

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DELIGNIFICACION DE RASTROJO DE MAIZ POR
PLEUROTUS OSTREATUS

T E S I S M A N C O M U N A D A
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A N
ALEJANDRA AGUILAR VALDES
MARIA SILVIA HERNANDEZ OLVERA
BERTHA SOCORRO RAMIREZ VENEGAS

MEXICO, D. F.

1 9 8 2



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ENES PROFESIONALES
NO. DE CLASIFICACION

JURADO ASIGNADO
ORIGINALMENTE -
SEGUN EL TEMA.

PRESIDENTE

Prof. Rosa María Ramírez Gama

VOCAL

Prof. Eduardo Barzana García

SECRETARIO

Prof. Hermilo Leal Lara

1er. SUPLENTE

Prof. Agustín Lopez Munguía C.

2do. SUPLENTE

Prof. Francisca Aída Iturbe Ch.

Sitio donde se desarrolló el tema: División de Estudios de Postgrado
Depto. de Alimentos
Facultad de Química

SUSTENTANTES:

Alejandra Aguilar Valdes

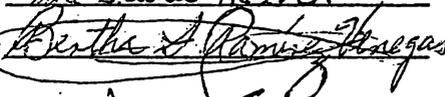
María Silvia Hernández Olvera

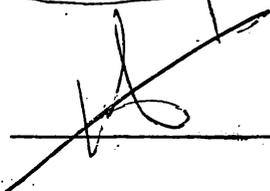
Bertha Socorro Ramírez Venegas

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Hermilo Leal Lara



María Silvia Hdz. O.




CON CARINO

A MIS PADRES Y A MIS HERMANOS

BERTHA

A MIS PADRES, por el amor que me manifiestan

A TI ÁBUELITA, por tu ternura

A USTEDES FER, LAURA Y TERE, por los momentos felices que me han hecho vivir.

ALEJANDRA.

A quienes han contribuido para alcanzar mis objetivos con su apoyo y orientación a lo largo de mi vida.

A MIS PADRES:

Miguel y Graciela

A MIS ABUELOS:

Alfonso y Carmen
Julian y Gabriela

A MIS HERMANOS:

Jaime, Carolina, Graciela,
Miguel Angel y Laura

A MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS

A Gerardo Abad

SILVIA

AL DR. HERMILO LEAL LARA

Por su contribución y ayuda en nuestra formación profesional, así como el apoyo constante que recibimos durante la realización de este trabajo.

Bertha, Alejandra y Silvia

INDICE

| | Pag. |
|---|------|
| I. Introducción | 1 |
| 1. Naturaleza e importancia de los materiales lignocelulósicos | 2 |
| 2. Estructuras físicas y químicas del material lignocelulósico y de sus componentes | 6 |
| 2.1 Celulosa | 8 |
| 2.2 Hemicelulosa | 11 |
| 2.3 Lignina | 13 |
| 3. Utilización real y Potencial de los materiales lignocelulósicos | 19 |
| 4. Pretratamientos de la lignocelulosa para aumentar su bioutilización | 22 |
| 4.1 Procesos físicos | 22 |
| 4.2 Procesos químicos | 29 |
| 4.3 Procesos enzimáticos | 34 |
| 4.4 Procesos microbiológicos | 37 |
| 5. Mecanismos de biodegradación de la lignina | 37 |
| 5.1 Enzimas que causan demetilación | 42 |
| 5.2 Enzimas que hidrolizan enlaces aril glicerol-beta-aril-eter | 43 |
| 5.3 Oxigenasas | 44 |
| 5.4 Fenol-oxidasas | 47 |
| 5.5 Celobiosa: quinona oxido-reductasa | 51 |
| 6. La degradación de lignina por microorganismos | 55 |
| 6.1 Bacterias | 57 |
| 6.2 Hongos de la Pudrición Blanda | 58 |
| 6.3 Hongos de la Pudrición Oscura | 58 |
| 6.4 Hongos de la Pudrición Blanca | 59 |
| 6.5 <u>Pleurotus ostreatus</u> | 60 |

| | Pag. |
|--|------|
| II. Materiales y Métodos | 64 |
| 1. Cepas fúngicas | 65 |
| 2. Medios de cultivo | 65 |
| 2.1 Medio de agar-malta para la propagación vegetativa | 65 |
| 2.2 Medio de rastrojo de maíz | 67 |
| 3. Materiales lignocelulósicos | 67 |
| 4. Condiciones de cultivo e inoculación | 68 |
| 4.1 Inoculación y propagación vegetativa en medio de agar-malta | 68 |
| 4.2 Inoculación y cultivo para los estudios de biodegradación | 69 |
| 5. Condiciones experimentales para el estudio de la degradación de la lignocelulosa por <u>P. ost.</u> | 69 |
| 6. Determinación de carbohidratos solubles, hemicelulosa y celulosa | 70 |
| 6.1 Metodología de extracción de los polisacáridos | 70 |
| 6.2 Determinación de pentosas (Método de Tracey) | 74 |
| 6.3 Determinación de hexosas (Método modificado de Klein-Weissman) | 75 |
| 7. Determinación de lignina (Método de Effland) | 76 |
| 8. Determinación de cenizas | 79 |
| 9. Determinación de proteína (Método de Micro-Kjeldhal) | 79 |
| III. Experimentos y Resultados | 81 |
| 1. Selección y estandarización de métodos analíticos | 82 |
| 1.1 Cuantificación de pentosas por el método de Tracey | 83 |
| 1.2 Cuantificación de hexosas por el método modificado de Klein Weissman | 94 |
| 1.3 Extracción de celulosa y hemicelulosa | 104 |
| 2. Análisis y selección del sustrato para los experimentos de degradación | 106 |
| 2.1 Análisis químicos | 107 |
| 2.2 Análisis físicos | 107 |

| | Pag. |
|--|------|
| 3. Estudio de los patrones de degradación del rastrojo de maíz por <u>P. ostreatus</u> | 112 |
| 3.1 Modelo experimental inicial | 114 |
| 3.2 Procedimiento de inoculación | 117 |
| 3.3 Efecto del mezclado del sustrato | 120 |
| 3.4 Efecto del tratamiento térmico sobre el sustrato | 124 |
| 4. Determinación de Patrones de degradación de la lignocelulosa por cepas de <u>P. ostreatus</u> | 131 |
| 4.1 Primer experimento | 131 |
| 4.2 Segundo experimento | 147 |
| IV. Conclusiones | 162 |
| V. Apéndice | 165 |
| VI. Bibliografía | 174 |

RESUMEN:

Con los vegetales verdes empieza toda cadena alimenticia, de tal manera que la mayoría de sus carbohidratos son aprovechados por infinidad de seres; como fuente de energía. No así sus carbohidratos estructurales (celulosa y hemicelulosa), a pesar de que se consideran los biopolímeros más abundantes sobre la tierra. Existen muy pocos organismos capaces de utilizarlos, bacterias y hongos principalmente. Los rumiantes también son capaces de aprovecharlos gracias a las bacterias presentes en su rúmen. Sin embargo todos estos organismos no son capaces de utilizar completamente a la celulosa y hemicelulosa, debido a que se encuentran asociados en la naturaleza a un biopolímero aromático llamado lignina.

Se han encontrado microorganismos capaces de degradar lignina con una eficiencia apreciable. Se han estudiado a la fecha alrededor de 25 hongos basidiomicetos llamados de la pudrición blanca, en diferentes partes del mundo. En México, se conoce poco el tema y se tiene desechos lignocelulósicos en abundancia. Es por eso que se considerará de suma importancia hacer el estudio de uno de estos hongos (Pleurotus ostreatus), entre otras cosas por ser comestible, y utilizar como sustrato rastrojo de maíz, por considerarse el esquilmo agrícola más abundante en el país.

Durante el experimento se emplearon las siguientes técnicas: extracción de celulosa y hemicelulosa. Cuantificación de hexosas y pentosas. Extracción y determinación de lignina. Para los experimentos de degradación se incubaron diferentes cepas de P.ostreatus: B,FB, P, PQ y 8x3.

Después de hacer variaciones en la inoculación, mezclado tratamiento térmico del sustrato y contenido de oxígeno en el medio se seleccionaron las condiciones que resultaron mejores.

La mejor cepa resultó ser la 8x3, la cual degradó 65.43% de lignina.

í, INTRODUCCION

1. NATURALEZA E IMPORTANCIA DE LOS MATERIALES LIGNOCELULOSICOS

Durante la fotosíntesis, la energía de la radiación solar es fijada por medio de la clorofila para sintetizar con el bióxido de carbono y el agua los tejidos vegetales. El hombre controla parte de este desarrollo vegetal realizando dos actividades: la agrícola y la forestal. Con estas se obtienen infinidad de productos junto con una cantidad apreciable de desechos. Estas cantidades son pequeñas en comparación con la biomasa vegetal sintetizada sobre la totalidad de la superficie terrestre. - La biomasa vegetal representa por lo tanto un importante recurso renovable que es producido regularmente en forma abundante en la naturaleza. Por ejemplo de acuerdo a la tabla 1.1, en México la producción anual de los principales residuos agrícolas (Promedio de 1972 a 1976) fue de -- 128,152,068 toneladas (De la Torre 1981) y la cantidad de material susceptible de ser utilizado en 1978 fue de 24,980,265 toneladas (Dirección General de Aprovechamientos Forrajeros) (tabla 1.2). A nivel mundial la producción de pajas de cereales en 1977 fue de 2,325 millones de toneladas, mientras que la producción de granos fue solamente de 1,351 millones de toneladas (Chang,1980) (tabla 1.3). La utilización integral de recursos tan valiosos reviste suma importancia, sobre todo en vista del gran número de usos potenciales de los materiales lignocelulósicos en varios sectores industriales, como el alimenticio, farmacéutico, cosméticos y construcción entre otros. Nó obstante, en la actualidad únicamente una fracción muy pequeña de estos materiales lignocelulósicos es utilizada principalmente por las industrias del papel y de la construcción. La -

TABLA I.1 PRODUCCION ANUAL DE LOS PRINCIPALES RESIDUOS
AGRICOLAS (Promedio de 1972 a 1976
(De la Torre 1981)

| Cultivo | Producción Anual | |
|---------------------------------|------------------|-------|
| | Toneladas | % |
| Maíz (rastrajo y olote) | 103,623,675 | 80.28 |
| Sorgo (rastrajo) | 12,488,040 | 9.67 |
| Caña de Azúcar (bagazo) | 8,396,646 | 6.50 |
| Trigo (paja) | 2,519,361 | 1.95 |
| Frijol (paja) | 617,819 | 0.48 |
| Arroz Palay (cascarilla y Paja) | 506,527 | 0.39 |

TABLA I.2 PRODUCCION NACIONAL DE ESQUILMOS AGRICOLAS EN 1978

(Dirección General de Aprovechamientos Forrajeros, 1978)

| ESQUILMO AGRICOLA | PRODUCCION (TON) |
|------------------------------------|---------------------|
| RASTROJO DE MAIZ | 16,613,532 |
| PATA DE SORGO | 2,492,874 |
| PAJA DE TRIGO | 1,723,670 |
| PAJA DE FRIJOL | 1,320,716 |
| PUNTA DE CAÑA DE AZUCAR | 1,205,557 |
| CASCARILLA Y SALVADO DE TRIGO | 750,172 |
| PAJA DE CEBADA | 534,746 |
| PAJA DE AVENA | 131,321 |
| FRUTAS Y HORTALIZAS NO COMERCIALES | 79,855 |
| CASCARILLA DE ARROZ | 59,309 |
| PAJA DE CACAHUATE | 43,379 |
| PAJA DE GARBANZO | 25,134 |
| TOTAL | <u>24,980,265</u> |

FABLA I.3 PRODUCCION MUNDIAL DE CEREALES Y SUS PAJAS EN 1977

(FAO Production Year Book 1977)

| CEREAL | GRANOS (MILLONES DE TON METRICAS) | FACTOR DE CONVERSION | PAJA (MILLONES DE TON METRICAS) |
|----------------|---|-------------------------|---------------------------------------|
| TRIGO | 387 | 1.8 | 697 |
| ARROZ | 366 | 1.0 | 366 |
| MAIZ | 350 | 2.4 | 840 |
| OTROS CEREALES | 248 | 1.7 | 420 |
| TOTAL | <u>1,351</u> | | <u>2,325</u> |

utilización tan raquítica de estos materiales ha sido consecuencia de - varios tipos de factores. Uno de los obstáculos de mayor importancia - son las características físicas y químicas de los materiales lignocelulósicos. Por ello inicialmente se presentará una descripción de las estructuras físicas y químicas de las lignocelulosas y de sus componentes, para posteriormente discutir las potencialidades de su utilización.

2. ESTRUCTURAS FISICAS Y QUIMICAS DEL MATERIAL LIGNOCELULOSICO Y DE SUS COMPONENTES.

El material lignocelulósico está constituido por: celulosa, hemicelulosa y lignina y es el principal componente estructural de la pared celular de las plantas. La celulosa está presente de un 40 a un 60%, la hemicelulosa de un 15 a un 50% y la lignina de un 10 a un 30% (Dekker y Lindner, 1979), dependiendo del tipo de vegetal, del tejido y edad del mismo.

Una pared celular típica de un tejido vegetal está constituida por una laminilla media, una pared primaria y una pared secundaria. Esta última está compuesta a su vez por tres capas la S_1 , S_2 y S_3 (Cowling, 1961). Por lo general la capa S_2 es la de mayor espesor comparada con las otras dos capas (S_1 y S_3), con la pared primaria y con la laminilla media (figura 1.1). En la laminilla media se encuentra casi toda la lignina y la proporción de ésta va disminuyendo conforme se acerca al lúmen. La pared secundaria contiene muy poca lignina y más bien está

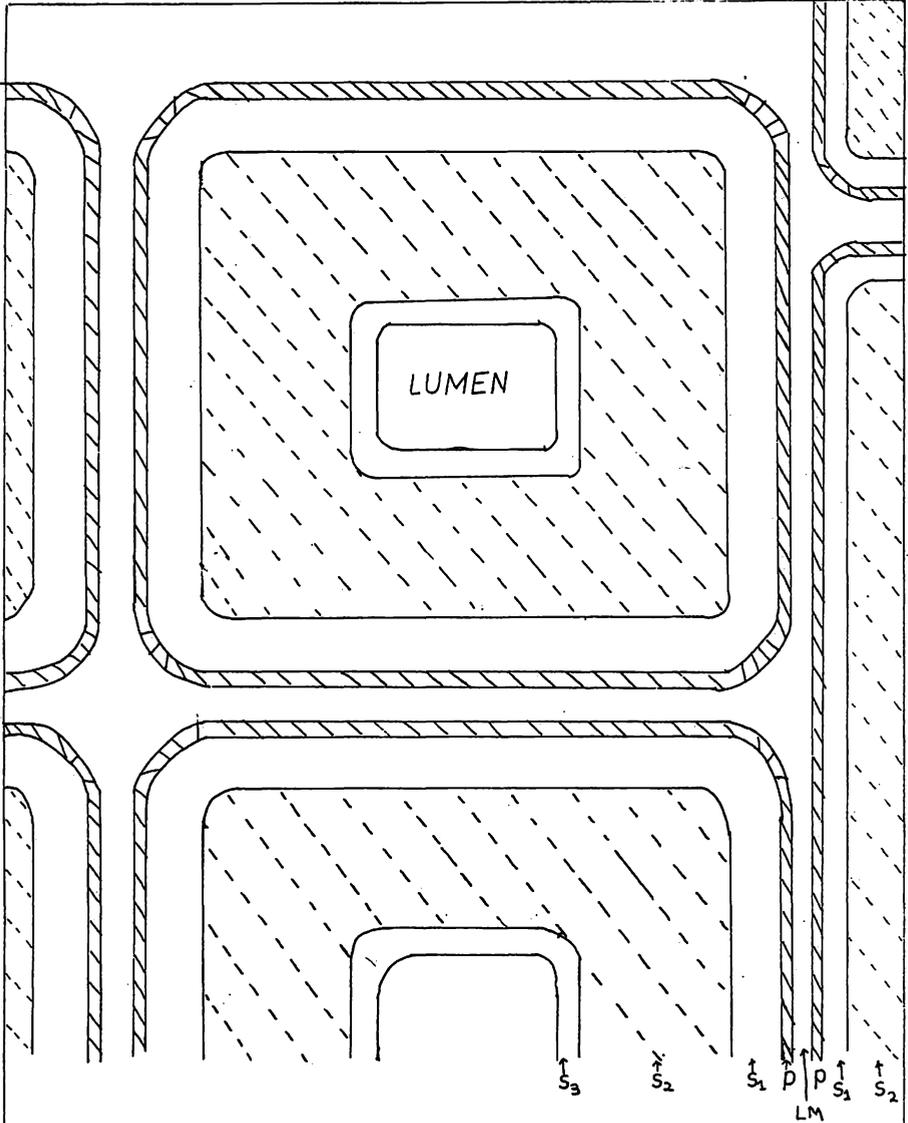


Figura I.1 Pared celular típica de tejido vegetal con laminilla media (LM); Pared primaria (P) y Pared secundaria constituida por capa exterior (S₁), capa central (S₂) y capa interior (S₃).
(Cowling, 1961)

constituída por carbohidratos. En cada capa de la pared secundaria, la celulosa y cantidades mínimas de otros constituyentes están agregados - en estructuras longitudinales llamadas microfibrillas. Dentro de cada microfibrilla, las moléculas lineales de celulosa están unidas lateralmente por puentes de hidrógeno y por fuerzas de Van der Waals (Cowling, 1961) . Las moléculas de celulosa se encuentran asociadas con diferentes grados de ordenación, cuando las moléculas se encuentran altamente ordenadas, las regiones correspondientes se conocen como cristalinas, mientras que las regiones con menor grado de ordenación son llamadas amorfas (figura 1.2). Dentro de la pared secundaria, la lignina está - concentrada en los espacios localizados entre las microfibrillas y en las regiones amorfas entre cristales de celulosa. Se sugiere que la asociación de la celulosa con la lignina es en gran parte física formando un sistema de entrecruzamiento de polímeros (Cowling, 1961) . A esta íntima asociación física se le ha considerado la responsable de la resistencia de este material a la degradación biológica. En las regiones amorfas entre cristales de celulosa se encuentra también hemicelulosa, minerales y otros materiales como: grasas, ceras, aceites esenciales, taninos, resinas, carbohidratos solubles y proteínas.

