguapulm3	171.36 ^d	0.03	5.08 ^c	57.98 ^b
aguapulm7	81.79 ^g	0.03	8.59 ^a	59.85 ^b
CAL				
calsap0	247.46 ^a	0.03	6.67 ^a	58.53 ^c
calsap3	245.56 ^{ab}	0.04	6.36 ^a	61.34 ^b
calsap7	196.26 ^c	0.03	6.19 ^a	66.32^a
calie8-0	225.20 ^b	0.03	5.56 ^{bc}	56.88 ^d
calie8-3	201.00 ^c	0.03	6.78 ^a	61.65 ^b
calie8-7	131.73 ^d	0.02	5.81 ^{ab}	65.95 ^a
calpulmon0	251.66 ^a	0.03	4.44 ^c	58.24 ^c
calpulmon3	214.10 ^{bc}	0.03	5.79 ^b	62.06 ^b
calpulmon7	140.76 ^d	0.02	6.33 ^a	64.54 ^{ab}

Medias con diferente literal dentro de columnas y por tratamiento (yeso, agua y cal), son diferentes ($p \leq 0.05$). Volumen máximo de gas (V_{máx} ; mL g⁻¹), tasa de producción de gas (S ; h⁻¹) y tiempo de retardo (L ; h) así como DIVMS.

Respecto a la fermentación ruminal *in vitro*, la tasa fraccional de gas, (mediciones realizadas indirectamente en cada lapso de tiempo del monitoreo), se observó que el mayor valor fue para los tratamientos en el día cero con el pre-tratamiento con cal al 8%; disminuyendo estos valores conforme transcurrió el tiempo de CS, debido a que estos pre-tratamientos contenían una mayor cantidad de azúcares solubles y que son fermentadas por los microorganismos ruminales.

Así mismo en la Figura 2. se puede observar que durante las primeras horas fermentación *in vitro* (1 – 4 h) aumentos en la producción de gas, debido principalmente al consumo de azúcares solubles por parte de los microorganismos ruminales

Mthiyane, *et al.* (2001), el segundo pico de producción de gas se presentó durante las 10 y 18 h, para este tiempo las bacterias ruminales degradan componentes de la pared celular del BC.

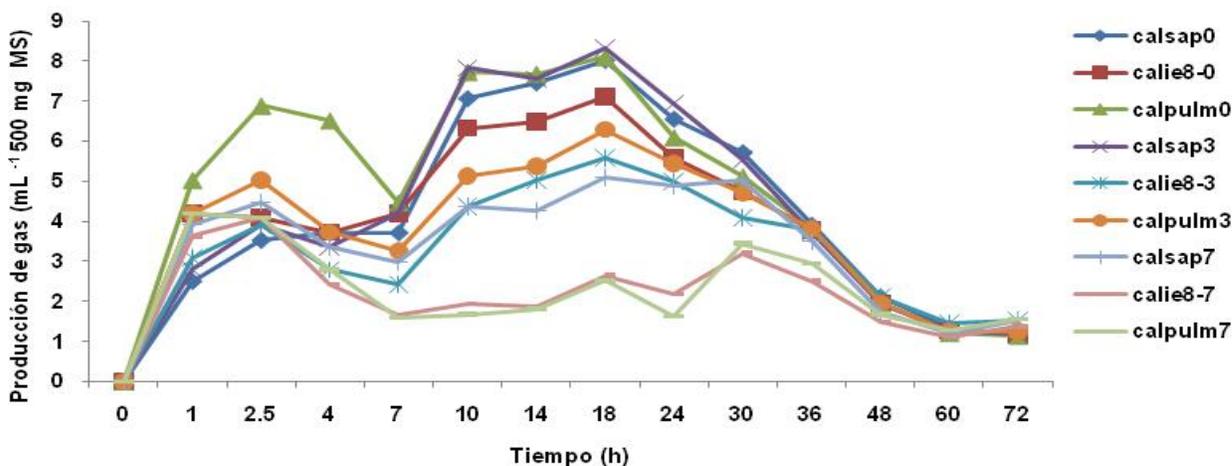


Figura 2. Tasa fraccional de producción de gas *in vitro* del pre-tratamiento cal y *Pleurotus spp.*

La DIVMS mostró mayores valores conforme transcurrió el tiempo de CS para todos los tratamientos, resaltando el pre-tratamiento con cal en el día 7, no existiendo diferencias significativas entre especies de hongo. Al comparar el efecto del uso de pre-tratamientos químicos en la DIVMS, se observó una diferencia de 7.2 unidades entre el pre-tratamiento agua día cero y pre-tratamiento cal día cero y de 3.5 unidades porcentuales con el pre-tratamiento día 0 yeso. Así mismo existió una diferencia de 16 unidades porcentuales entre el día 0 con agua y día 7 con cal y *Pleurotus sapidus* existiendo un efecto benéfico de la incorporación de este hongo en el BC pre-tratado con cal. El mejor valor de la fase de retardo *in vitro* se presentó con el pre-tratamiento cal durante el día 7 y *Pleurotus ostreatus IE8* sugiriendo que estos tratamientos pueden hacer más rápido el paso del BC en el rumen.

Los tratamientos químicos se han probado con el fin de mejorar la composición nutricional de los residuos agrícolas al modificar la pared celular, esto permite un mejor

aprovechamiento por parte de los hongos del sustrato (Nguyen *et al.* 2001). En el presente estudio el efecto del pre-tratamiento con cal en la composición química nutritiva del BC se puede observar al comparar el pre-tratamiento agua con cal o yeso, mostrando el mayor efecto con el pre-tratamiento con cal; lo anterior aunado al efecto del desarrollo de *Pleurotus spp* sobre el sustrato que provoco un efecto sinérgico entre tratamientos químicos y tratamientos biológicos efectuados en este estudio. Estos resultados coinciden con los con los reportados por Wu *et al.* (2005) donde reporta que la mayor eficiencia para la degradación de lignina por parte de *Pleurotus ostreatus* fue del 78 % a pH 9.0 y de 65 % a un pH de 8.0 en tratamientos alcalinos.

3.5. CONCLUSIONES

- Existió una reducción en los valores de FDN, FDA, hemicelulosa, lignina y carbohidratos solubles conforme transcurrió el tiempo de cultivo sólido.
- *Pleurotus sapidus* y *Pleurotus ostreatus* IE8 fueron las mejores especies que mostraron mejor DIVMS .
- Existió una reducción significativa en la FDN, FDA , lignina y DIVMS al emplear la cal como pre-tratamiento.
- El tiempo de CS que redujo mayores componentes de la pared celular del bagazo fue el día 7.
- La mayor producción de gas *in vitro* se da de las 10 a 14 h.
- Se presento un aumento en la fase Lag *in vitro* del bagazo de caña mediante en el pre-tratamiento con cal.

LITERATURA CITADA

- Akinfemi, A, Ogunwole, O. A., Ladipo, M. K., Adu, O. A., Osineye, O. M., Apata E. S. 2008. Enhancement of the nutritive value of maize leaf treated with white-rot fungi: *Pleurotus sajor caju* and *Pleurotus pulmonarius*, and the effects on chemical composition and in vitro digestibility. *Production Agriculture and Technology*. 4 (1). 106-114.
- AOAC. Official methods of analysis. 18 th Ed. 2007.
- Beauchemin K A, Colombatto D, Morgavi D P and Yang W Z. Use de exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. *J Anim Sci*. 2003. 81:E37-E47.
- Colombatto D, Mould F L, Bhat M K and Owen E. Use de fibrolytic enzymes to improve the nutritive value of ruminant diets. A biochemical and in vitro rumen degradation assessment. *Anim Feed Sci Technol*. 2003. 107:201-209.
- Cowling, E.B., Kirk, T.K., 1976. Properties of cellulose and lignocellulosic materials as substrates for enzymatic conversion process. *Biotechnol. Bioeng. Symp*. 6, 95–123.
- Chesson, A. A., Gordon, A. H. y Lomax, J. A. 1983. Substituent groups linked by alkali-labile bonds to arabinose and xilose residues of legume, grass, and cereal straw cell walls and their fate during digestion by rumen microorganism. *J. Sci. Food Agric*. 34: 1330-1340.
- Dubois MK, Gilles A. Hamilton JK, Rebers PA and Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem*. 28:350.
- Fan, L, T., Lee, Y.H., Beardmore, D.H. 1980. Mechanism of the enzymic hydrolysis of cellulose; effects of major structural features of cellulose on enzymic hydrolysis. *Biochnol. Bioeng*. (22), 177-199.
- Fazaeli H, Azizi A, Jelani ZA, Mirhadi S. A. (2003). Effect of fungal treatment on the chemical composition, in vitro digestibility and in sacco degradability of wheat straw. *Proc. Br. Soc. Anim. Sci*. 166-171.
- Gould, J.M., 1984. Alkaline peroxide delignification of agricultural residues to enhance enzymatic saccharification. *Biotechnol. Bioeng*. 26, 46–52.

- Jafari MA, Nikkhah A, Sadeghi AA, Chamani M. 2007. The effect of *Pleurotus spp.* fungi on chemical composition and in vitro digestibility of rice Straw. Pak J Biol Sci. 1;10(15):2460-4.
- Klopfestein, T. G., Krause, V., Jonnes, M. G. y Woods, W. 1972. Chemical treatment of low quality roughages. J. Anim. Sci. 35: 4 18-422.
- Márquez A. A. T., G. Mendoza M., González M. S. S., Buntinix D., S. E., Corral L., O. 2007. Actividad fibrolítica de enzimas producidas por *Trametes sp EUm1*, *Pleurotus ostreatus IE8* y *Aspergillus niger AD96.4* en fermentación sólida. Interciencia. (32) 11. pp 780-785.
- Menke K H and Steingas H. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from Chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. Anim Res Develop.. 28: 7-55.
- Menke K H, Raab L, Salewski A, Stengass H, Fritz D and Scheneider W. 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. J Agric Sci (camb).. 92: 217-222.
- Mthiyane, D.M.N., I.V. Nsahlai*, M.L.K. Bonsi. 2001. The nutritional composition, fermentation characteristics, in sacco degradation and fungal pathongen Dynamics of sugarcane tops ensiled with broiler litter with or without water. Animal Feed Science and Technology 94 171-185.
- Moreno R, Pinos-Rodríguez J M., González S, Álvarez G., García J C., Mendoza G. 2007. Efecto de enzimas fibrolíticas exógenas en la degradación ruminal *in vitro* de dietas para vacas lecheras. Interciencia. (12) 850-853.
- Nguyen, X. T., Thang, C. M. Van Thanh, N. 2001. Effects treatment and supplementation of rice straw on growth of young bulls. Jurnal of Agriculture and Rural Development. No 9. pp 135-140.
- Okano K, Fukui S, Kitao R and Usagawa T. 2006. Effects of culture length of *Pleurotus eryngii* grown on sugarcane bagasse on in vitro digestibility and chemical composition. Anim Feed Sci Technol..
- Santillán Sanchez P. 2010. Extractos fibrolíticos fúngicos como modificadores de la and fermentación ruminal in vitro. Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillos Texcoco, México. 92 p.

- SAS. SAS/STAT Guide for personal computer. Vers. 8. SAS Institute Cary, NC. USA. 2000.
- Schofiel P, and Pell A N. 1995. Measurement and kinetic analysis of the neutral detergent-soluble carbohydrate fraction of legumes y grasses. J. Anim Sci.. 73: 3455-3463.
- Shojaosadati, S. A., Faraidouni, R., Madadi-Nouei, A, Mohamadpour, I. 1999. Resources conservation and Recycling. 27, 73.
- Sosa de Pro E. 1979. Manual de procedimientos analíticos para alimentos de consumo animal, Chapingo, México..96-99.
- Sundstol, F. y Coxworth, E. M. 1988. Ammonia treatment. En: F. Sundstol and E. Owen (Edit). Straw and other fibrous by-products as feed. Elsevier Science Publisher, Amsterdam. The Netherlands. pp. 196-247.
- Theodorou, M. K. Williams B.A. Dhanoa M.S. Mc Allan A. B. and France, J. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. Animal Feed Science and Technology. 48: 185-197.
- Villegas Castañeda M. 2010. Estudio del cultivo sólido de paja de sorgo en la producción de enzimas fibrolíticas y digestibilidad ruminal *in vitro*. Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillos Texcoco, México.
- Wu Juan, Ya-Zhong Xiao , Han-Qing Yu. 2005. Degradation of lignin in pulp mill wastewaters by white-rot fungi on biofilm. Bioresource Technology. 96 1357-1363.
- Yang W Z, Beauchemin K A and Vedres D D. 2002. Effects of pH and fibrolytic enzymes on digestibility, bacterial protein synthesis, and fermentation in continuous culture. Anim Feed Sci Technol.. 102:137-150.