2.1 CELULOSA

Estructuralmente (figura 1.3) la celulosa es un polisacárido de alto peso molecular, formado de unidades de D-glucosa con uniones 1,4- β -glu-

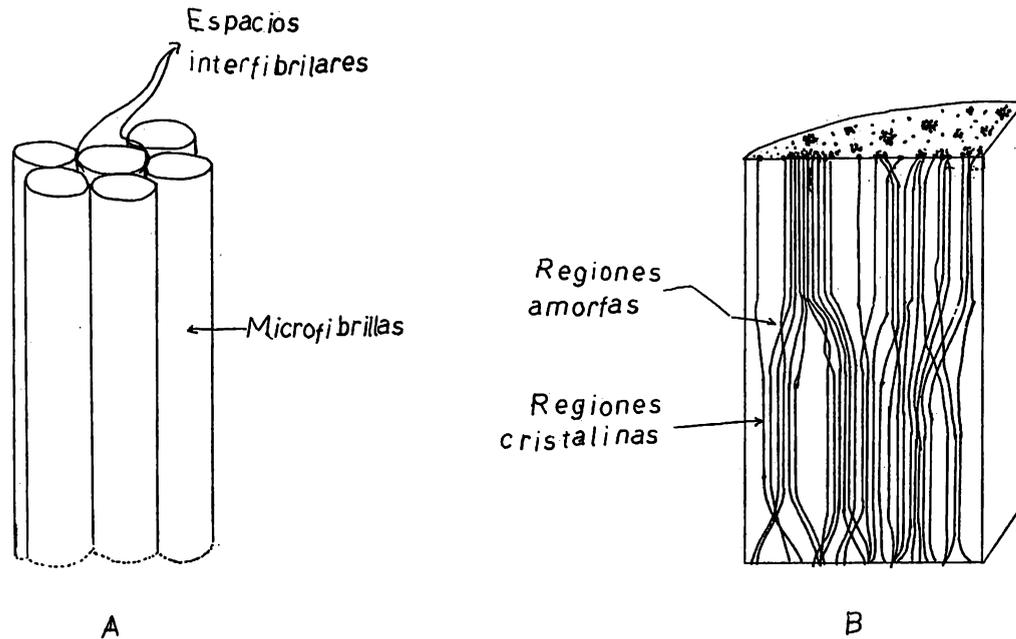


Figura I.2 (A) Microfibrillas que componen las capas de la pared secundaria
(B) Microfibrillas mostrando las moléculas de celulosa asociadas en diferentes grados de ordenación
(Cowling, 1961)

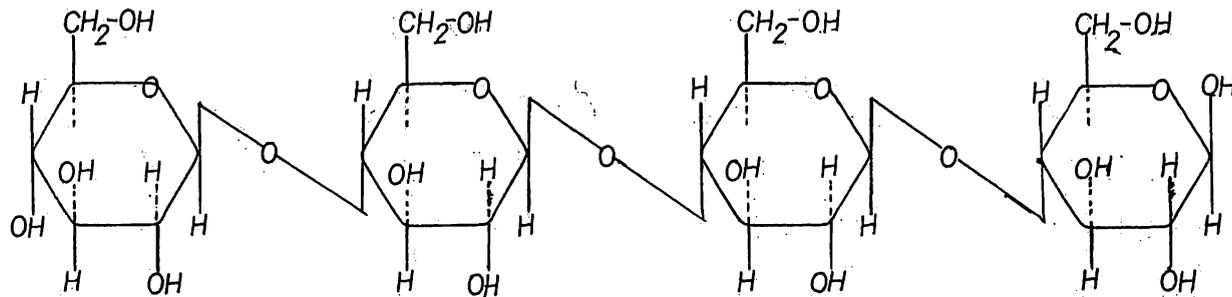


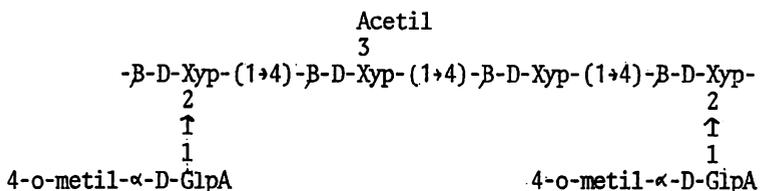
Figura I.3: Estructura química de la celulosa

cosídicas (Devoré y Muñoz, 1975). Se ha demostrado que las unidades de glucosa en estas cadenas adoptan una conformación de silla en donde los grupos hidroxilo ocupan una posición ecuatorial estable.

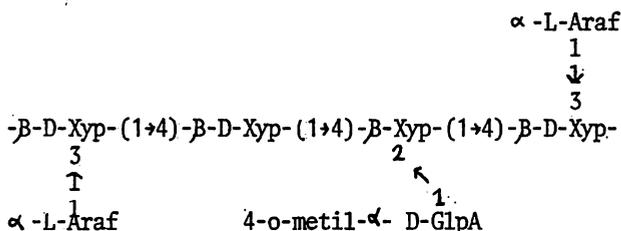
Las cadenas de celulosa no son ramificadas y por lo tanto la molécula es alargada y plana. Químicamente se puede diferenciar tres tipos de celulosas: la alfa-celulosa, la beta-celulosa y la delta-celulosa. La alfa-celulosa es la porción insoluble después de un tratamiento con solución acuosa de hidróxido de sodio al 17.5%. Al neutralizar la fracción acuosa alcalina, precipita la beta-celulosa, quedando en solución la delta-celulosa. La celulosa natural está constituida casi enteramente por alfa-celulosa (Browning y Dekker, 1977). La alfa-celulosa tiene un grado de polimerización de 200 a 300 unidades de glucosa.

2.2 HEMICELULOSA

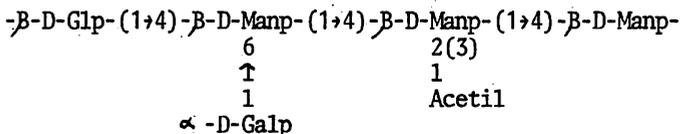
Según su composición química, se reconocen cuatro tipos de estructuras: xilanos, beta-mananos, galactanos y L-arabinanos. Los constituyentes principales de la hemicelulosa en los residuos lignocelulósicos son los xilanos (figura 1.4), tales como los 4-o-metilglucuronoxilanos y los arabino-4-o-metilglucuronoxilanos y los beta-mananos, tales como gluco y galacto-glucomanos (Dekker y Lindner, 1979).



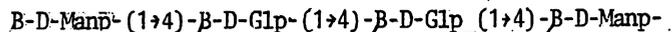
1.- o-acetil-4-o-metilglucuronoxilano (madera dura)



11.- Arabino-4-o-metilglucuronoxilano.
(madera blanda, bagazo, maíz).



111.- o-acetil-galactoglucomanano (madera suave)



IV.- Glucomanano (madera dura)

Galp.-galactopiranosido. Glp.-glucopiranosido.
 GlpA.-glucopiranosilurónido
 Araf.-arabinofuranósido.
 Xyp.-xilopiranosido
 Manp.-manopiranosido

Fig. 1.4 Estructuras de las principales hemicelulosas en los residuos lignocelulósicos. (Dekker y Lindner, 1979)

2.3 LIGNINA

Se considera a la lignina como un material incrustante ya que éste es el último componente que se sintetiza en el tejido vegetal, aumentando su producción conforme la planta envejece.

La lignina es un polímero estructural de las plantas vasculares, formada de unidades de fenil propano. Proporciona a las plantas rigidez y unión entre sus células, además de disminuir la permeabilidad al agua a través de las paredes celulares y proteger a las células de invasiones por microorganismos (Sarkanen y Ludwig, 1971). Según la definición de Sarkanen y Ludwig, la lignina es un polímero natural formado a través de una polimerización de tres precursores primarios; alcohol-trans-para-cumárico; alcohol trans-coniferílico y alcohol-trans-sinápico (figura 1.5). La forma trans-coniferílica es la que predomina casi siempre en la estructura de la lignina, alrededor de un 80% y las otras dos formas varían en porcentajes según el tipo de material del que provenga la lignina. En la formación del polímero de lignina se distinguen dos etapas, una enzimática y una química. En la primera ocurre una deshidrogenación por la acción de fenol oxidasas (lacasas y principalmente peroxidasa), produciéndose radicales libres, estos radicales se encuentran en varias formas resonantes, polimerizan aleatoriamente sin intervención enzimática alguna. Consecuentemente la molécula de lignina presenta una estructura ramificada irregular. (Ander y Eriksson, 1978). (Fig. 1.6) Con el fin de tener un mayor conocimiento sobre su estructura, los diferentes tipos de uniones entre unidades de fenilpropano han sido cuanti-

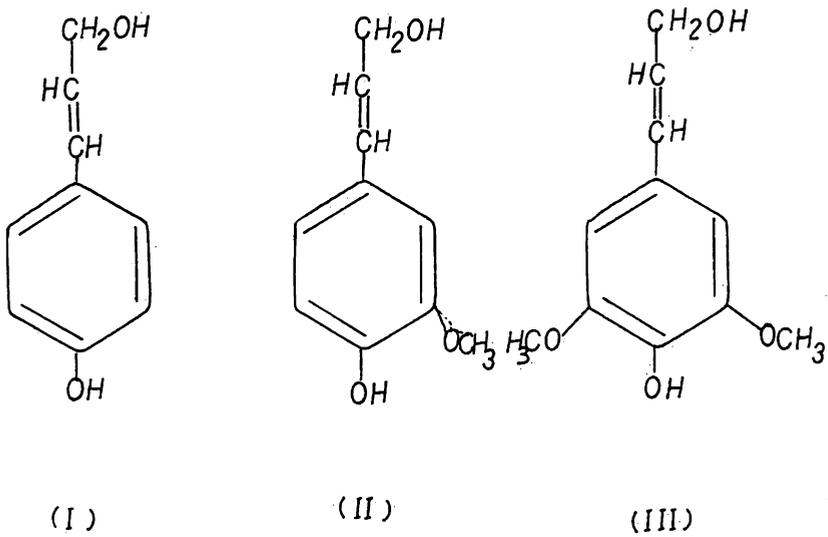


Figura I.5 Monómeros de la lignina
 (I) alcohol p-cumárico
 (II) alcohol trans coniferílico
 (III) alcohol trans sinápico
 (Ander y Eriksson, 1978)

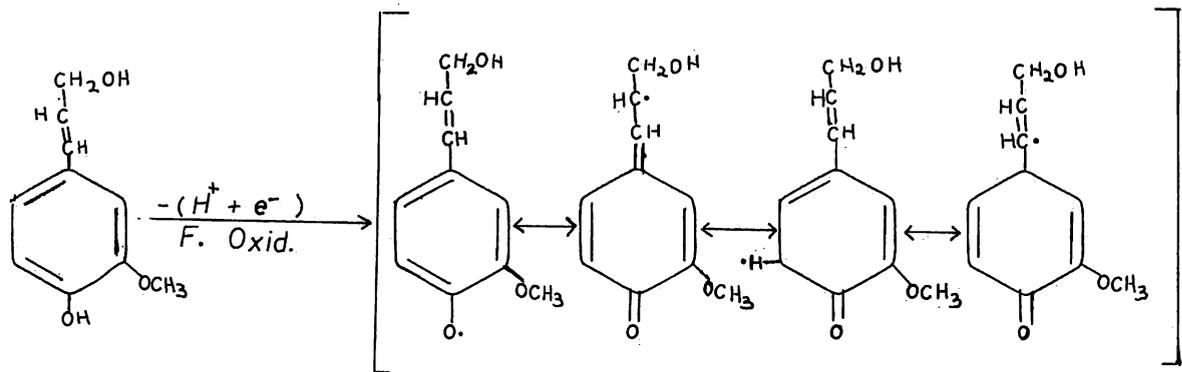


Figura I.6 Formación del radical libre y estructura de resonancia en el alcohol coniferílico (Ander y Eriksson, 1978)

ficadas en diferentes tipos de ligninas. De esta forma ha sido posible construir una fórmula esquemática para cada una de estas ligninas, donde se representan cuantitativamente los enlaces encontrados entre monómeros. Así Freudenberg en 1968, encontró una fórmula esquemática para la lignina del abeto (Kirk, 1971), al igual que Harkin, Taylor y Battersby en 1967 (Dekker, 1967) y Adler y Tidskr en 1968 (Ander y Eriksson, 1978). Glasser, y Nimz en 1976, determinaron una estructura modelo para la lignina de madera suave (Hall, 1980), en donde se representan 94 monómeros de fenil propano con una gran variedad de tipos de enlaces, incluyendo posibles uniones con carbohidratos.

La fórmula esquemática para la lignina de abeto encontrada por Adler, contiene solo 16 unidades (figura 1.7). Según Kirk (1971), los tres tipos de uniones más importantes, por su abundancia en la molécula de lignina son:

- 1) Arilglicerol-beta-arileter. Como se observa en la figura 1.7 entre los monómeros 1 y 2, 2 y 6, 7 y 8, 9 y 10, 10 y 11.
- 2) Difencil-cumarona. Entre los monómeros 6 y 7.
- 3) Bifenílica. Entre los monómeros 8 y 9, 14 y 16.

Existen otros tipos de uniones de menor importancia como:

- 4) Diaril-éter. Entre los monómeros 14 y 15.
- 5) Bencil-éter. Entre los monómeros 3 y 6.
- 6) Pino-resinólica. Entre los monómeros 13 y 14.

También se ha tratado de determinar el peso molecular de la lignina. Según Kirk y Chang (1974), la lignina de abeto tiene un peso molecular de 638.

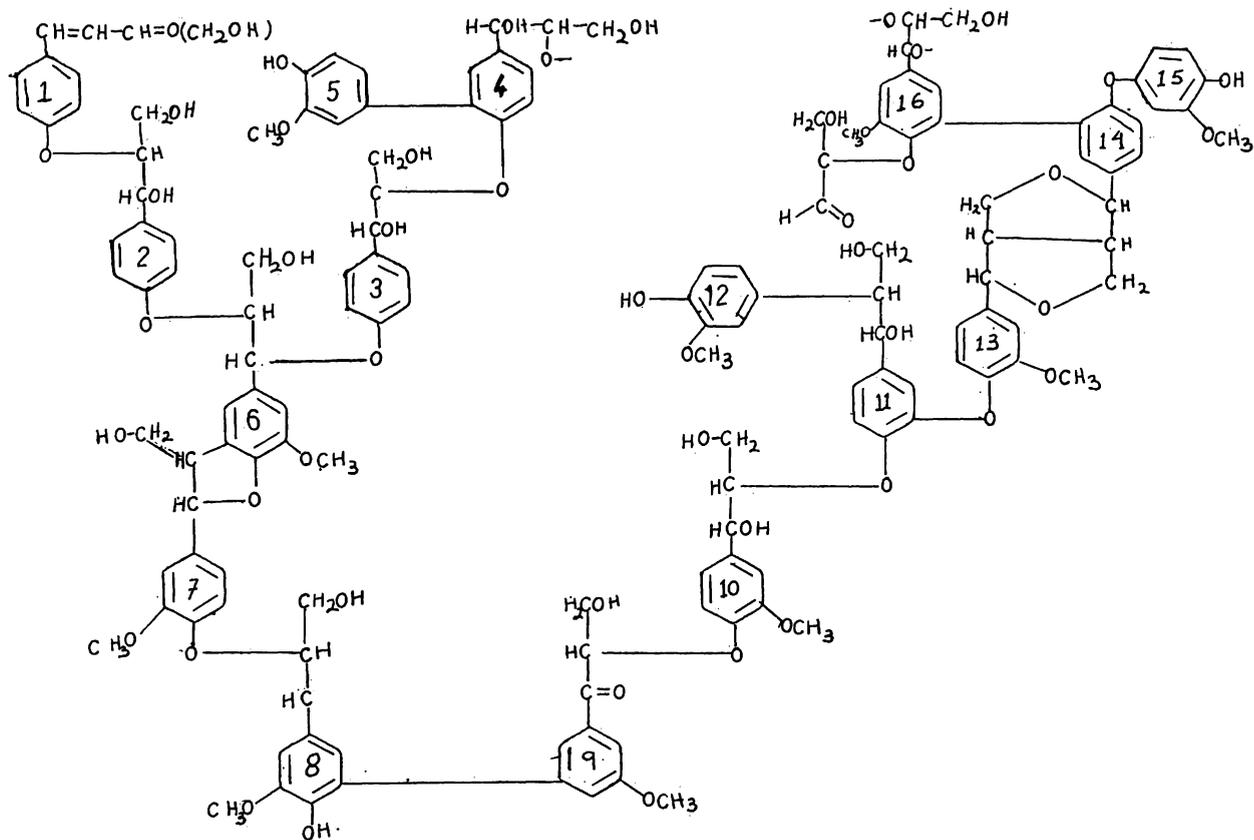


Figura I.7: Fórmula esquemática para la lignina de abeto según Adler (Ander y Eriksson, 1978)

Como conclusión: la celulosa junto con la hemicelulosa son los componentes más abundantes en los materiales lignocelulósicos. A la celulosa se le considera inclusive como el material renovable más abundante en la biósfera (Dekker y Lindner, 1979). Tanto la celulosa como la hemicelulosa, representan una enorme fuente potencial de energía. Potencial - debido a las dificultades de la implementación de un proceso químico o biológico que los haga disponibles. Esto se debe a la incapacidad que tienen las enzimas para degradar dichos carbohidratos en la presencia de lignina, ya que ésta los protege al estar situada en la laminilla media de la pared celular o incrustada en la molécula de celulosa. El problema no existiría si la lignina fuera fácil de degradar pero, su estructura complicada e irregular hace que solo un grupo muy reducido de organismos sea capaz de atacarla, por lo general de una manera extremadamente lenta. En la naturaleza la lignina es convertida a humus por la acción de estos microorganismos sobre el tejido muerto de los vegetales a lo largo de varios años.

3. UTILIZACION REAL Y POTENCIAL DE LOS MATERIALES LIGNOCELULOSICOS.

Son pocos los usos reales que se le han dado al material lignocelulósico de desecho (aserrín de maderas y esquilmos agrícolas). Generalmente se emplean como combustibles, también se comprimen obteniéndose paneles, etc., en menor escala se obtienen algunos productos químicos, tal es el caso del furfural a partir del olote de maíz y del bagazo de caña (Kent, 1971).

Por otro lado se han hecho infinidad de estudios para ampliar su utilización deficiente. Se ha tratado de obtener proteína unicelular (microbiana) creciendo microorganismos celulolíticos sobre estos materiales, sin tenerse resultados satisfactorios debido principalmente a la presencia de lignina. De 200 microorganismos entre hongos, bacterias y levaduras, solo 38 crecieron en medio líquido de corteza de Pinus radiata (Updegraffa y Grant, 1975). Aspergillus fumigatus posee una proteína de alta calidad y a pesar de ser celulolítico no logra crecer en material lignocelulósico sino únicamente en celulosa pura (Rogers y col, 1972). El volumen de desperdicios celulósicos sería suficiente para cubrir las necesidades alimenticias del mundo por medio de bioconversión microbiana ya que la celulosa es un recurso renovable. Desafortunadamente a pesar de que existen tanto microorganismos mesófilos como termófilos capaces de utilizar la celulosa, la lignina les obstaculiza su empleo en los materiales lignocelulósicos (Bellamy, 1974). También se han tratado de emplear procesos de bioconversión directamente sobre estos residuos lignocelulósicos para obtener: azúcares, solventes orgánicos, alcohol, etc. Sin tenerse resultados satisfactorios de-

bido a la presencia de lignina en ellos (Ander y Eriksson, 1978).

Tanto la celulosa como la hemicelulosa son una fuente potencial de energía para los rumiantes (Hartley, Edwin y King, 1974). En ocasiones, sobre todo durante el invierno, se alimenta a los rumiantes con esquilmos agrícolas por falta de otra fuente, considerandoseles forrajes de mala calidad por la baja digestibilidad que éstos presentan. Al respecto se han hecho infinidad de estudios. En la alimentación de borregos con bagazo de Henequén (Sanginés y Col, 1976), se obtuvieron buenos resultados unicamente con una suplementación de melaza y una fuente de proteína.

Actualmente en México se planea mezclar esquilmos agrícolas con melaza y darlo como alimento a los rumiantes (SARH, 1980). Se ha tratado también de usar el aserrín de pino (Pinus ponderosa) como sustituto de rastrojo en raciones para ganado de engorda (Sánchez, 1976) donde se observó que es factible utilizarlo hasta en un 25% del consumo diario de materia seca. Con niveles mayores es necesario añadir otra fuente de energía en forma de granos y melazas. Sin embargo la utilización de materiales lignocelulósicos de desecho como alimento para rumiantes sería muy conveniente ya que los costos de alimentación representan un 70% en promedio de los costos de producción en la ganadería (SARH, 1980).

Para poder utilizar los esquilmos agrícolas en la alimentación de los rumiantes es necesario aumentar su digestibilidad. Para esto se debe disminuir su contenido de lignina pues se ha demostrado (Kirk y Moore, 1972) que existe una relación inversa entre el contenido de lignina y la digestibilidad (figura 1.8).

En conclusión: Si se quiere utilizar extensivamente el material lignocelulósico de desecho, es necesario disminuir el contenido de lignina

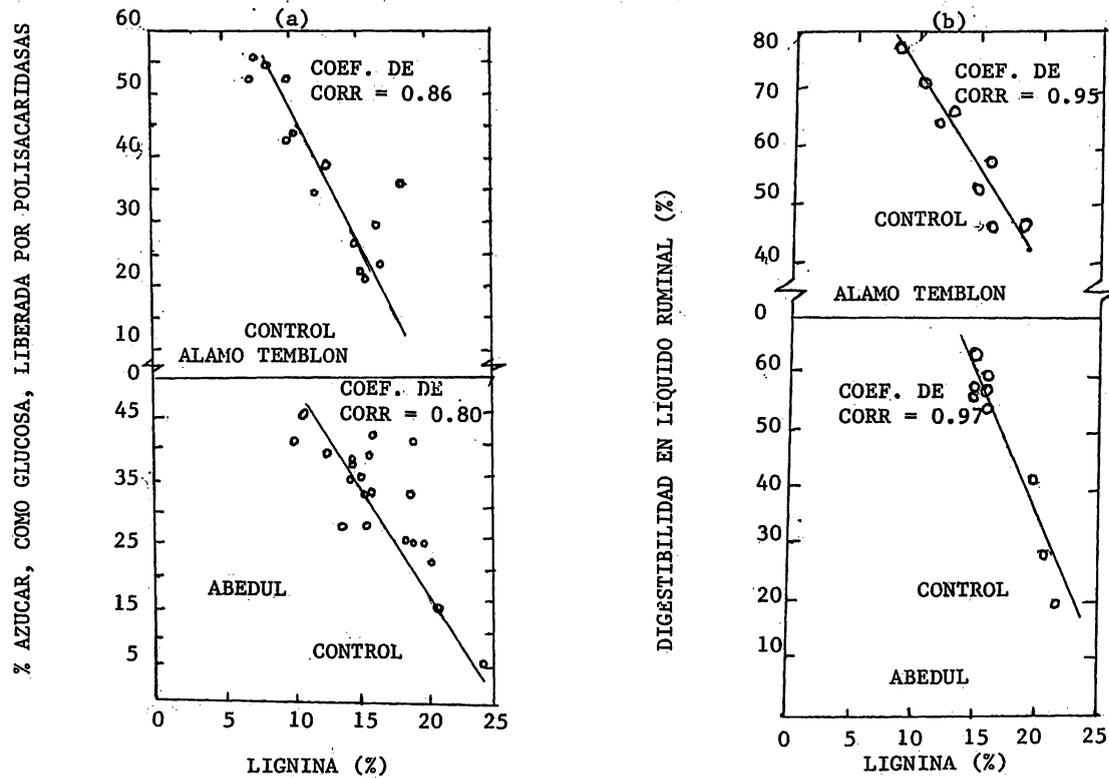


FIG. 1.8 RELACION DE DIGESTIBILIDAD (POR POLISACARIDASAS (a) CON LIQUIDO RUMINAL (b) CON EL CONTENIDO DE LIGNINA)

en él y de esta forma hacer más accesibles los carbohidratos.

4. PRETRATAMIENTOS DE LA LIGNOCELULOSA PARA AUMENTAR SU BIOUTILIZACION

Se ha tratado de aumentar la disponibilidad de la celulosa al ataque enzimático por diferentes tipos de tratamientos a los materiales lignocelulósicos. Se han utilizado tanto tratamientos físicos como químicos y microbiológicos con diferentes resultados.

4.1 PROCESOS FISICOS.

Entre los utilizados se encuentran: la molienda; radiación ionizante de alta energía; calentamiento con vapor y calentamiento a altas presiones.

Molienda

Se ha pensado que al reducir el tamaño de partícula, aumenta el área superficial de contacto con los sistemas enzimáticos que participan en la degradación de la lignocelulosa. Experimentalmente, se ha observado que al disminuir el tamaño de partícula del bagazo de caña (Han y Callihan, 1974) el crecimiento de bacterias celulolíticas registra tan solo un ligero incremento. Con papel de computadora (el cual no contiene lignina) se observó así mismo un ligero incremento en el crecimiento al disminuir el tamaño de partícula (Tabla 1.4). Se puede concluir por lo

TABLA I.4 EFFECTO DEL TAMAÑO DE PARTICULA SOBRE EL CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS

| MUESTRA | CRECIMIENTO CELULAR (UNIDADES KLETT) | PERDIDA DEL SUSTRATO (% DEL INICIAL) |
|----------------|---|--|
| BAGAZO DE CAÑA | | |
| MALLA 28 | 850 | 27 |
| MALLA 28-60 | 850 | 28 |
| MALLA 60 | 1,080 | 35 |

tanto que el tamaño de partícula tiene una influencia mínima sobre el crecimiento de bacterias celulolíticas, tanto en material lignocelulósico como celulósico.

Por otro lado empleando un molino de bolas vibratorio se observó un aumento en la digestibilidad in vitro de maderas duras al disminuir el tamaño de partícula (Millet y col., 1970). La digestibilidad aumentó al incrementarse el tiempo de molido. Sin embargo con más de 30 min. de molienda los incrementos en la digestibilidad son generalmente ya muy pequeños. Al moler aliso rojo, nogal americano, encino rojo, álamo y eucalipto, su digestibilidad mejora en todos los casos por más de 18% (figura 1.9). Las maderas suaves responden menos al molido; de cinco maderas analizadas, se obtuvo un máximo de digestibilidad del 18% al molarlas por 120 min. (Millet y col., 1970).

En general el molido es un tratamiento costoso debido a que la baja densidad del material lignocelulósico ocasiona que los volúmenes a procesar sean considerables. Además de que éste tratamiento da buenos resultados únicamente con maderas duras.

Radiación Ionizante de Alta Energía.

Se ha demostrado que la digestibilidad de ciertas maderas se puede incrementar por medio de radiación ionizante de alta energía. Así fue posible aumentar la digestibilidad del álamo (madera dura) de 55 a 78%, mientras que con el abeto (madera suave), solo se logró mejorar la digestibilidad de 3 a 14% con el mismo tratamiento (Millet y col., 1970) (Tabla 1.5). La radiación rompe las moléculas de polisacáridos sin em-

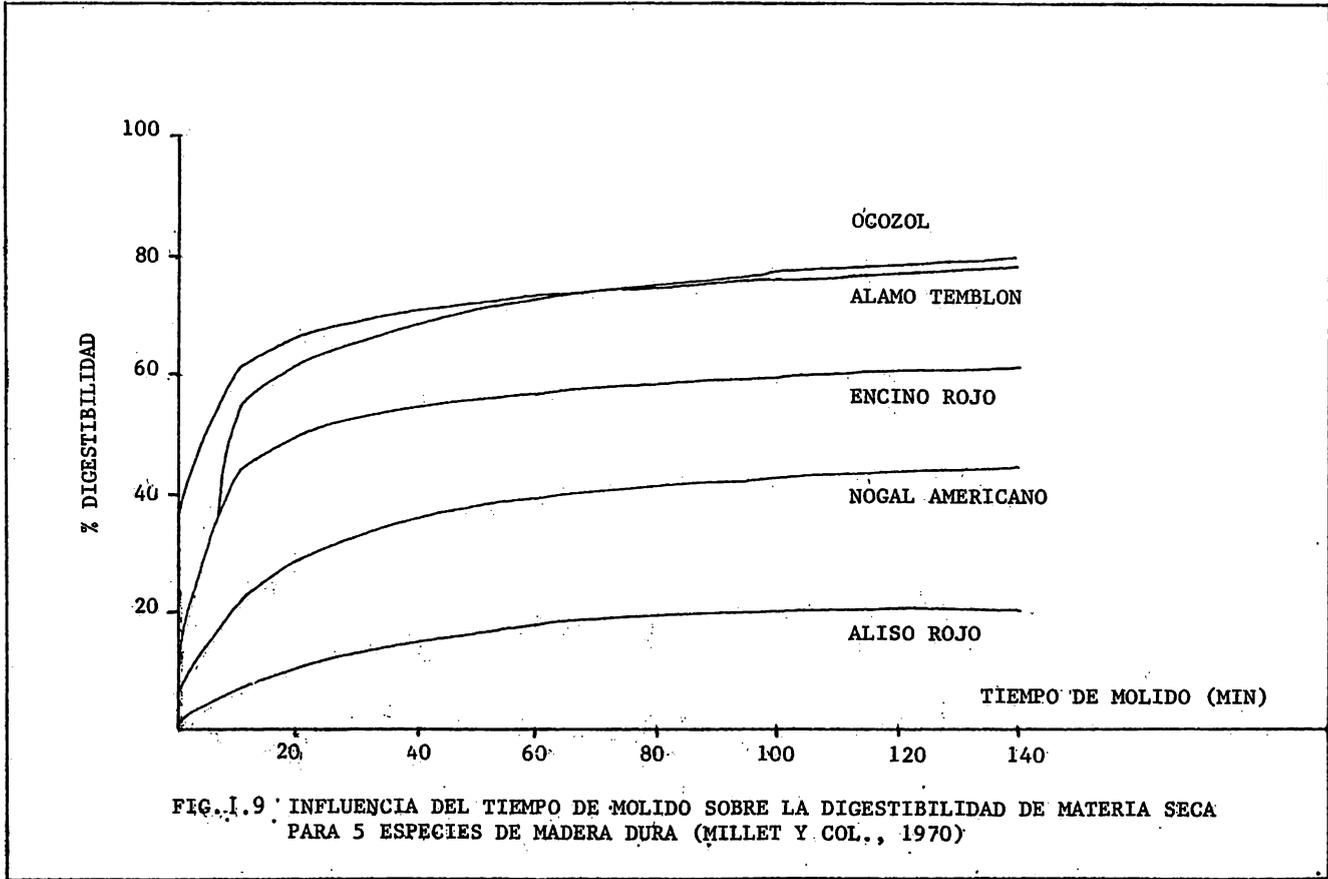


FIG. I.9 INFLUENCIA DEL TIEMPO DE MOLIDO SOBRE LA DIGESTIBILIDAD DE MATERIA SECA PARA 5 ESPECIES DE MADERA DURA (MILLET Y COL., 1970)

EFECTO DE LA RADIACION IONIZANTE SOBRE LA DIGESTIBILIDAD
DE MATERIA SECA DE ALAMO Y ABETO

(Millet y Col., 1970)

| DOSIS DE RADIACION | | % DIGESTIBILIDAD (b) | |
|--------------------|---------------------|----------------------|-------|
| (rep) | (a) | ALAMO | ABETO |
| | 0 | 55 | 3 |
| | 10 ⁶ | 52 | 3 |
| | 10 ⁷ | 59 | 5 |
| | 5 x 10 ⁷ | 70 | 8 |
| | 10 ⁸ | 78 | 14 |

(a) Equivalente Física Roentgen

(b) Digestibilidad in vitro con líquido ruminal

bargo las dosis tan altas son evidentemente caras como para aplicarlas a nivel industrial (Millet, Baker y Satter, 1975).