CAPITULO 4. ISOFORMAS DE LA ENZIMA LACASA DE *PLEUROTUS SPP* SOBRE BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR PRE-TRATADO CON QUÍMICOS

4.1. INTRODUCCIÓN

La biodegradación de la lignina por los hongos de la podredumbre blanca es un proceso de tipo oxidativo. La enzima lacasa (EC 1.10.3.2) llamada también oxidasas multicobre azul que pueden catalizar la oxidación de un electrón de compuestos fenólicos (Guillen *et al* 1992). Son glucoproteínas extracelulares (p-difenol oxígeno reductasa) que contienen 4 átomos de cobre y un peso molecular en el rango de 60 a 80 KDa (Gianfreda *et al* 1999). La enzima contiene átomos de cobre en su centro catalítico (multicobre oxidasa), otros miembros de este grupo se encuentran en los mamíferos, en ellos es una proteína que se encuentra en el plasma (ceruplamina) y en las plantas es la ascorbato oxidasa; la lacasa tiene 3 tipos de cobre, uno de los cuales le brinda su tipo color azul (Baldrian, 2006).

Generalmente las lacasas son más estables en pH alcalino que en pH ácido, lo cual se debe probablemente a la inhibición del grupo hidroxilo sobre el proceso de auto-oxidación, también se pueden inactivar por la pérdida de los átomos de cobre por condiciones de proteólisis o desnaturalización.

Se han investigado las cinéticas de fermentación en cultivo sólido (CS) con *Pleurotus ostreatus* básicamente para la caracterización de procesos de deslignificación, producción de fertilizantes orgánicos y mejoramiento de alimentos para rumiantes al incrementar la hidrólisis de los polisacáridos estructurales de los forrajes. Estudios realizados por Hador *et al.* (1992) sobre diferentes sustratos, entre estos la paja de trigo con el hongo *Pleurotus ostreatus* reportaron un aumento en la digestibilidad del sustrato y contenido de proteína.

Muñoz *et al.* (1997), caracterizaron isoenzimas I y II de lacasas a partir de *Pleurotus eringii* y reportaron que estas eran glicoproteínas monoméricas con 1 y 7 % de carbohidratos y peso molecular de 61 y 65 kDa. La tasa de oxidación más alta del ABTS (Ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) con lacasa I se obtuvo a 65 °C y pH 4. En el caso de la lacasa II ocurrió a 55 °C y pH 3. En este mismo estudio se

reportó que las dos isoenzimas fueron estables a pH alto (8-12), manteniendo una actividad del 60 a 70% después de 24 horas.

Se han reportado hasta 8 diferentes tipos de isoformas para lacasas, su peso va desde 50 a los 80 kDa, la isoforma predominante es la POXC con un peso de 59 kDa, dependen del tipo de isoforma estudiada, estos van desde 60 hasta 80 kDa, para la POXA3b se han reportado 2 sub unidades de está isoforma con un peso aproximado de 16 a 18 kDa Heinzkill *et al.* (1998); Pozdnyakova *et al.* (2006), Giardiana *et al.* (2007); Morozova *et al.* (2007); así mismo, Tlecuítl *et al.* (2008), reportó una isoforma de 43.7 kDa con *Pleurotus ostreatus*. Lo anterior nos indica la variedad en los pesos y características para su síntesis de isoformas de lacasas de *Pleurotus spp.*

Cuadro 17. Peso molecular (kDa) punto Isoeléctrico (pI) y pH de lacasas de *Pleurotus spp*

Especie	Peso molecular KDa	pI	pH óptimo en agua
<i>Pleurotus eryngii li</i>	65	4.1	S/D
<i>Pleurotus eryngii ll</i>	61	4.2	S/D
<i>Pleurotus ostreatus</i>	67	3.6	5.8
<i>Pleurotus ostreatus POXA 1b</i>	62	6.9	6.0
<i>Pleurotus ostreatus POXA 1w</i>	61	6.7	6.0
<i>Pleurotus ostreatus POXA 2</i>	67	4.0	6.0
<i>Pleurotus ostreatus POXC</i>	59	2.9	6.0

Fuente: Baldrian. (2006).

4.1.1. Sistema de electroforesis desnaturizante

El gel de poliacrilamida (PAGE) es presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS) es un método rápido para cuantificar, comparar y caracterizar proteínas. Este método separa las proteínas basándose principalmente en el peso molecular. El SDS desnaturiza la proteína, uniéndose a lo largo de la cadena del polipéptido confiriéndole carga negativa. Las ventajas que tiene este sistema es que separa rápidamente las proteínas y se puede estimar su peso molecular, aunque las proteínas separadas están desnaturizadas y no son funcionales (Bryan y Wilson, 1976).

4.1.2. Sistema de electroforesis no desnaturalizante

Al gel de electroforesis no desnaturalizante también se le llama gel de electroforesis nativo, separa las proteínas por su tamaño y carga eléctrica. El poro formado por la acrilamida sirve como criba para separar las moléculas de diferente tamaño. Este método es capaz de separar moléculas, las cuales difieren por una unidad en su carga.

Separar las proteínas en estas condiciones permite separarlas en estado nativo por lo que siguen siendo funcionales y permiten separar complejos proteicos. Algunos inconvenientes son que muchas proteínas no migran por no tener carga neta o poseer carga neta positiva, el proceso de separación es muy lento debido a la debilidad de la carga neta de las proteínas y el proceso de separación no solo está afectado por el tamaño sino también por la forma de la proteína (Bryan y Wilson, 1976). Una vez realizada la electroforesis el gel se puede teñir con azul brillante comassie o con plata, pero si el interés es separar proteínas o localizar proteínas específicas se colocan estos geles en el sustrato específico de la enzima de interés y se pueden visualizar; a los geles así marcados se les llama zimogramas.

La capacidad de las enzimas para cambiar de forma y ejercer fuerzas sobre los sustratos ilustra una importante característica de estas moléculas: No son rígidas e inflexibles, más bien muestran una capacidad considerable de movimiento interno.

Una reacción puede ser catalizada por diferentes formas de una enzima, a estas diferentes formas se les denomina isoenzimas o isoformas, pueden presentarse en la misma especie en el mismo tejido o incluso en la misma célula. Las diferentes formas de la enzima difieren generalmente en sus propiedades cinéticas o reguladoras, en la forma del cofactor que utilizan o en su distribución subcelular, normalmente las isoenzimas tienen secuencias de aminoácidos similares pero no idénticas y en muchos casos comparten claramente el origen evolutivo (Karp y Vander Geer. 2005).