Calentamiento con Vapor.

Un tratamiento térmico con vapor podría resultar en un hinchamiento de las fibras lignocelulósicas y eventualmente una mayor susceptibilidad al ataque microbiano. El tratamiento de paja de arroz con vapor por 4 horas a 160°C, ocasionó un aumento en la digestibilidad de éste material de 29.4% a 61.5% (medida como solventes totales producidos después de incubar el material con celulasas y proteasas). El tratamiento permitió también que se obtuviera un crecimiento mayor de bacterias celulolíticas (Cellulomonas sp. y Alcaligenes faecalis) (Han y Callihan, - 1974).

La paja de trigo tratada 1 hora a 160°C mejora su digestibilidad in vitro de 36.4% a 50.3% (Bender, Heaney y Bowden, 1970). No obstante, en otros experimentos no se han reportado resultados tan optimistas. El tratamiento del aserrín de diferentes maderas por 2 horas a 180°C aumentó su digestibilidad por solo 7 unidades (Hartley y col, 1974).

Calentamiento a Altas Presiones.

Es de esperarse que un tratamiento térmico a altas presiones es aún más drástico que un simple calentamiento con vapor y consecuentemente las fibras de lignocelulosa pueden sufrir cambios más enérgicos. Sin embargo se ha observado que un tratamiento térmico a altas presiones no mejora la digestibilidad, sino que al contrario éste disminuye, (Tabla 1.6),

TABLA I.6 EFEECTO DEL CALENTAMIENTO A ALTAS PRESIONES CON DIFERENTES
SUSTRATOS SOBRE EL CRECIMIENTO DE CELLULOMONAS SP. Y
ALCALIGENES FAECALIS

(Han y Calihan, 1974)

| SUSTRATO | TRATAMIENTO | PRODUCCION DE CELULAS (mg Proteina/ml) |
|----------------|------------------|---|
| PAJA DE ARROZ | CONTROL | 0.44 |
| | 400 psig/30 seg. | 0.30 |
| | 400 psig/50 seg. | 0.25 |
| | 400 psig/90 seg. | 0.42 |
| BAGAZO DE CAÑA | CONTROL | 0.54 |
| | 400 psig/60 seg. | 0.46 |
| | 500 psig/60 seg. | 0.35 |
| | 500 psig/60 seg. | 0.55 |

cuantificada con el crecimiento de Cellulomonas sp. y Alcaligenes faecalis en suspensiones del material tratado (Han y Callihan, 1974).

4.2 PROCESOS QUIMICOS

Los principales tratamientos que se han estudiado para aumentar la digestibilidad de los materiales lignocelulósicos han hecho uso de agentes alcalinos, ácidos y oxidantes.

Tratamiento Alcalino

La finalidad del tratamiento alcalino es disolver la lignina y los principales agentes que se han usado son: hidróxido de sodio, hidróxido de amonio, hidróxido de potasio, amoníaco, carbonato de sodio, hidróxido de calcio y sulfato de sodio.

Han y Callihan (1974) observaron un efecto positivo sobre el tratamiento de bagazo de caña con hidróxido de sodio (entre 0.5 a 10% de hidróxido de sodio por peso de bagazo seco) (figura 1.10). El tratamiento por dos horas con hidróxido de sodio, no resultó en un desarrollo de microorganismos mayor del ya obtenido con solo cinco minutos de tratamiento. Al tratar bagazo de caña con hidróxido de sodio de 0.5 a 10% por 10 min., se observa que el contenido de lignina, en la mayoría de los casos aumenta. A pesar de ello se observó un aumento en la digestibilidad medida con el crecimiento de bacterias celulolíticas. Han sugiere que el aumento de digestibilidad se debe a cambios en la estructura de las fibras

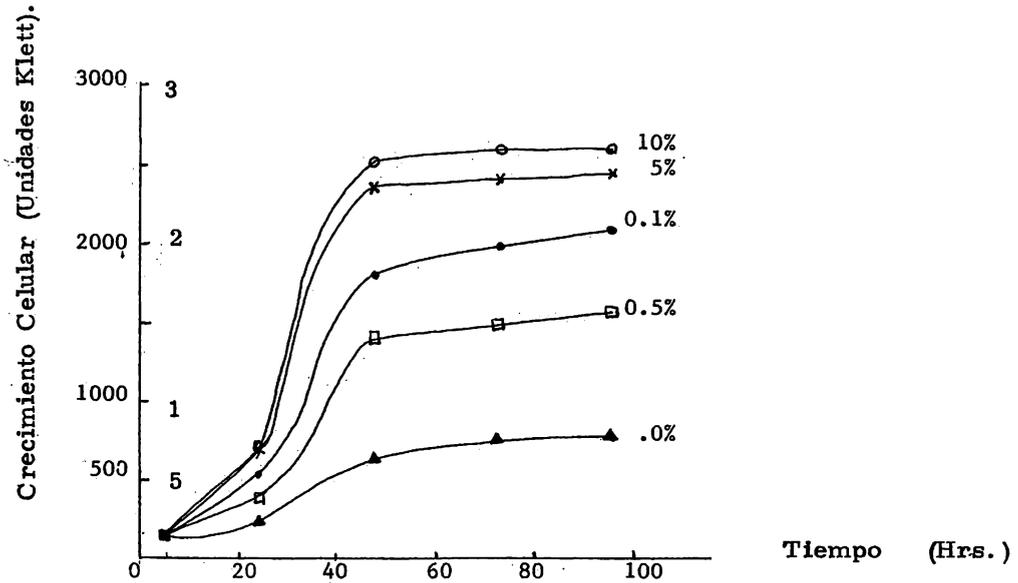


FIG. I.10 CRECIMIENTO DE CELLULOMONAS sp SOBRE BAGAZO DE CAÑA CON TRATAMIENTO ALCALINO.

EL SUSTRATO SE TRATA CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE HIDROXIDO DE SODIO 5 MIN. TEMPERATURA AMBIENTE.

(Han y Callihan, 1974)

celulósicas que permiten un aumento en la digestibilidad de 40 a 60%. Otra posibilidad sería que la lignina hubiera sufrido una ruptura parcial que resultara en un aumento en su solubilidad.

Se han observado diferentes resultados con los diferentes agentes alcalinos. El amoníaco da resultados menos satisfactorios que el hidróxido de sodio (tabla 1.7) en el tratamiento de paja de arroz (Han y Callihan, 1974). El hidróxido de potasio en una concentración del 15% incrementa la digestibilidad in vitro de la paja de trigo hasta 61%, seguido por el hidróxido de sodio (60%) e hidróxido de calcio (56%) (Sánchez, 1976).

Un tratamiento de paja de cebada con hidróxido de sodio al 4% (v/v) mejora su digestibilidad de 36.7% a 57.5%. Tratada 24 horas a 23°C y con una concentración de 8% (v/v) mejora hasta 76.3% en las mismas condiciones. Con estos tratamientos los solubles en agua aumentan, los constituyentes de la pared celular disminuyen ligeramente, al igual que el contenido de lignina y la celulosa se mantiene constante

Del tratamiento alcalino se puede resumir:

- a) Es un tratamiento eficiente sobre todo para esquilmos agrícolas, pero no barato (Hartley y col., 1974).
- b) Si el tratamiento es muy drástico, algo de lignina y sobre todo de hemicelulosa se disuelven, con una consecuente pérdida en la materia.
- c) El material tiene que ser neutralizado y lavado, causando también pérdidas.
- d) Un tratamiento con amoníaco o hidróxido de amonio, hace que el porcentaje de nitrógeno aumente en el material tratado.

TABLA I.7 EFFECTO DEL TRATAMIENTO QUIMICO SOBRE LA DIGESTIBILIDAD
DE LA PAJA DE ARROZ

(Han y Callihan, 1974)

| TRATAMIENTO | TSAE % (a) | CRECIMIENTO MICROBIANO (b) |
|------------------------------------|---------------|-------------------------------|
| CONTROL | 29.4 | 0.60 |
| 3% NH ₃ , 130°C, 4 hs. | 60.0 | - |
| 5.2% NH ₃ , TA, 30 días | 57.0 | 1.11 |
| 2% NaOH, 160°C, 10 min. | 54.4 | 0.92 |
| 4% NaOH, 100°C, 15 min. | 73.0 | 1.76 |
| 4% NaOH, 100°C, 60 min. | 78.0 | 1.62 |
| 4% NaOH, 150°C, 50 min. | 76.0 | 1.38 |

TA Temperatura ambiente

(a) Solubles totales después del tratamiento con celulasas y proteasas

(b) Cantidad de proteína (mg/ml) producción en el cultivo de
Cellulomonas sp. y Alcaligenes Faecalis

e) Se han observado anomalías fisiológicas muy frecuentes en animales alimentados con forrajes tratados a base de hidróxidos (Sánchez, - 1976).

Tratamiento ácido.

Se han tratado residuos lignocelulósicos con ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido clorhídrico y ácido acético principalmente, con no muy buenos resultados. Esto se debe a que el ácido solubiliza las partes de los carbohidratos más fáciles de digerir, posiblemente las regiones amorfas, dejando una mayor proporción de lignina y de regiones cristalinas. El tratamiento de la paja de arroz con los ácidos antes mencionados a 130°C por 4 horas resulta en una disminución del crecimiento de Cellulomonas sp. con Alcaligenes faecalis (Han y Callihan, 1974).

Por otro lado se han tratado de aplicar procesos químicos semejantes a los empleados en la producción del papel, donde a la vez se aplican tratamientos alcalinos y ácidos. Actualmente se tiene en estudio una técnica de reacción para la producción de celulosa y lignina (Bartolomé, 1980) donde, se emplean temperaturas entre 60 y 70°C a presión ambiental y se reporta la posibilidad de emplear todo tipo de material lignocelulósico, desde maderas suaves y duras hasta esquilmos agrícolas. Sin embargo esta técnica de reacción sigue siendo cara para obtener celulosa y lignina puras y más aún todos los productos que de ellas se puede derivar.

Tratamiento con agentes oxidantes.

Por la estructura alcohol polihídrica de la celulosa, ésta puede reaccionar con agentes oxidantes y de ésta forma cambiar su estructura. Se ha observado que con la mayoría de los agentes oxidantes, la reacción ocurre únicamente en las regiones amorfas.

Usando cloro gaseoso, hipoclorito de calcio, hipoclorito de sodio y clorato de potasio se encontró que bajo condiciones anaeróbicas, el hipoclorito de calcio aumentó la digestibilidad de la cáscara de cacahuate de 25 a 40%. El clorito de sodio redujo el contenido de lignina en un 40.50%, el hipoclorito de sodio y los cloruros orgánicos redujeron a 85% los componentes de la pared celular. (Sánchez, 1976).

Sin embargo, resultados menos satisfactorios se han obtenido al tratar bagazo de caña con diferentes agentes oxidantes, como hipoclorito de sodio, bromato de potasio, permanganato de potasio, tiosulfato de potasio, yodato de potasio y clorato de potasio. El tratamiento no resultó en un aumento en el crecimiento de bacterias celulolíticas sobre el bagazo (Han y Callihan, 1974).

4.3 PROCESOS ENZIMATICOS.

Un tratamiento enzimático sobre el material lignocelulósico es muy conveniente ya que el proceso se simplifica y el rendimiento se mejora. De las enzimas que intervienen en la degradación del material lignocelulósico, las celulasas han sido las más estudiadas. La conversión enzimática de la celulosa es catalizada por un sistema multienzimático.

(Sternberg, Vijayakumar y Reese, 1977). En la Tabla 1.8 se indican las tres enzimas principales que participan en este proceso.

Las enzimas que hidrolizan a la hemicelulosa se clasifican de acuerdo a la especificidad hacia el sustrato. Enzimas que degradan xilanos incluyen las (1-4)-beta-xilanasas, -beta-D-xilosidasas, -alfa-L-arabinosidasas y alfa-D-glucuronidasas. El complejo enzimático capaz de degradar los mananos de la pared celular de los vegetales incluye (1,4)-D-mananasas, -D-manosidasa, -D-glucosidasas y -D-galactosidasas. Las hemicelulasas son enzimas constitutivas, generalmente producidas por organismos celulolíticos que crecen sobre material celulósico. Su síntesis se puede reprimir sobre sustratos hemicelulósicos. En contraste, las celulasas son enzimas inducibles sintetizadas sobre sustratos como: celulosa, celobiosa, lactosa, etc., pero son fuertemente inhibidas por glucosa (Dekker y Lindner, 1979).

Trichoderma viride es el organismo más estudiado para la producción de celulasas, de tal forma que es posible obtener estas enzimas a nivel industrial con buenos rendimientos. Sin embargo cuando el sustrato es un material lignocelulósico, se ha observado que la lignina impide de alguna manera que estas enzimas actúen (figura 1.8)

La forma en que la lignina es degradada no se conoce con certeza y sólo se han hecho postulados. Esto se describirá posteriormente (4.5)

Tabla I.8 ENZIMAS QUE PARTICIPAN EN LA DEGRADACION DE CELULOSA

| <u>ENZIMAS</u> | <u>PRODUCTO</u> |
|---|---------------------|
| ENDO - β - 1, 4- GLUCANASA O β - 1,4- GLUCAN GLUCANOHI DROLOSA | CELOBIOSA Y GLUCOSA |
| EXO - β -1, 4- GLUCANASA O β - 1, 4- GLUCAN CELOBIOHI DROLASA | CELOBIOSA |
| CELOBIOSA O β - GLUCOSIDASA | GLUCOSA |

116

Tabla I.8 ENZIMAS QUE PARTICIPAN EN LA DEGRADACION DE CELULOSA

| <u>ENZIMAS</u> | <u>PRODUCTO</u> |
|---|---------------------|
| ENDO - β - 1, 4- GLUCANASA O β - 1,4- GLUCAN GLUCANOHI DROLOSA | CELOBIOSA Y GLUCOSA |
| EXO - β -1, 4- .GLUCANASA O β - 1, 4- GLUCAN CELOBIOHI DROLASA | CELOBIOSA |
| CELOBIOSA O β - GLUCOSIDASA | GLUCOSA |

4.4 PROCESOS MICROBIOLÓGICOS

La degradación del material lignocelulósico ocurre en la naturaleza con diferentes cinéticas. La celulosa y hemicelulosa pueden ser degradadas rápidamente por una amplia gama de microorganismos, algunos de los cuales han sido estudiados detalladamente. La degradación de la lignina ocurre más lentamente por la acción de algunas bacterias y por cierto tipo de hongos principalmente de la clase basidiomicetos. Los hongos capaces de degradar lignina se han clasificado en hongos de la pudrición blanda, oscura y blanca, de acuerdo a su capacidad de degradación (Ander y Eriksson, 1978) (Tabla 1.9). Existen aproximadamente 1000 especies de hongos de la pudrición blanca y solo menos de 25 de ellos han sido estudiados como: Phanerochaete chrysosporium, Sporotrichum pulverulentum y Pleurotus ostreatus, entre otros.

La falta de estudios sobre los sistemas biológicos de degradación de la lignina se ha debido a la complejidad de los mecanismos con que la lignina es biodegradada y de los modelos experimentales para su estudio.

5. MECANISMOS DE BIODEGRADACION DE LA LIGNINA.

Uno de los principales factores que han dificultado el estudio de los mecanismos enzimáticos de la biodegradación de la lignina (Kirk y Connors y Zeikus, 1977) es la diferencia que existe entre su degradación y la

TABLA I.9 CLASIFICACION DE LOS HONGOS DEGRADADORES DE LIGNINA

| NOMBRE | CAPACIDAD DE DEGRADACION | |
|--|--------------------------|----------------|
| | <u>POLISACARIDOS</u> | <u>LIGNINA</u> |
| HONGOS DE LA PUDRICION suave | + + + | - |
| HONGOS DE LA PUDRICION obscura (Basidiomicetos, Ascomicetos) | + + + | +/- |
| HONGOS DE LA PUDRICION blanca (Basidiomicetos) | + + + | + + + |

de otros biopolímeros. En contraste a las proteínas, polisacáridos y ácidos nucleicos, la lignina no contiene unidades repetitivas unidas por enlaces fáciles de hidrolizar. Otro obstáculo ha sido el que su degradación es relativamente lenta. Por ello se ha tratado de encontrar las condiciones óptimas de cultivo bajo las cuales se efectúe una rápida degradación y se produzcan cantidades considerables de enzimas degradadoras de lignina, sin mucho éxito.

Debido a la dificultad en la obtención de enzimas purificadas capaces de degradar lignina, los mecanismos de biodegradación han sido estudiados observando los cambios que sufren compuestos similares al ser incubados con microorganismos degradadores de lignina. Dentro de los sustratos modelo más comunes se han empleado compuestos de bajo peso molecular con estructuras semejantes a las que contiene la lignina. También se han empleado ligninas extraídas de madera por diferentes procedimientos. Esta técnica ha sido mejorada al marcar con C^{14} los sustratos, lo que permite una identificación más clara de las transformaciones ocurridas (Haider y Trojanowski, 1975). Con la ayuda de estas técnicas Kirk y Chang (1974) observaron que el ataque por hongos de la pudrición blanca a la lignina de abeto ocasionó un incremento del contenido de grupos carboxilo totales, oxígeno, carboxilos insaturados y los carboxilos arílicos, así como una disminución del contenido de grupos metoxilo, hidroxilos alifáticos y fenólicos totales (Tabla 1.10). Estos cambios indican que la degradación de la lignina es un proceso esencialmente oxidativo. Por investigaciones espectrométricas Kirk y Chang (1975) concluyeron que los grupos carboxilo no aromáticos formados fueron principalmente insaturados y que estos no

TABLA I.10 CAMBIOS PRODUCIDOS EN LA LIGNINA DE ABETO POR EL HONGO DE LA PUDRICION BLANCA

(Kirk y Chang, 1974)

| PROPIEDAD | LIGNINA INTACTA | LIGNINA ATACADA POR HONGOS DE PUDRICION BLANCA |
|-------------------------------------|-----------------|--|
| P. M. DE UNIDADES DE C ₉ | 191.63 | 199.1 |
| CONTENIDO DE: | | |
| 1. HIDROXILOS TOTALES | 1.2 | 0.87 |
| 2. HIDROXILOS FENOLICOS | - | - |
| a) CONJUGADOS | 0.023 | 0.04 |
| b) TOTALES | 0.35 | 0.11 |
| 3. HIDROXILOS ALIEATICOS | 0.89 | 0.77 |
| 4. CARBONILOS CONJUGADOS | 0.073 | 0.17 |
| 5. GRUPOS CARBOXILOS * | 0.08 | 0.56 |
| 6. CARBONO | 62.59 | 58.34 |
| 7. HIDROGENO | 6.12 | 4.85 |
| 8. OXIGENO | 31.25 | 36.77 |
| * (Determinación Potenciométrica) | | |

se derivan de la cadena. Esto les indujo a concluir que los compuestos con grupos carboxilo alfa y beta insaturados son producidos al abrirse el anillo aromático y dado que la lignina degradada no contiene compuestos de bajo peso molecular se deduce que la ruptura del anillo aromático ocurre mientras permanece unido al polímero.

Los estudios realizados por Haider y Grabbè (1967) apoyan lo anterior, ya que al utilizar un polímero dihidrogenado marcado encontraron que la ruptura del anillo aromático ocurre más rápidamente que la ruptura del lado de la cadena. De igual forma una disminución en el número de anillos aromáticos fue detectada por estudios espectroscópicos (Kirk y Chang, 1975). Basándose en estos resultados y en los obtenidos al estudiar los compuestos de bajo peso molecular con estructuras semejantes a la lignina, Kirk, Connors y Zeikus (1977) sugirieron el siguiente modelo de degradación de lignina por hongos de la pudrición blanca:

Las unidades fenólicas en varias regiones expuestas del polímero de la lignina son oxidadas a unidades difenólicas por demetilación y probablemente por hidroxilación aromática. Las unidades dihidroxi son hidrolizadas oxidativamente produciendo residuos ricos en carboxilos alifáticos, los cuales son degradados más tarde con liberación de productos alifáticos. Estos entran después a la hifa fúngica donde son metabolizados intracelularmente. Así nuevos grupos fenólicos son liberados en forma gradual para un ataque posterior (Kirk y Chang, 1975).

Dado que la lignina es un polímero sumamente complejo, de gran tamaño y que se encuentra íntimamente unido a otros polímeros de los tejidos vegetales, el equipo enzimático degradador de lignina debe actuar extracelu-

larmente (Kirk, Connors y Zeikus, 1977). Estas enzimas deben por lo tanto, encontrarse extracelularmente o bien, unidas a las paredes del micelio fúngico de tal forma que el contacto con la capa externa del polímero de la lignina sea posible (Kirk, 1975).

En estudios realizados por Eriksson y Vallander (1975), Eriksson y Hiroi (1976) se ha encontrado que las enzimas que degradan la celulosa son secretadas en forma similar.

De acuerdo a los cambios observados en la tabla 1.10 es posible visualizar varios tipos de mecanismos enzimáticos probablemente involucrados en la degradación de lignina. Los principales estarían representados por enzimas que causan demetilación, enzimas que hidrolizan enlaces arilglicerol-beta-arileter y oxigenasas. Además de esto, se ha comprobado recientemente que las fenol oxidasas y la enzima celobiosa: quinona oxidoreductasa tiene una participación muy importante en la biodegradación de la lignina.

A continuación se presenta una breve descripción de estas actividades enzimáticas y las enzimas probablemente asociadas a ellas.

5.1 ENZIMAS QUE CAUSAN DEMETILACION.

Observando los cambios producidos durante la incubación de lignina de abeto por hongos de la pudrición blanca (Tabla 1.10) los grupos metoxilo disminuyen en la lignina degradada mientras que los grupos hidroxilo e hidrógeno se incrementa. Estos cambios involucran por lo tanto un paso demetilante asociado a la degradación de la lignina.

Las enzimas que pueden causar esta demetilación son: mono-oxigenasas y dos tipos de fenol oxidasa, la peroxidasa y la lacasa. Las mono-oxigenasas requieren de cofactores tales como NADP y GSH (Fukuzumi, Takatuka y Minami, 1969) lo cual indica poca probabilidad de que se encuentren extracelularmente. Kirk y Chang (1975) analizaron los productos obtenidos al incubar lignina aislada de madera de abeto con Polyporus versicolor.

El análisis mostró una disminución del 25% en el contenido de metoxilos. Al incubar lignina de madera molida de maple con lacasa purificada de Polyporus versicolor, se registró la liberación de pequeñas cantidades de metanol como resultado de la demetilación (Ishihara y Miyazaki, 1974), esto indica la necesidad de una actividad demetilante para que se lleve a cabo la degradación de la lignina debido al alto número de grupos metoxilo sobre la estructura intacta.

De acuerdo al modelo de degradación de lignina por hongos de la pudrición blanca sugerido por Kirk, Connors y Zeikus (1977) que sugiere que las unidades fenólicas de la lignina son convertidas a unidades difenólicas, se establece que la demetilación es probablemente el primer paso en la preparación del anillo aromático para su ruptura.

5.2' ENZIMAS QUE HIDROLIZAN ENLACES ARIL GLICEROL-BETA-ARIL-ETER.

Se han obtenido resultados que indican que los hongos de la pudrición blanca producen enzimas capaces de hidrolizar enlaces aril glicerol-beta-aril éter en lignina (Ishikawa, 1966) reportándose que estas enzimas son dependientes de NADH. Al incubar Poria subácida en lignina de a-

beto (Hata, 1966) se obtuvo ácido vanílico a partir de alcohol coniferílico como resultado de la hidrólisis del enlace aril-glicerol-beta-aril éter.

5.3 OXIGENASAS

De acuerdo a los cambios producidos durante la incubación de lignina de abeto con hongos de la pudrición blanca (Tabla 1.10) se observa que el contenido de oxígeno de la lignina degradada es mayor que el de la lignina intacta, existiendo además una mayor proporción de grupos oxidados tales como carbonilo y carboxilo. En base a estos cambios Kirk y Chang (1974) llegaron a la conclusión del requerimiento de enzimas que puedan introducir oxígeno en la molécula de lignina. Algunas de las enzimas que intervienen en estos mecanismos de oxidación son: mono-oxigenasas y dio-oxigenasas.

En la lignina las unidades fenólicas son convertidas oxidativamente a unidades difenólicas por demetilación y probablemente por hidroxilación aromática, por lo que se deduce que la hidroxilación de anillos aromáticos en lignina por mono-oxigenasas puede ser un paso importante en la preparación del anillo para su ruptura posterior. Las mono-oxigenasas catalizan la incorporación de un átomo de oxígeno a la molécula del sustrato. El otro átomo de oxígeno es reducido a H_2O en la presencia de un donador electrónico apropiado (DH_2) tal como NADH, NADPH, ácido tetrahydrofólico, ácido ascórbico entre otros. Esta reacción se puede representar de la forma siguiente:



Después de la reacción de mono-oxigenación, el sustrato es más soluble en agua y el anillo puede abrirse por la acción de las dioxigenasas. Se ha reportado que los anillos aromáticos con o sin grupos metoxilo pueden ser hidrolizados por mono-oxigenasas y dar origen a orto-difenoles (Hayaishi, 1974). Se ha encontrado principalmente actividad de mono-oxigenasas en bacterias, algunos hongos de la pudrición blanca y café también la presentan (Dagley, 1971).

Las dioxigenasas incorporan ambos átomos de una molécula de oxígeno al sustrato (X) pudiéndose representar esta reacción de la siguiente manera.



Las dioxigenasas pueden causar una ruptura del anillo aromático de dos formas. Las uniones C-C de grupos hidroxilo adyacentes pueden ser atacados, ocasionando ruptura intradiol o denominada ruptura orto o 3-4. Pueden también actuar entre uno de los átomos de carbono con grupo hidroxilo y el siguiente átomo de carbono, ocasionando una ruptura extradiol denominada ruptura meta, 2-3 o 4-5. Esta reacción se representa en la figura 1.11. Algunas evidencias indican que los hongos son unicamente capaces de causar una ruptura intradiol del anillo aromático (Stainer y Ornston, 1973; Hayaishi, 1974). Asimismo se ha sugerido que las dioxigenasas atacan solo unidades difenólicas para sustituidas con un grupo carboxilo libre en la cadena alifática y que la actividad de la enzima decrece al aumentar la longitud de la cadena (Cain, Bilton, 1968). El tipo de sustituyente de la cadena influye también sobre la forma de ruptura, orto o meta fisión (Jonansson y Hägerby, 1974). Hasta la fecha no se ha reportado ningún estudio sobre purificación y caracterización de dioxigenasas

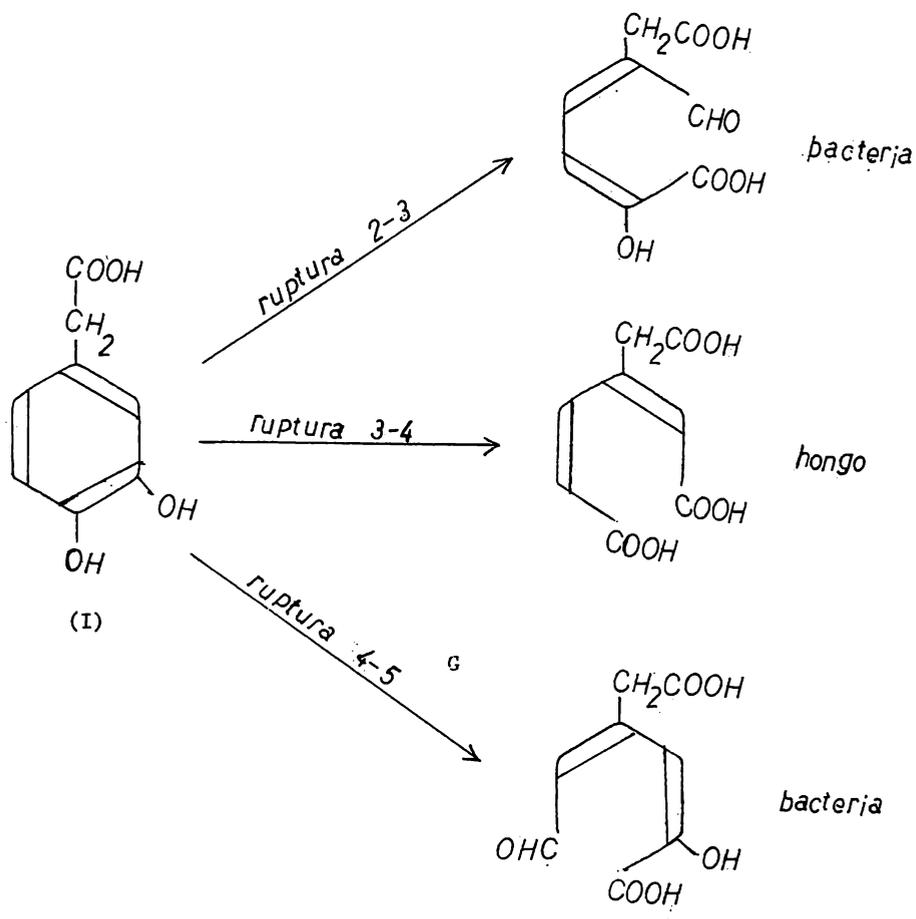


FIGURA I.11 Ruptura del ácido homoprotocatecúrico por bacterias y hongos.
(Stainer y Ornston, 1973)

por hongos de la pudrición blanca, sin embargo; usando compuestos de bajo peso molecular marcados radioactivamente con estructuras semejantes a las que se encuentran en la lignina, se ha estudiado la presencia de esta actividad enzimática en hongos de la pudrición blanca. Haraguchi (1968) reportó que al incubar ácido benzoico marcado con Polystriectus sanguineus el $C^{14}O_2$ liberado procedía del anillo. Similarmente Haider y Trojanowski (1975) y Kirk, Connors, Blean y Zeikus (1975) incubaron el hongo de pudrición blanca Pleurotus ostreatus con un polímero dihidrogenado marcado en el anillo con C^{14} obteniéndose una liberación del 15% de la radioactividad como $C^{14}O_2$ en 25 días.