La mayoría de las especies de hongos estudiados sintetizan más de una isoforma de lacasas dependiendo de las condiciones de crecimiento que se utilicen, ya que estas enzimas son constitutivas o inducibles; existen pocos trabajos en los cuales se comparen el perfil de isoformas de lacasas de *Pleurotus spp* sobre bagazo de caña de azúcar pre-tratado con álcalis en CS.

El objetivo de este estudio fue identificar el número de isoformas producidas por *Pleurotus sapidus* y *Pleurotus ostreatus IE8* en cultivo sólido con bagazo de caña de azúcar pre-tratado con álcalis, así como determinar el número de isoformas con actividad de lacasas en los extractos enzimáticos con diferentes sustratos y tiempo de cultivo sólido a través de zimografía.

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1. Material biológico

- *Pleurotus sapidus*. Micelio obtenido del laboratorio comercial Prodicet (México).
- *Pleurotus ostreatus IE8*. Cepa proporcionada por el laboratorio de biotecnología perteneciente a la Universidad Autónoma Metropolitana campus Iztapalapa.
- Se utilizó una enzima lacasa (Novo ®) de tipo comercial como referencia al observar los minigeles.
- Marcador molecular PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, laboratorio Fermentas Molecular Biology, pudiendo observar de 10 a 250 pb.

4.3. MATERIAL VEGETATIVO

Bagazo de caña de azúcar: Obtenido en el Ingenio azucarero Emiliano Zapata, ubicado en Zacatepec Edo. de Morelos en México, empleado para el CS y obtención de extractos enzimáticos.

4.4. TRATAMIENTOS

Los tratamientos fueron aquellos que se presentaron mejor actividad enzimática y DIVMS en bagazo de caña de azúcar (BC) pre-tratados con químicos, de los estudios anteriores. Estos fueron:

Cuadro 18. Tratamientos experimentales

Descripción del tratamiento	Tratamiento	Días de CS
Lacasa comercial novo	Lacasa comercial	0, 3, 7
BC con cal 8 % + <i>Pleurotus ostreatus</i> IE8	calie8	0, 3, 7
BC con yeso 8 % + <i>Pleurotus ostreatus</i> IE8	yesoie8	0, 3, 7
BC con agua + <i>Pleurotus ostreatus</i> IE8	aguaie8	0, 3, 7
BC con cal 8 % + <i>Pleurotus sapidus</i>	calsap	0, 3, 7
BC con yeso 8 % + <i>Pleurotus sapidus</i>	yesosap	0, 3, 7
BC con agua + <i>Pleurotus sapidus</i>	aguasap	0, 3, 7

El pre-tratamiento, pasteurización, cultivo sólido, incubación, análisis de proteína soluble, actividad enzimática se realizaron del mismo modo como se describe en el capítulo 2.

Antes de elaborar los geles, se cuantificó la actividad de lacasas y la proteína soluble de todos los tratamientos, para validar la actividad presentada en el capítulo II, así como para evitar una mayor intensidad en la coloración de los geles, debido a las diferencias en la actividad de lacasas y proteína soluble entre tratamientos, igualándose los valores de proteína soluble de los tratamientos con mayor valor con los de menor valor.

4.4.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS-PAGE

La actividad de lacasas se detectó *in situ*, usando zimogramas usando el método modificado de Laemmli (SDS-PAGE) (Tellez *et al* 2005). Los minigeles se realizaron en 2 fases, con 12 y 6% de acrilamida, los cuales se montaron en una cámara de electroforesis mini-protean Bio-Rad; a cada pozo se le adiciono 24 µL de muestra. Todas las muestras fueron equilibradas en sus valores de proteína; las bandas de proteína se observaron mediante el uso de ABTS como sustrato y para observar las proteínas y marcador molecular se utilizó azul de comassie.

Cuadro 19. Elaboración de los geles para electroforesis SDS-PAGE

Gel de separación 12%		Gel de apilamiento 6%	
Agua desionizada	3.35 mL	Agua desionizada	3.05 mL
Tris pH 8.8	2.5 mL	Tris pH 6.8	1.25 mL
Acrilamida (30%)	4 mL	Acrilamida (30%)	0.65 mL
SDS 10%	120 µL	SDS 10%	50 µL
Persulfato de amonio (APS)	55 µL	Persulfato de amonio (APS)	25 µL
Temed	5 µL	Temed	5 µL

El APS y el TEMED se agregan al final de la preparación de cada gel.

Antes de mezclar las soluciones para elaborar los geles, ensamblar el dispositivo de moldeado del gel, primero se adiciona el gel de separación hasta 1.5 cm antes de la terminación de los peines; antes de llenar el molde. El tiempo de solidificación de los geles es de aproximadamente 40 minutos, aproximadamente.

4.4.2. Condiciones de corrida

Los geles de 0.75 mm de grosor se corrieron a un voltaje constante de 180 volts, en un amortiguador Tris-glicina pH 8.3, la cámara de electroforesis se colocó sobre hielo en un recipiente de plástico durante aproximadamente 1 h 40 min.

El gel se colocó en un recipiente de vidrio, en donde se le realizó 3 lavados con agua desionizada; posteriormente se adicionaron 15 mL de una solución de ABTS 0.5 mM, en amortiguador de acetatos 0.1M, pH 5 a temperatura ambiente. Pasados de 10 a 15 minutos se observaron bandas de color verde (ABTS oxidado, por la enzima lacasa) metodología según (Téllez *et al.* 2005) y se tomaron fotografías de los geles; a continuación se revelaron con azul de comassie para observar el marcador molecular.

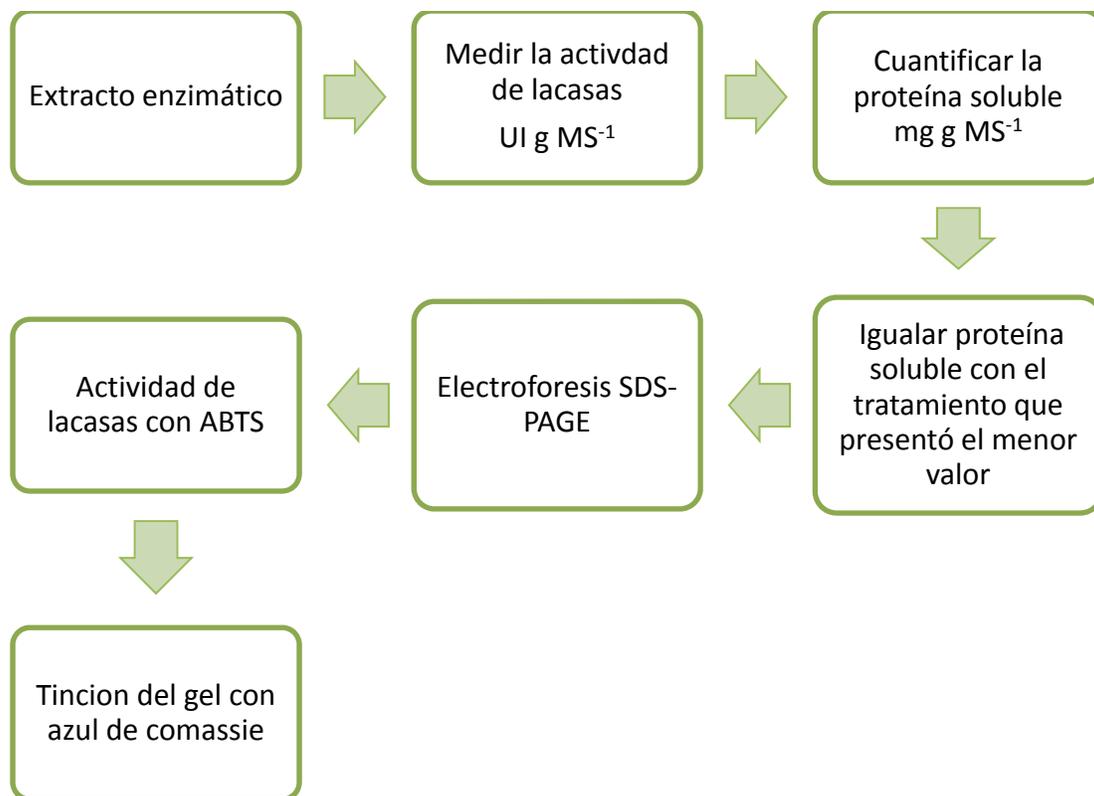
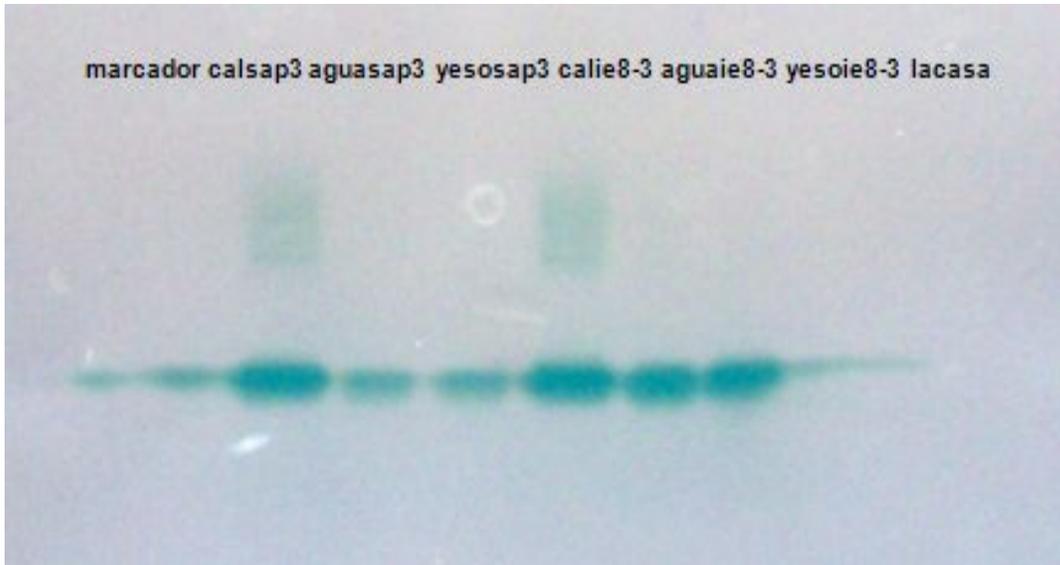


Figura 3. Proceso para la realización de los zimogramas

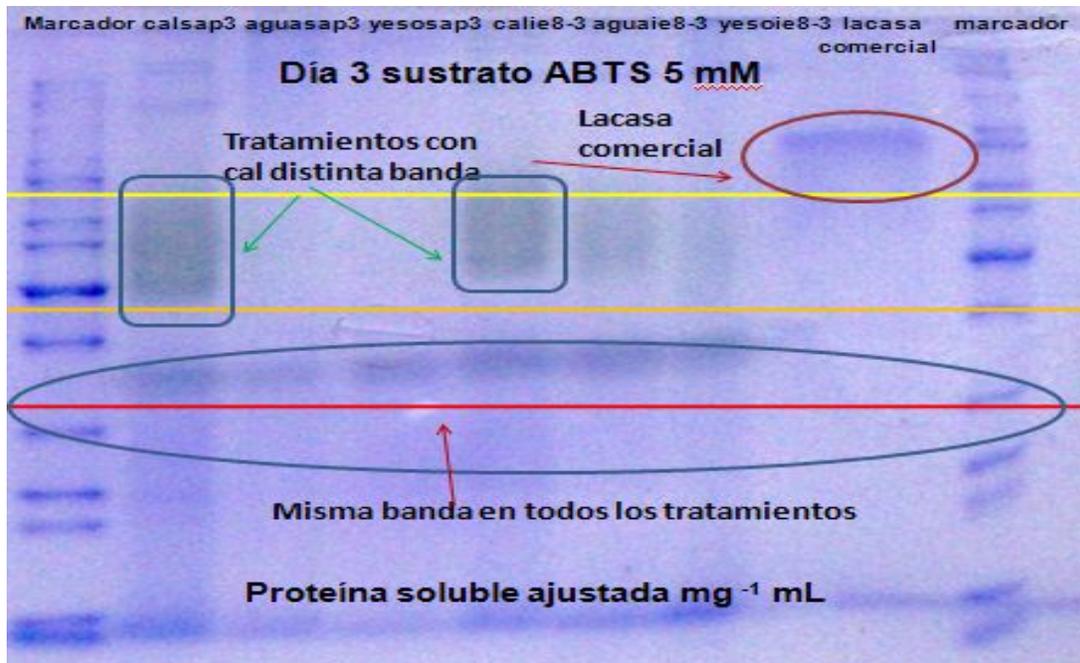
4.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los zimogramas que se efectuaron con los tratamientos del día cero de CS, no se observó ninguna actividad lacasa, solo se observó el marcador molecular y la lacasa comercial. En los tratamientos del día tres al utilizar ABTS como sustrato se observó actividad de lacasas en todos los tratamientos, resaltando los tratamientos con cal de *Pleurotus sapidus* (calsap3) y *Pleurotus ostreatus* IE8 (calie8-3) donde se observa una segunda isoforma de lacasas, Fotografía 1.