5.4 FENOL OXIDASAS

La lignina es un polímero de unidades fenólicas y su biosíntesis es catalizada por las fenol oxidasas (Harkin, 1976; Sarkanen y Ludwig, 1971; Higuchi, 1971) que inducen la formación de radicales libres, los que posteriormente se polimerizan por reacciones químicas aleatorias. Curiosamente, la degradación de la lignina es un proceso oxidativo catalizado también por fenol oxidasas. La formación de radicales libres de tipo fenoxi por la acción de fenol oxidasas induce la ruptura del enlace entre el anillo aromático y la cadena de propano, estructura típica de los monómeros de lignina (Ander y Eriksson, 1976). La forma específica del funcionamiento de esta enzima y su relevancia en la degradación de la lignina todavía no se conoce con detalle. Existen tres tipos principales de fenol oxidasas, la tirosinasa, la lacasa y peroxidasa y toda ella son producidas

en diferente grado por los microorganismos capaces de atacar a la lignina.

La tirosinasa (O_2 : orto difenol oxido reductasa) es una enzima que contiene cobre y que participa tanto en la monohidroxilación de fenoles, produciendo orto difenoles u orto quinonas así como en la oxidación de catecoles a orto quinonas. La tirosinasa se encuentra presente en diferentes quinonas. La tirosinasa se encuentra presente en diferentes tipos de hongos (Vanneste y Zuberbühler, 1974). Lyr (1958) identificó que entre 154 especies de hongos degradadores de madera solo 4 producían tirosinasa extracelular, mientras que 62 de estos hongos contienen grandes cantidades de tirosinasa en el micelio, lo que indica una importancia mínima de la tirosinasa en la degradación de lignina.

La lacasa (O_2 : difenol oxido reductasa) y la peroxidas oxidan orto y para difenoles produciendo quinonas (figura 1.12) Un paso intermedio de esta reacción involucra la producción de un radical libre y de un ión hidrógeno que se desprende del grupo hidroxilo del sustrato fenólico. Como resultado de la reacción se produce un radical ariloxi que fácilmente puede deslocalizar la carga formándose así una variedad de formas resonantes. La lacasa puede actuar también sobre los meta difenoles, su afinidad por ellos depende de una estructura molecular especial de la enzima (Scháněl y Esser, 1971).

Ander y Eriksson (1976) demostraron por medio del estudio de cepas mutadas de hongos de la pudrición blanca que las fenol oxidasas son esenciales para que la degradación de lignina se efectúe. Primeramente produjeron mutantes que carecían de fenol oxidasas, que al ser incubadas con lignocel-

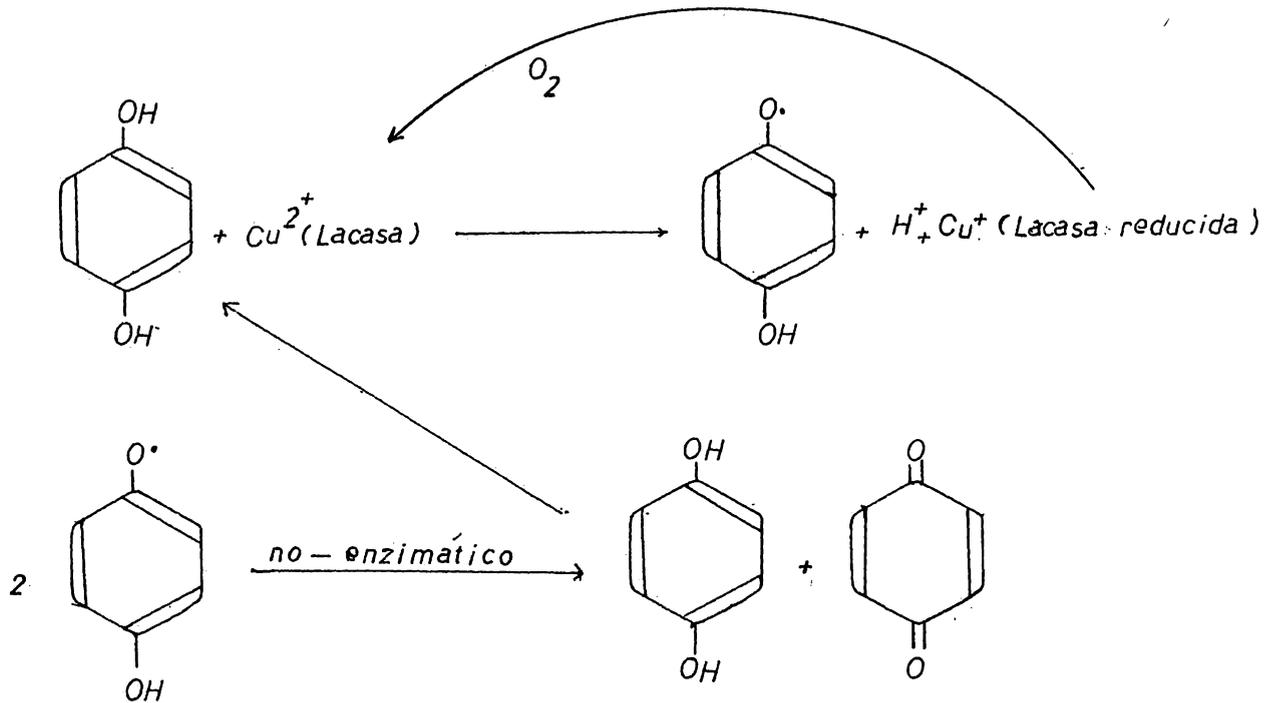


Fig. I.12 FORMACION DE UN RADICAL ARILOXI DE HIDROQUINONA (Schänel y Esser, 1975)

lulosa de madera resultaron ser incapaces de atacar a alguno de los componentes de la lignocelulosa; es decir las cepas mutantes habían perdido la habilidad de degradar tanto la lignina como la celulosa y hemicelulosa. Por dos alternativas diferentes fue posible que la cepa mutante adquiriera nuevamente la capacidad perdida para degradar a todos los componentes de la lignocelulosa, tal y como lo realizaba la cepa silvestre original. La primera alternativa consistió en someter a la mutante a una nueva mutación con el objeto de obtener a una revertante, es decir, producir a partir de la mutante una nueva cepa mutante con características similares a la cepa silvestre original. La revertante obtenida producía nuevamente fenol oxidasas y era capaz de degradar a todos los componentes del sustrato lignocelulósico. La segunda alternativa consistía en agregar la casa purificada al incubar la mutante que no producía fenol oxidasas con el sustrato lignocelulósico, esto le permitía a la mutante degradar a la lignina y a los otros componentes de la lignocelulosa en forma similar a la cepa silvestre original. Esta información demostró la absoluta necesidad de la presencia de las fenol oxidasas para que se efectúe el proceso de degradación de la lignina.

Un segundo aspecto de importancia relacionado con las fenol oxidasas es la identificación del papel regulatorio que ellas ejercen sobre otros sistemas enzimáticos involucrados en la biodegradación de las lignocelulosas (Eriksson, 1977). Ander y Eriksson (1976) estudiando el mismo tipo de mutantes observaron que la producción de celulasas y xilanasas en la mutante que no producía fenol oxidasas era inhibida por la presencia de compuestos fenólicos, mientras que en ausencia de fenoles la mutante produ-

cía cantidades normales de endo 1,4 β glucanasas, la adición de lacasa a los sustratos de celulosa en donde se tiene lignina presente, permitía que la mutante nuevamente iniciara la producción de endo 1,4 β glucanasas:

5.5 CELOBIOSA: QUINONA OXIDOREDUCTASA

Westermarck y Eriksson (1974) descubrieron una nueva enzima degradadora de lignina al incubar P. versicolor en placas de lignina suplementadas con glucosa, con celobiosa o con celulosa y determinaron que la presencia de la celulosa inhibía la formación de las estructuras cromóforas que normalmente se producen por la acción de las fenol oxidasas. Posteriormente se determinó que este efecto se debía a la producción de una enzima extra celular denominada celobiosa: quinona oxidoreductasa. Esta enzima en presencia de celobiosa inhibía el acoplamiento de los radicales fenoxilicos producidos por la acción de la lacasa, previniéndose de esta forma reacciones de polimerización. La enzima es una flavoproteína con FAD como grupo prostético.

En estudios realizados con S. pulverulentum (Westermarck y Eriksson, 1974) se demostró que la celobiosa: quinona oxidoreductasa cataliza reacciones de oxido-reducción, con la reducción de una quinona a su fenol correspondiente conjuntamente a la oxidación de la celobiosa a ácido celobiónico a través de celobiono- δ -lactona. Esto indica una necesaria actividad simultánea de la celobiosa: quinona oxidoreductasa y las enzimas celulolíticas. La especificidad de esta enzima por cada uno de los dos tipos de sustratos que utiliza es diferente. En lo que respecta a los carbohidratos

tos, tiene una alta especificidad por la celobiosa y no muestra actividad con ningún otro mono o disacárido. Con las quinonas la acción de la enzima no es tan específica, teniendo la capacidad para reducir tanto orto como para quinonas. En la figura 1.13 se presenta la acción de la celobiosa: quinona oxidoreductasa así como su acoplamiento a la actividad de la lacasa. En estudios realizados con Chrysosporium lignorum se ha visto que esta enzima es producida conjuntamente con las enzimas celulolíticas (Westermarck y Eriksson, 1974). La importancia de la enzima celobiosa para la degradación de lignina fue estudiada por Eriksson y colaboradores usando el hongo Pleurotus ostreatus (Hiroi y Eriksson, 1976), encontrándose que la degradación de lignina fue favorecida en todos los casos por la presencia de la celulosa. Se observó que los lignosulfonatos fueron polimerizados más en medios donde la celulosa no estaba presente que en un medio -- conteniendo celulosa, sugiriéndose que ello fue debido a la acción de la enzima celobiosa: quinona oxidoreductasa. Además, las quinonas inhiben a las enzimas que causan ruptura de anillos (Bilton y Cain, 1968), la reducción de quinonas a fenoles puede por lo tanto incrementar la degradación de la lignina.

Se ha demostrado que la enzima celobiosa: quinona oxidoreductasa es producida por veinticinco diferentes hongos de pudrición blanca (Ander y Eriksson, 1975), variando la cantidad de enzima producida entre los diferentes organismos. Por otro lado, se ha determinado que esta enzima no es producida por los hongos de la pudrición oscura, los cuales no poseen la capacidad de causar cambios sustanciales en la lignina. Muchos de estos resultados sugirieron que la celobiosa: quinona oxidoreductasa sería

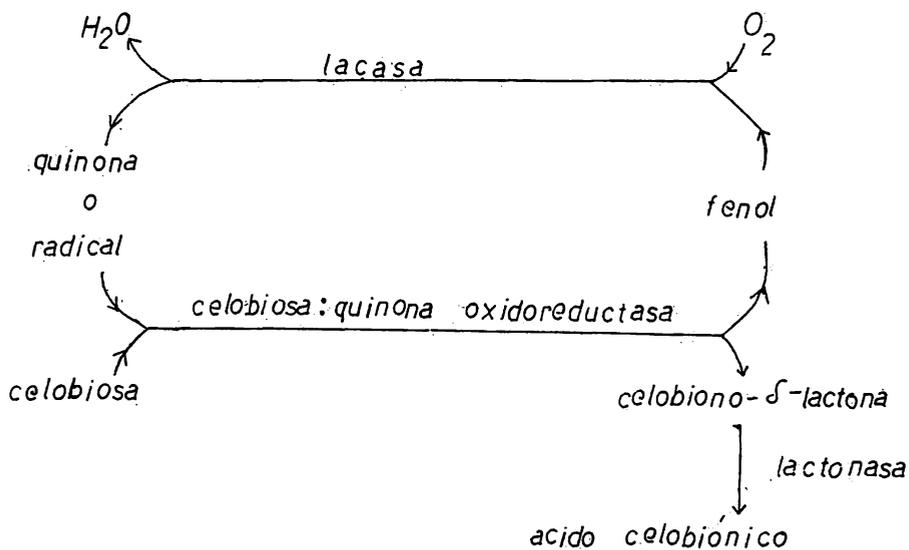


FIG. I.13 REACCIONES CATALIZADAS POR LA CELOBIOSA: QUINONA OXIDOREDUCTASA (WESTERMARK Y ERIKSSON, 1974)

indispensable para que se efectuara la degradación de la lignina. Esto significaría que la degradación de lignina debería ocurrir simultáneamente con una degradación de celulosa. Afortunadamente Ander y Eriksson - (1975) demostraron que esto no era cierto por medio de estudios con mutantes que carecían de celulasas. Estas al ser incubadas en diferentes materiales lignocelulósicos resultaron ser capaces de degradar lignina sin la producción de celulasas ni de la enzima celobiosa: quinona oxidoreductasa.

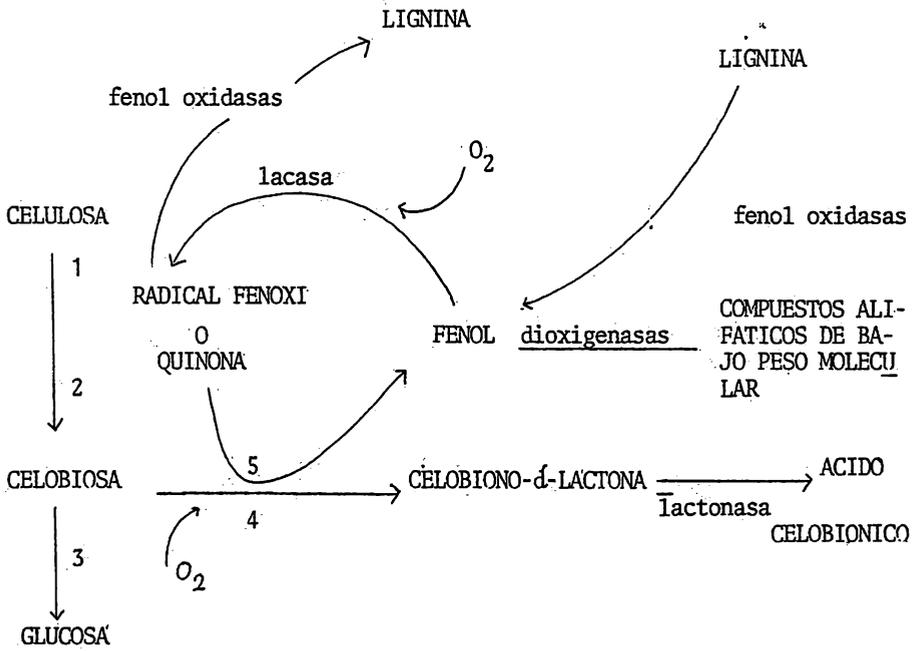
La función más importante de la celobiosa: quinona oxidoreductasa en la degradación de los materiales lignocelulósicos es según Westermarck y Eriksson (1974) la oxidación de los carbohidratos. Tal suposición está fundamentada en que la celobiosa: quinona oxidoreductasa es inducida por la celulosa y materiales celulósicos y es producida simultáneamente con las enzimas celulolíticas. La celobiosa: quinona oxidoreductasa parece tener también una alta especificidad por la celobiosa la cual es un producto abundante de la degradación de la celulosa.

Los hongos de la pudrición blanca degradan simultáneamente la celulosa y la lignina de los materiales lignocelulósicos mediante un procedimiento multienzimático. La degradación hidrolítica de la celulosa se realiza a través de la acción concertada de 2 tipos de enzimas: las endo 1,4-beta-glucanasas atacan aleatoriamente los enlaces 1,4 glucosídicos de la cadena de celulosa; la exo, 1,4-beta-glucanasa ataca el lado no reductor de la celulosa produciendo unidades de celobiosa o glucosa; la celobiosa puede ser oxidada a ácido celobiónico por la acción de la celobiosa:quinona oxidoreductasa.

Esta reacción parece ser de una importancia fundamental para los hongos que atacan a la lignocelulosa, ya que se lleva a cabo conjuntamente con la reducción de quinonas y/o radicales fenoxi. Tanto las quinonas como los radicales fenoxi son producidos por la acción de las fenol oxidasas durante la degradación de la lignina. Dado que las quinonas inhiben la actividad de las dioxigenasas, y por lo tanto impiden la oxidación de fenoles, la acción reductora de la celobiosa: quinona oxidoreductasa sobre las quinonas ocasiona que se mantenga una alta concentración de grupos fenólicos y baja concentración de quinonas. Esto permite una mayor acción de las enzimas oxidativas sobre las estructuras fenólicas y por consiguiente favorece la degradación de la lignina. En la figura 1.14 se muestra el diagrama donde se integrará todo el procedimiento multienzimático de la degradación de la lignocelulosa.

6. LA DEGRADACION DE LIGNINA POR MICROORGANISMOS

Como ya se mencionó, los recursos lignocelulósicos son de gran importancia, ya que debido a su gran cantidad de celulosa y hemicelulosa, son una fuente potencial de materia prima para diversos usos. Sin embargo la presencia de lignina impide su buen aprovechamiento. Se ha hecho referencia (4.1 y 4.2), a la ineficacia de los diversos procesos fisicoquímicos probados para la eliminación de lignina. Por lo tanto, sabiendo que existen microorganismos específicos, capaces de degradar lignina, se realizó un estudio bibliográfico sobre ello.



- 1.- Endo-1,4- -glucanasa
- 2.- Exo-1,4- glucanasa
- 3.- 1-4- glucosidasa
- 4.- Celobiosia oxidasa
- 5.- Celobiosia: quinona oxido-reductasa.

Fig. 11.4 Mecanismo enzimático para la degradación de celulosa y su regulación extracelular en *Sporotrichum pulverulentum* hongo de la pudrición blanca. (Eriksson, 1977).

Los únicos organismos capaces de atacar a la lignina son los llamados hongos de la pudrición blanca y oscura, aunque existen también algunas bacterias capaces de romper ciertos tipos de enlaces, que se sabe están presentes dentro de la molécula de lignina. (Greaves, 1971; Kawakami, 1976). Los hongos capaces de atacar a la lignocelulosa se han dividido en tres grupos, de acuerdo a las características que presentan los tejidos lignocelulósicos una vez que ha sido atacada. Estos son los hongos de la pudrición blanda, los hongos de la pudrición oscura y los hongos de la pudrición blanca. Los tres se caracterizan por establecerse en tejidos lignocelulósicos y tienen la capacidad de degradar uno o más componentes de la madera.

A continuación se discuten los resultados que se han obtenido en diversos estudios sobre la capacidad de ataque a la lignocelulosa por cada uno de estos grupos de organismos.

6.1 BACTERIAS

Hasta la fecha, existen muy pocas observaciones que indiquen que las bacterias son capaces de degradar y utilizar la lignina.

Estas se basan principalmente en la habilidad que poseen ciertos grupos de bacterias para romper enlaces beta-aril-glicerol, los que representan de un 30 a 50% de uniones entre las unidades de fenil propano.

Algunos ejemplos de bacterias con estas capacidades son: Pseudomonas ovalis (Kawakami, 1975; 1976), Arthrobacter sp (Cartwright y Holdom, 1973) Nocardia corallina (Kirk, 1973).

Un factor que en la naturaleza posiblemente limite su acción, es la falta de movilidad de las bacterias sobre el sustrato lignocelulósico, en comparación con la acción penetrante de las hifas de los hongos.

6.2 HONGOS DE LA PUDRICION BLANDA

Por la acción de los hongos de este grupo se forma una superficie blanda característica sobre la lignocelulosa atacada. Numerosos estudios se han efectuado con este tipo de hongos en los últimos años (Nilsson, 1974; Wilcox y Nicholas, 1973; Kaarik, Dickinson y Pugh, 1974; Kirk, 1971) observando que su ataque sobre los tejidos vegetales lignocelulósicos, puede ocurrir de las dos siguientes formas:

- a) La pared celular secundaria de la madera es atacada, formando en ella cavidades cilíndricas con terminaciones cónicas.
- b) Las paredes celulares pueden ser erosionadas empezando por las células del lumen (figura 1.1)

Se ha visto que los hongos de la pudrición blanda pueden degradar lignina hasta cierto punto, especialmente en el caso de las maderas duras. Ellos son capaces de causar una demetilación de la lignina, por lo que posiblemente degraden los lados terminales y los anillos aromáticos, aunque esta degradación es lenta. (Eslyn, Kirk, Effland, 1975).

6.3 HONGOS DE LA PUDRICION OSCURA

Este tipo de hongos atacan principalmente a los polisacáridos en la

madera, aunque también causan una ligera pérdida de lignina. El cambio más notorio que causan a la lignina es una disminución del contenido de grupos metoxilo. Esto se debe, a que se produce una demetilación de la lignina, introduciendo también grupos alfa carbonilos en los lados terminales de la cadena de propano de la lignina. Por otro lado estos hongos no son capaces de metabolizar fragmentos de anillos aromáticos, pues carecen de un sistema enzimático eficiente para romper los anillos aromáticos. Una de estas enzimas faltantes de la celobiosa: quinona oxidoreductasa, por lo que el color café que toma la madera degradada se puede deber a la acumulación de quinonas. (Kirk, 1975).

El ataque de este tipo de hongos a la pared celular de la madera empieza con una metabolización de las sustancias de la capa S-2 en la pared secundaria. La capa S-1, la pared primaria y la laminilla media son por el contrario bastante resistentes a la degradación debido a su alto contenido de lignina. (Sarkanen y Helgert, 1971).

Algunos hongos de la pudrición café que han sido estudiados (Kirk y Highley, 1973) son Poria monticola, Lenzites trabea y Lentinus lepideus.

6.4 HONGOS DE LA PUDRICION BLANCA

Los hongos de la pudrición blanca, son capaces de atacar tanto a la lignina como a los polisacáridos de la madera, es decir la celulosa y hemicelulosa. En base a la capacidad de los hongos de la pudrición blanca por atacar a los diferentes componentes de la lignocelulosa, se les ha clasificado en dos diferentes grupos (Kirk, 1970:)

a) Los que degradan los tres componentes de la madera (celulosa, hemicelulosa y lignina) simultaneamente. Organismos de este tipo son: Polyporus versicolor y Lentinus nigripes.

b) Aquellos organismos en los que la degradación de lignina es más rápida, que la degradación de celulosa y hemicelulosa. Organismos de este tipo son: Polyporus berkeleyi, Fomes ulmarius y Pleurotus ostreatus.

La secuencia con la que los diferentes componentes de la madera son atacados, varía de acuerdo al estado de avance de la degradación (Kirk, 1973). En algunos estudios realizados se ha visto que la degradación de lignina se presenta antes de la descomposición de celulosa en las regiones con bajo contenido de lignina de la pared secundaria. En cambio, cuando el ataque alcanza las partes ricas en lignina, las cinéticas de degradación, son similares (Kirk, 1970). Es cuestionable aún si hay una absoluta especificidad de ataque en la lignina por hongos silvestres. Lo que se acepta es que se necesita energía para degradarla (Kirk, 1975) y que esta degradación y su metabolización es principalmente un proceso oxidativo - (Kirk, 1971).

6.5 PLEUROTUS OSTREATUS

De los microorganismos mencionados anteriormente, únicamente este último grupo, o sea, los hongos de la pudrición blanca, son los que ofrecen una potencialidad para el desarrollo de un proceso industrial de delignificación, ya que son los que degradan lignina en mayor medida, y tienen una selectividad sobre este sustrato.

Dé debate a que algunos de ellos son comestibles, las potencialidades para su uso industrial son mucho mayores ya que se evitarían posibles problemas toxicológicos.

Una vez delignificado se podría pensar en la utilización del material, en el área de alimentación animal ya que se tendrá prácticamente celulosa y hemicelulosa disponibles. Este hongo el cual no patógeno ni parásito se consume ampliamente en Europa, por lo que no hay problema de toxicidad con los animales.

Un hongo que además de reunir las ventajas anteriores presenta otras más para que sea utilizado en una delignificación selectiva es Pleurotus ostreatus. Este es un hongo de pudrición blanca, degradador selectivo de lignina, que es comestible y se ha cultivado comercialmente, a gran escala durante largo tiempo, por lo que existe tecnología para su cultivo a escala industrial. Así mismo, Pleurotus ostreatus es uno de los hongos de pudrición blanca que ha sido más estudiado genéticamente (Leal, 1980). De estos estudios se ha concluido que es fácil de manipular genéticamente. El mejoramiento de cepas es por simples hibridaciones y la obtención de mutantes son fáciles de llevar a cabo.

Los parámetros de cultivo indican que es fácil de cultivar y no requiere de esterilización el sustrato.

Las condiciones óptimas para el desarrollo de Pleurotus ostreatus son:

- a) Temperatura.- El micelio puede crecer de 5 a 30°C, siendo su temperatura óptima de 30°C (D.S.Kim, 1980).
- b) Humedad.- Durante el crecimiento del micelio, la humedad óptima es 70% en casos de cultivo (D.S. Kim, 1980).

c) Aereación.- Para el crecimiento del micelio no es necesaria la aereación. Se ha observado que una concentración de CO₂ menor de 28% (volumen) en el aire, estimula el crecimiento de Pleurotus ostreatus (D.S. Kim, 1980).

d) Luz.- No es necesaria durante el crecimiento miceliar (D.S. Kim, 1980).

Pleurotus ostreatus pertenece a la clase de los basidiomicetos. Los basidiomicetos se diferencian de los demás hongos en que producen sus esporas, llamadas basidiosporas, en la parte externa de una estructura especializada productora de esporas, el basidio. Las basidiosporas son generalmente uninucleadas y haploides y estas son resultantes de cariogamia y meiosis. El micelio de la mayoría de los basidiomicetos pasa por tres estados distintos de desarrollo; primario, secundario y terciario, para que el hongo complete su ciclo de vida. El micelio primario generalmente se desarrolla a partir de la germinación de la basidiospora. Al principio puede ser multinucleado ya que el núcleo o los núcleos de la basidiospora se dividen muchas veces a medida que el tubo germinativo emerge de la espora y comienza a crecer. La fase multinucleada del micelio primario es corta porque pronto se forman los tabiques que dividen al micelio en células uninucleadas. En algunas especies la formación de tabique comienza una vez terminada la primera división de los núcleos de la espora de modo que el micelio primario es tabicado y uninucleado desde el principio. El micelio secundario se origina del micelio primario. Las células son típicamente binucleadas. El estado binucleado comienza cuando se fusionan los protoplastos de dos células uninucleadas, sin que haya cariogamia

después de la plasmogamia. La célula binucleada que así se forma produce una rama a la cual emigra el par nuclear; los dos núcleos se dividen conjugadamente y los núcleos hermanos se distribuyen en las dos células hijas para iniciar así el micelio binuclear. El micelio terciario está representado por los tejidos especializados que se originan para formar los esporóforos de los basidiomicetos superiores. Las células del micelio terciario son binucleadas.

Los basidiomicetos superiores producen sus basidios en cuerpos fructíferos altamente organizados de varios tipos. El basidio se origina como célula terminal en una hifa binucleada y se halla separado de la misma por un tabique a cuyo lado generalmente se encuentra una fíbula. Al principio el basidio es angosto y corto, pronto se agranda y se hace más ancho. En tanto tienen lugar estos cambios externos, dentro del basidio joven se fusionan los dos núcleos (cariogamia) y el núcleo zigótico pronto sufre meiosis, dando lugar a cuatro núcleos haploides. Entre tanto, emergen cuatro esterigmas en el extremo del basidio y sus extremos se agrandan para formar los esbozos de las basidiosporas. Los cuatro núcleos pasan a los jóvenes basidiosporas, que van a completar su desarrollo como células uninucleadas haploides.

La clase basidiomicetos se subdivide en dos subclases heterobasidiomicetos y homobasidiomicetos. En los primeros el basidio es septado, está profundamente dividido o puede hallarse formado por una espora perdurante de pared gruesa llamada teleutospora. En los homobasidiomicetos el basidio es simple.

II.- MATERIALES Y METODOS

1. CEPAS FUNGICAS

Pleurotus ostreatus es el hongo comestible de la pudrición blanca que fue seleccionado para la realización del presente estudio. La mayor parte de las cepas de P. ostreatus empleadas corresponden a las mejores cepas que se usan normalmente para el cultivo comercial de este hongo en Europa. Además se seleccionaron dos cepas de P. ostreatus que en estudios genéticos previos mostraron poseer características muy deseables; la cepa F-2 contiene el gen que le permite formar esporoforos a temperaturas mayores de 30°C, la cepa H₁-(8x3) x S₀-18 crece muy rápidamente y produce esporoforos fácil y abundantemente.

En la tabla II.1 se presenta una relación de las cepas utilizadas en el presente estudio, indicando sus principales características, así como las claves con que se manejan durante el presente estudio.

2. MEDIOS DE CULTIVO

2.1 MEDIO DE AGAR-MALTA PARA LA PROPAGACION VEGETATIVA

Para la preparación de 1 lt. de medio de cultivo de agar-malta, se pesan 15 g. de extracto de malta y 20 g. de agar, colocandolos a continuación en un matraz Erlenmeyer. Se añade entonces 1 lt. de agua destilada gradualmente, procurando disolver el material. Se tapa el matraz y se deja reposar durante 20 min. Posteriormente se esteriliza en autoclave a

TABLA II.1 CEPAS DE P. OSTREATUS UTILIZADAS EN EL PRESENTE ESTUDIO
CON SUS PRINCIPALES CARACTERISTICAS Y CLAVES CON QUE SE
MANEJARON

| CEPA | CARACTERISTICAS | CLAVE |
|---|--|---------|
| 1. P. OSTREATUS BRODD | Comercial | B |
| 2. P. OSTREATUS FLORIDA BRODD | Comercial | F.B |
| 3. P. OSTREATUS FLORIDA E | Comercial y la cepa mas estudiada fisiológicamente en investigaciones previas. | F-E |
| 4. P. OSTREATUS F-2 | Cepa capaz de fructificar a temperaturas mayores de 30°C | F-2 |
| 5. P. OSTREATUS H-1 GYURKO | Comercial | H-1 |
| 6. P. OSTREATUS PLEOS | Comercial | P |
| 7. P. OSTREATUS P.Q. | Comercial | P.Q. |
| 8. P. OSTREATUS P.V. | Comercial | P.V. |
| 9. P. OSTREATUS H ₁ (8 x 3) x S ₀ -18 | Híbrido obtenido por el Dr. H. Leal | (8 x 3) |

1.1 Kg/cm² durante 15 min. El medio esterilizado se vacía en cajas petri de vidrio de 10 cm. de diámetro o bien en botellitas de vidrio de 7 ml. de capacidad. Las cajas o botellitas con medio de agar son guardadas en bolsas de polietileno hasta su uso para evitar contaminaciones y deshidratación del medio.

2.2 MEDIO DE RASTROJO DE MAIZ

El medio con sustrato lignocelulósico fue utilizado para los experimentos de biodegradación. Los recipientes utilizados para este objeto fueron frascos vacíos de alimentación infantil de aproximadamente 100 ml de capacidad. En estos recipientes se pesaron 5 g. de rastrojo de maíz, agregándose a continuación 11.4 ml. de agua destilada, con lo que el material resultante obtenía una humedad de 71.4%. Los contenidos del envase fueron mezclados, tapándose los frascos en forma apropiada para posteriormente someterlos a un tratamiento térmico.

3. MATERIALES LIGNOCELULOSICOS

Se utilizaron los siguientes tipos de materiales lignocelulósicos:

- a) Rastrojo de maíz: obtenido del estado de Morelos, secado al sol y después en estufa a 50°C.
- b) Cascarilla de arroz: comprado en "Distribuidora de arroz el Rendidor" S.A. (Geranio 140-7, México 4, D.F.)

c) Bagazo de caña: conseguido en un puesto de jugo de caña en Carrillo Puerto, Coyoacán D.F. en donde la caña es pasada dos veces a través de dos rodillos, para extraerle el jugo, sin que posteriormente fuera enjuagada. Para extraerle el material soluble este material fue primeramente secado al sol y después en la estufa a 50°C.

d) Olote de maíz.

Todos los esquilmos antes mencionados, menos la cascarilla de arroz, se molieron en molino de martillos (micropulverizador con 9950 rpm máx). Posteriormente se tamizaron todos en mallas de 18-150 (en tamices Tyler), durante 5 min. con la ayuda de un tamizador. El material retenido entre estos dos tamices fue utilizado para los estudios de biodegradación. La selección de ese tamaño de partícula se hizo en base a estudios de tamizado y espacio vacío.