Fotografía 1. Zimograma de la enzima lacasa de *Pleurotus spp* durante el día 3 de CS usando ABTS como sustrato

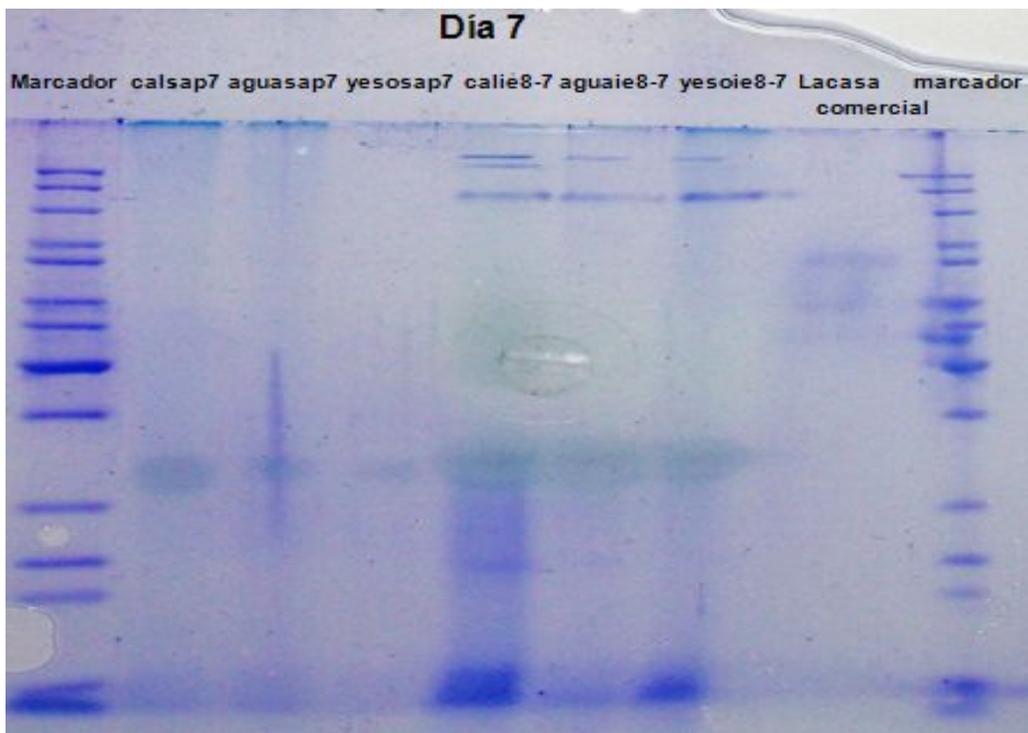
Después de realizar la tinción con comassie al gel del día 3 de CS, se observó la enzima lacasa comercial y el marcador molecular, así como la actividad de lacasas antes mencionada Fotografía 2.



Fotografía 2. Zimograma de la enzima lacasa de *Pleurotus spp* durante el día 3 de CS revelado con tinción de comassie

Para los tratamientos con agua y yeso del día 3 de CS, no se observaron la misma banda de actividad de lacasas, lo cual sugiere que el pre-tratamiento con cal estimuló la síntesis de diferentes isoformas; sin embargo no existen reportes que indiquen que el calcio (cal y yeso) estimule la producción de lacasas (Baldrian, 2003). Los patrones zimográficos de lacasas de los tratamientos durante el día 7 de CS, presentaron la misma movilidad sobre el gel, a los observados en el día 3 de CS pero sin las isoformas observadas en los tratamientos con cal Fotografía 1.

Estos resultados muestran diferencias en la síntesis de isoformas entre tratamientos y días de CS, debido probablemente a la mayor actividad de lacasas que se presentó durante el día 3 de CS con los tratamientos con cal en ambas especies de *Pleurotus*.



Fotografía 3. Zimograma de la enzima lacasa de *Pleurotus spp* durante el día 7 de CS revelado con tinción de comassie

Los resultados presentados en este estudio sirven para observar la diferente actividad de la enzima lacasa bajo diferentes pre-tratamientos y días de cultivo sólido, así como la similitud en el peso de lacasas por *Pleurotus sapidus* y *Pleurotus IE8* en BC pre-tratado con cal. La síntesis de distintas isoformas de lacasas por *Pleurotus spp* está sujeta a múltiples factores, como pueden ser cambios en el pH, sustrato, temperatura, humedad, tamaño de partícula, fase de desarrollo del hongo etc. por lo que es importante conocer los factores que provocan la síntesis de está enzima bajo diferentes condiciones.

4.6. CONCLUSIONES

El pre-tratamiento con cal al 8 % p/p con *Pleurotus ostreatus IE8* y *Pleurotus sapidus* favoreció la síntesis de distintas isoformas de estos hongos.

Pre-tratar con cal el bagazo de caña de azúcar además de disminuir componentes de la pared celular, favorece la actividad de enzimas lacasas.

El perfil de isoformas fue similar en los tratamientos con agua y yeso de las especies de *Pleurotus ostreatus IE8* y *Pleurotus sapidus* en los días de cultivo sólido 0, 3 y 7.

Para conocer con exactitud si los pesos observados de los tratamientos del día 3 en el presente estudio corresponden a alguna isoforma o sub-unidad de lacasas se deben realizar estudios más específicos para proteínas, como pueden ser análisis de isoeléctrico-enfoque, técnicas de purificación de enzimas y de cuantificación de aminoácidos (MALDI-TOF) para poder asegurar si los perfiles de la enzima lacasa observados en el presente estudio corresponden a alguna isoforma o sub-unidad de la enzima lacasa.

LITERATURA CITADA

- Baldrian, P. 2003. Interactions of heavy metals with white-rot fungi. *Enzyme and Microbial Technology* 32, 78-91.
- Baldrian P. 2006. Fungal laccases-occurrence and properties. *FEMS microbial Rev.* 30 215-242.
- Bryan, W. y Wilson, K. 1976. Electrophoretic techniques. In principles and techniques of practical biochemistry. Eduard Arnold (ed). John Wiley y Sons, Inc. New York, USA. Pp 98-118.
- Dubois M, K, Gilles A. Hamilton J, K, Rebers P, A and Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem.* 28:350.
- Gianfreda, Liliana; Xu, Feng; Bollag, Jean- Marc. 1999. Laccases. A Useful Group of Oxidoreductive Enzymes. *Bioremediation Journal*, 3(1): 1-25.
- Giardiana, P., Autore, F., Faraco, V., Festa, G., Palmieri, G., Piscitelli, A. y Sannia, G. 2007. Structural characterization of heterodimeric laccases from *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Microbiol.* 75: 1293-1300.
- Guillén F, Martínez AT, Matínez MJ. 1992. Substrate specificity and properties of the aryl-alcohol oxidase from ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Eur J Biochem.* 209;603-11
- Hador, Y; Kerem, Z.; Gododecki, B.; Ardon, O. 1992. Utilization of Lignocellulosic Waste by the edible mushroom *Pleurotus spp.* *Biodegradation*, 3: 189-205.
- Heinzkill M., Bech. L., Halkier, T., Schneider, P., Anke. T. 1998. Characterization of laccases from wood-rooting fungi (family Coprinacea). *Appl. Environ. Microbiol.* 64. Pp. 1601-16006.
- Karp, Gerald., Peter Van Der Geer., Peter, Araiza Martínez. 2005. *Biología celular y molecular: conceptos y experimentos.* 4ª ed. México. McGraw-Hill.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.

- López Cruz, J. I. 2007. Efecto de la temperatura y disolventes orgánicos sobre la actividad de la enzima lacasa de *Myceliophthora thermophila* modificada con polietilenglicol. Tesis de Doctorado en Biotecnología. UAM-Iztapalapa. 114 pp.
- Mayer, M, Alfred. Staples, C, Richard. 2002. Lacasse: New functions an old enzyme. *Phytochemistry* 60 551-565.
- Muñoz, C.; Guillén, R; Martínez, A.T.; Martínez, M.J. 1997. Laccase Isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: Characterization, catalytic properties, and participation in activation of molecular oxygen and Mn⁺² oxidation. *Applied Environmental Microbiology*, 63(6): 2166-2174.
- Morozova, O. V., G. P. Shumakovich., M. A. Gorbacheva., S. V. Shleev., y A. I. Yaropolov. 2007. Blue Laccases. *Biochemistry (Moscow)* vol. 72: 10. Pp 1136-1150.
- Pozdnyakova N. N., O. V. Turkovskaya, E. N. Yudina, and Ya. Rodakiewicz-Nowak . 2006. Yellow Laccase from the Fungus *Pleurotus ostreatus D1*: Purification and Characterization. *Applied Biochemistry and microbiology*. Vol. 42. 1.
- Sánchez C. 2009. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*. 27. 185-194.
- Téllez, T, M. Sánchez, C. Loera, O. Díaz, G, G. 2005. Differential patterns of constitutive intracelular laccases of the vegetative phase of *Pleurotus* species. *Biotechnology letters*. 27: 1391-1394.
- Thurston, C. F. 1994. The structure and funtion of fungal laccases. *Microbiology*, 140: 19-226.
- Tlecuítl-Beristain, S., Sánchez, C., Loera, O., Robson, G. D., Díaz-Godínez, G. 2008. Laccases of *Pleurotus ostreatus* observed at different phases of its growth in submerged fermentation: production of a novel laccase isoform. *British mycological research*. 112. 1080-1084.

6. CONCLUSIONES GENERALES

Las diferentes especies de *Pleurotus* evaluadas en el presente trabajo mostraron durante su desarrollo diferencias ocasionadas por su preferencia en cuanto a las condiciones del sustrato, pH y tiempo de CS, manifestándose en su producción de biomasa, VCR y síntesis de enzimas fibrolíticas.

La VCR y producción de biomasa se piensa que están correlacionadas al momento de producción de enzimas, sin embargo como se observó en el presente trabajo con *Pleurotus djamour* estas actividades la lleva a cabo lentamente que el resto de la especies evaluadas, sin embargo manifiesta mayor actividad en los días 14 y 21 de CS.

Pre-tratar el bagazo de caña de azúcar con químicos favorece la disminución de los componentes de las paredes de la fibra, esto se observó al comparar los tratamientos del día cero con agua contra los tratamientos con cal y yeso.

La DIVMS aumentó en los tratamientos con cal y yeso, sin embargo la cal favorece más que el yeso, así mismo *Pleurotus sapidus* es más efectivo para reducir la lignina del bagazo de caña por lo que aumenta la DIVMS.

Los pre-tratamientos con cal estimulan la actividad de lacasas de *Pleurotus ostreatus* IE8 así como de *Pleurotus sapidus*, pudiéndose observar diferentes patrones de enzimas lacasas en estos tratamientos durante el día 3 de CS, tratamiento que en este trabajo fue el que mostró la mayor DIVMS, así como producción de enzimas extracelulares.

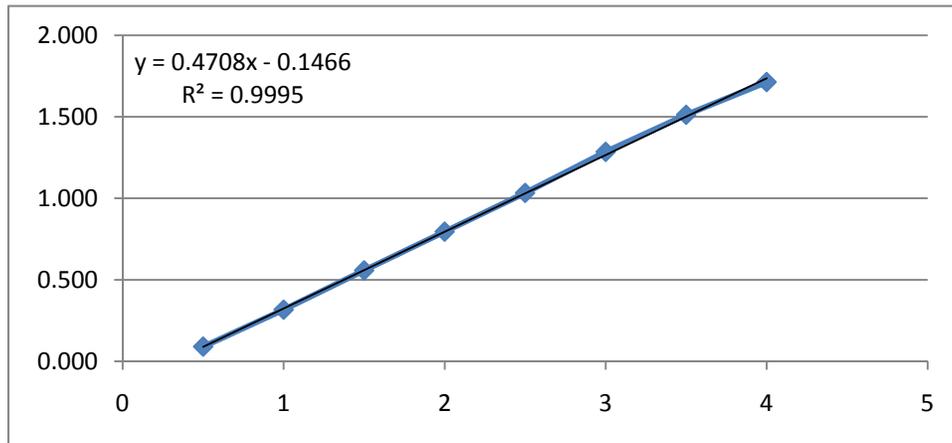
Los zimogramas mostrados en el presente trabajo sirven para validar la hipótesis de este estudio, que los pre-tratamientos químicos promueven diferentes perfiles de isoformas de lacasas, por lo que se propone continuar con esta línea de investigación empleando técnicas de purificación de enzimas para identificar con exactitud estas isoformas.

Anexos

CURVAS PARA CUANTIFICACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

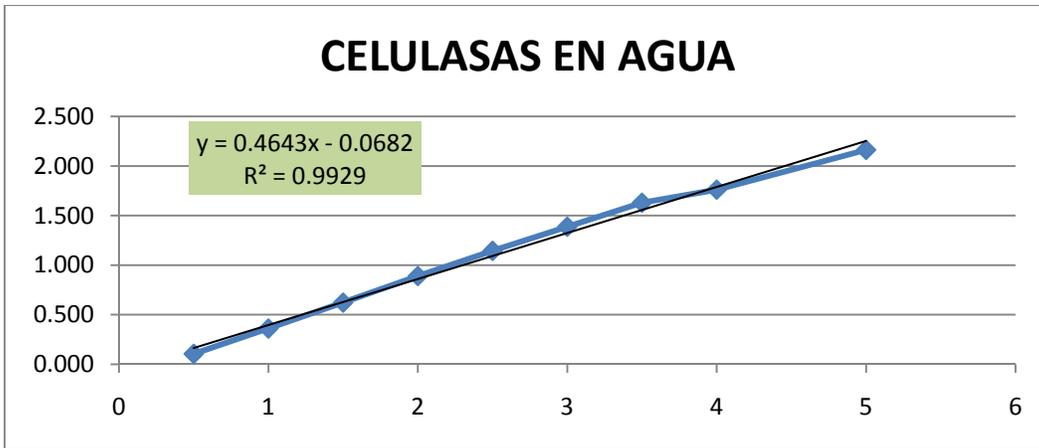
CURVA XYLANASAS

Tubo	Concentración umol	r1	r2	r3	Repetición
1	0.5	0.092	0.096	0.08	0.089
2	1	0.3	0.336	0.312	0.316
3	1.5	0.556	0.565	0.551	0.557
4	2	0.804	0.788	0.793	0.795
5	2.5	1.018	1.04	1.04	1.033
6	3	1.273	1.288	1.293	1.285
7	3.5	1.508	1.537	1.492	1.512
8	4	1.678	1.677	1.786	1.714



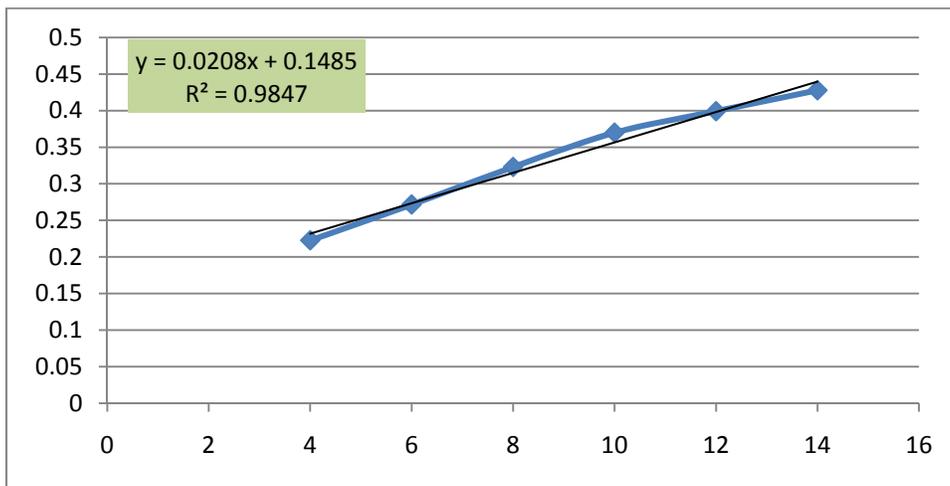
CURVA CELULASAS

Tubo	Concentración umol	r1	r2	r3	Repetición
1	0.5	0.107	0.108	0.1	0.105
2	1	0.36	0.354	0.369	0.361
3	1.5	0.631	0.62	0.616	0.622
4	2	0.901	0.888	0.88	0.890
5	2.5	1.164		1.125	1.145
6	3	1.369	1.396	1.397	1.387
7	3.5	1.634	1.627	1.628	1.630
8	4	1.656	1.8	1.829	1.762
9	5	2.144	2.155	2.19	2.163
10	6			2.408	2.408



CURVA PROTEÍNA EXTRACELULAR

Tubo	Concentración umol	r1	r2	r3	Promedio
1					
2	4	0.216	0.219	0.233	0.223
3	6	0.26	0.28	0.275	0.272
4	8	0.327	0.319		0.323
5	10	0.376	0.366	0.368	0.370
6	12	0.391	0.403	0.404	0.399
7	14	0.433	0.424	0.427	0.428



Anexo II

Soluciones para preparar los geles para zimogramas

- **Solución I.** Acrilamida/Bis (30% T (tamaño del poro), 2.67% C (concentración de acrilamida))

Acrilamida	29.2 g/100 mL
N'N'-bis-methyl-acrilamida	0.8 g/100 mL
- **Solución II.** 10% (p/v) SDS
Disolver 10 g de SDS en 90 mL de agua desionizada en agitación y aforar a 100 mL.
- **Solución III.** 1.5 M Tris – HCl pH 8.8
18.15 g Tris base
80 mL agua desionizada
Ajustar a pH 8.8 con HCl. Aforar a 100 mL con agua desionizada, refrigerar a 4 °C.
- **Solución IV.** 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8
6 g Tris base
60 mL agua desionizada
Aforar a 100 mL con agua desionizada, almacenar a 4 °C
- **Solución V.** Buffer de muestra
3.55 mL agua desionizada
1.25 mL 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8
2.5 mL glicerol
2.0 mL 10% (p/v) SDS
0.2 mL 0.5 (p/v) Azul de bromofenol
Almacenar a temperatura ambiente.
Uso: agregar 50 µL de mercaptoetanol a 950 µL de buffer de muestra antes de usarse.
- **Solución VI.** Buffer de corrida pH 8.3
30.3 g Tris base
144.0 g glycina
10.0 g SDS

Disolver y aforar a 1 litro de agua desionizada. Ajustar el pH a 8.3

Uso: diluir 50 mL de la solución de buffer de corrida con 450 mL de agua desionizada para cada corrida.

- **Solución PSA.**

Preparar al momento de elaborar el gel.

0.1 g de APS

mL de agua desionizada