4. CONDICIONES DE CULTIVO E INOCULACION

4.1 INOCULACION Y PROPAGACION VEGETATIVA EN MEDIO DE AGAR-MALTA.

El inóculo para las cajas petri o las botellitas con medio de agar-malta se obtiene de la periferia de una colonia en crecimiento. El inóculo se toma cortando un cubito de agar de aproximadamente 5 cm. de lado, que se encuentre completamente penetrado por hifas y se coloca en el centro de la caja o de la botella. Después de la inoculación éstas son co-

locadas en bolsas de polietileno sellandolas posteriormente e incubadas a 28[±] 2°C.

4.2 INOCULACION Y CULTIVO PARA LOS ESTUDIOS DE BIODEGRADACION

Los inóculos para los experimentos de biodegradación fueron obtenidos de acuerdo al inciso anterior. Para cada recipiente con medio de rastrojo de maíz se utilizaron 7 inóculos en total. Tres de ellos fueron introducidos en el rastrojo de maíz, mezclandose los contenidos del recipiente con el asa micológica. Los cuatro restantes fueron colocados en forma equidistante en la superficie del rastrojo de maíz. Los frascos con rastrojo de maíz inoculado fueron incubados a 28[±] 2°C.

5. CONDICIONES EXPERIMENTALES PARA EL ESTUDIO DE LA DEGRADACION DE LA LIGNOCELULOSA POR P. OSTREATUS.

Los procedimientos para la preparación del sustrato, la inoculación y el cultivo que se siguieron en estos experimentos se encuentran descritas anteriormente. La toma de muestras (dos frascos por cepa) se hizo a los 20, 42 y 73 días de incubación para determinar los cambios en composición del sustrato. Para ello, el contenido de cada frasco fue primeramente secado a 55°C por toda una noche, determinandose por diferencia en peso el contenido de humedad del sustrato. A continuación la muestra seca fue molida en un mortero tomandose del material resultante las canti

dades correspondientes para efectuar las determinaciones de carbohidratos solubles, hemicelulosa, celulosa, lignina y cenizas (Figura II.1).

6. DETERMINACION DE CARBOHIDRATOS SOLUBLES, HEMICELULOSA Y CELULOSA

Procedimiento de 2 etapas:

1a. etapa.- Procedimiento de separación de los diferentes tipos de carbohidratos.

2a. etapa.- Consiste en la cuantificación por medio de la determinación de las cantidades totales de los principales monosacáridos (pentosas y hexosas) contenidos en cada uno de estos extractos.

6.1 METODOLOGIA DE EXTRACCION DE LOS POLISACARIDOS

A partir de los métodos de Deríaz (Deríaz, 1961) y el de Crampton-Maynard (1938) se desarrolló un nuevo método para la separación de estos polisacáridos. No se empleó el método de Deriaz como tal debido a que es muy largo y complicado, además presenta la desventaja de la pérdida consecuente de material disminuyendo así su exactitud (ver Apéndice No. 1) tampoco se empleó el de Crampton-Maynard debido a que hace uso de ácido acético y nítrico y estos ocasionaban dificultades considerables en la cuantificación posterior de hexosás.

A continuación se describe el procedimiento seguido en el presente estudio (Figura II.2)

FIGURA II.1 METODOLOGIA PARA EL ESTUDIO DE LA DEGRADACION DE LIGNOCELULOSA POR P. OSTREATUS

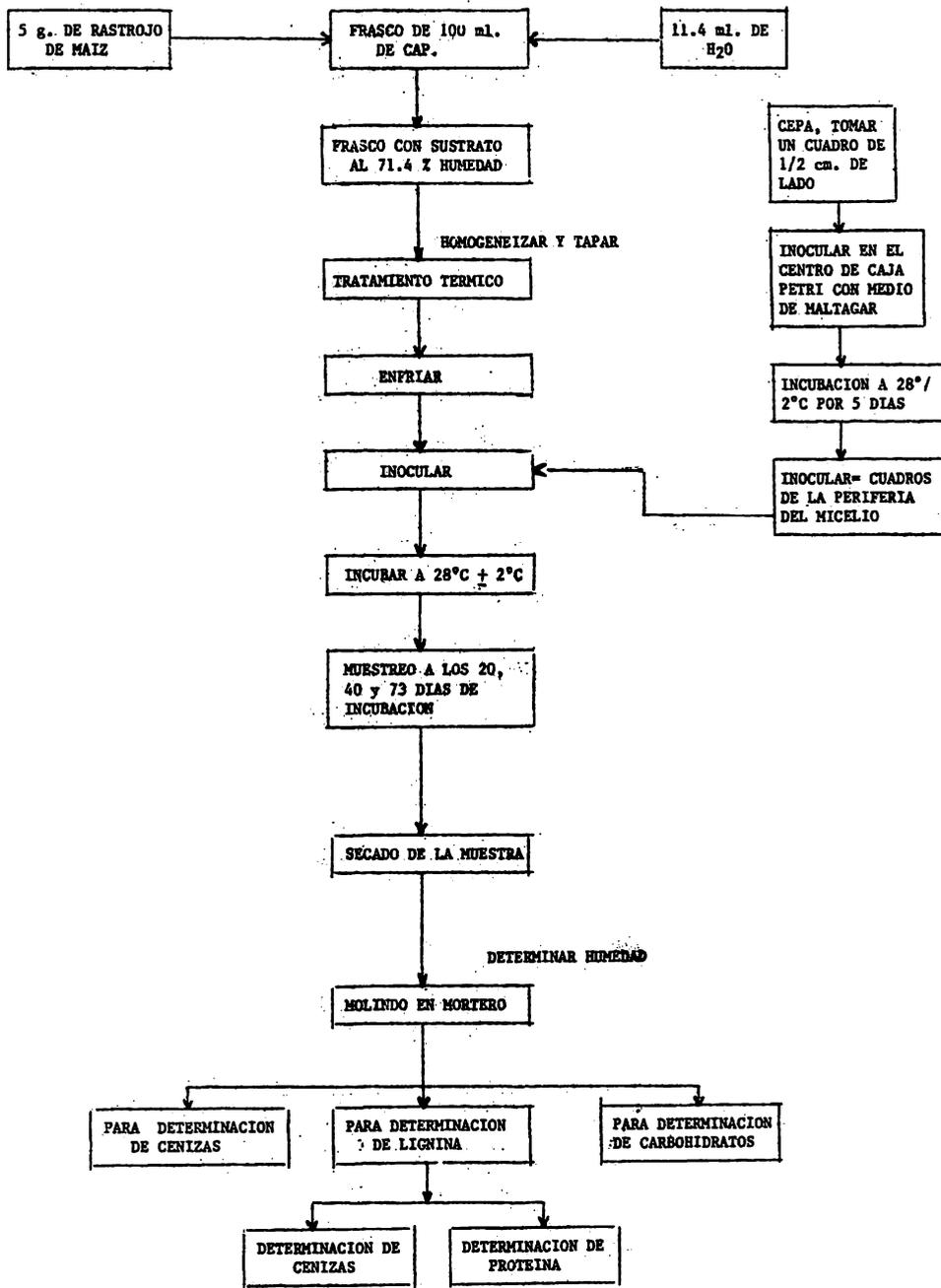
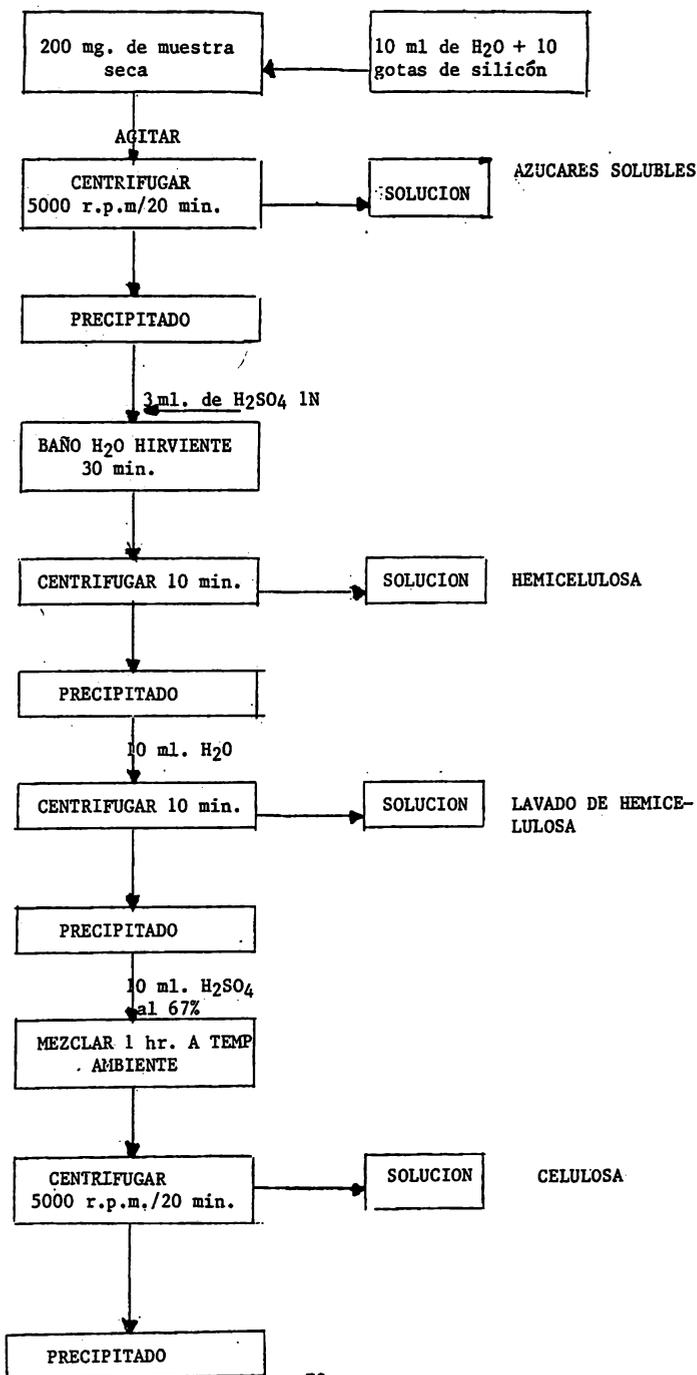


FIGURA II.2 METODOLOGIA PARA EL ESTUDIO DE LA EXTRACCION DE LOS POLISACARIDOS



Carbohidratos solubles.

En un tubo de centrifuga se pesan 200 mg. de muestra seca, agregándose con agitación 10 ml. de agua destilada y 10 gotas de grasa silicón al 1% en cloroformo (MERCK). Se centrifuga a 5 000 rpm. durante 20 min. En la solución se obtienen los azúcares solubles, cuantificándose estos por determinación de pentosas y hexosas (6.2 y 6.3).

Hemicelulosa.

Al tubo de centrifuga con el precipitado obtenido del paso anterior se le agregan 3 ml. de ácido sulfúrico 1N y se coloca en un baño de agua a ebullición (92°C) durante 30 min. los tubos son enfriados al chorro de agua y se centrifugan 10 min. En la solución se encuentra un hidrolizado de la hemicelulosa, en el cual se determinan pentosas y hexosas (6.2 y 6.3).

Con el objeto de efectuar una cuantificación real de la hemicelulosa, el precipitado es lavado con 10 ml. de agua destilada (agitando 5 seg. aprox). Se centrifuga durante 10 min. y en la solución resultante se determinan nuevamente pentosas y hexosas.

Celulosa.

Al precipitado obtenido en el paso anterior se le agregan con agitación 10 ml. de ácido sulfúrico al 67% v/v. Después de un reposo por 1 hora a temperatura ambiente, agitando cada 15 minutos, se centrifuga a 5000 rpm. durante 20 min. En la solución resultante se determinan pentosas y hexosas (6.2 y 6.3). En este caso las hexosas se consideran celulosa únicamente.

La cantidad total de hemicelulosa en la muestra original se obtuvo sumando las cantidades de pentosas y hexosas determinadas en la fracción de hemicelulosa y las pentosas determinadas en la fracción de celulosa.

6.2 DETERMINACION DE PENTOSAS (METODO DE TRACEY, 1950)

Para la determinación de pentosas se empleó el método analítico de Tracey. El método es una cuantificación colorimétrica de un complejo colorido (naranja) que se produce al oxidarse las pentosas por la acción del ácido acético en presencia de anilina y oxígeno. La eficacia del método analítico seleccionado fue confirmada así como los factores que interfieren sobre el desarrollo del color. Se elaboró una curva estándar con xilosa en agua, por considerarla el componente que se encuentra en mayor proporción en la hemicelulosa de los diferentes esquilmos agrícolas. Se estudió la interferencia de los siguientes factores sobre el desarrollo del color:

- 1) Longitud de onda máxima
- 2) Temperatura y tiempo de reacción
- 3) Interferencia con glucosa
- 4) Interferencia con HCl al 12% (v/v)
- 5) Interferencia con H_2SO_4 1N
- 6) Interferencia con H_2SO_4 al 67%
- 7) Interferencia con ácido nítrico-acético (1:10)

A continuación se describe el método analítico utilizado: de la solución problema se colocan 2 ml. de muestra en un tubo de ensayo, adicionando a

continuación con bureta 6 ml. del reactivo de Tracey, los tubos de ensayo son tapados y se dejan reposar en la obscuridad a 28-30°C. A las 24 horas de reacción se toma lectura de las muestras a 475 nm contra un blanco de agua o el ácido correspondiente de acuerdo a como se indica . El reactivo de Tracey se prepara añadiendo a un frasco ambar 100 ml. de ácido acético glacial, 10 ml. de ácido oxálico al 5%, 24 ml. de agua destilada y 16 ml. de anilina destilada. La anilina destilada y el reactivo de Tracey deben guardarse en frasco ambar y en refrigeración. El reactivo no debe ser usado después de una semana de su preparación.

6.3 DETERMINACION DE HEXOSAS (METODO MODIFICADO DE KLEIN-WEISMAN, 1953).

En el método de Klein-Weisman las hexosas son oxidadas por el ácido sulfúrico con formación de formaldehído, el cual en presencia de ácido cromotrópico produce una coloración violeta proporcional al contenido de hexosas. La eficacia del método analítico seleccionado fue confirmada, así como los factores que interfieren sobre el desarrollo del color. Para la determinación de hexosas se elaboró una curva standard con glucosa en agua dado que es la principal hexosa de los carbohidratos solubles, de la hemicelulosa y componente único en la celulosa. Se estudió la interferencia de los siguientes factores sobre el desarrollo del color:

- 1) Longitud de onda máxima
- 2) Temperatura y tiempo de reacción
- 3) Interferencia con xilosa
- 4) Interferencia con HCl al 12% (v/v)
- 5) Interferencia con H_2SO_4 1N.

6) Interferencia con H_2SO_4 al 67%

7) Interferencia con ácido nítrico-acético (1:10)

A continuación se describe el método analítico utilizado: se coloca 1 ml. de la solución problema en un tubo de ensayo añadiendo a continuación con bureta 5 ml. del reactivo de Klein-Weisman. Los tubos de ensayo son tapados y se colocan en un baño de agua a ebullición durante 10 min. Los tubos son enfriados inmediatamente al chorro de agua para leer en seguida a 570 nm. contra un blanco de agua. Debido a que no existen diferencias significativas con los ácidos se puede efectuar la lectura contra un blanco de agua y es posible extrapolar todas las lecturas con la curva estándar en agua.

Para la preparación del reactivo de Klein-Weisman se disuelven 0.5 g de ácido cromotrópico en 5 ml. de agua destilada, adicionando 205 ml. de H_2SO_4 15M. El reactivo debe prepararse al instante, de lo contrario puede ser guardado en refrigeración con un máximo de 2 semanas.

7. DETERMINACION DE LIGNINA (METODO DE ETHLAND; M.J. 1977)

El material lignocelulósico tratado con un ácido fuerte permite la hidrólisis de los carbohidratos y por lo tanto su solubilización, dejando un residuo insoluble que por definición es la lignina, la cual puede ser determinada gravimétricamente (Ethland, M.J. & Col, 1977). Para efectuar esta determinación, se pesan 2 g. de material lignocelulósico seco colocándolos en un matraz Erlenmeyer de 1 l. A continuación se adicionan 20 ml. de H_2SO_4 al 72% v/v, agitando de tal manera que el ácido cubra

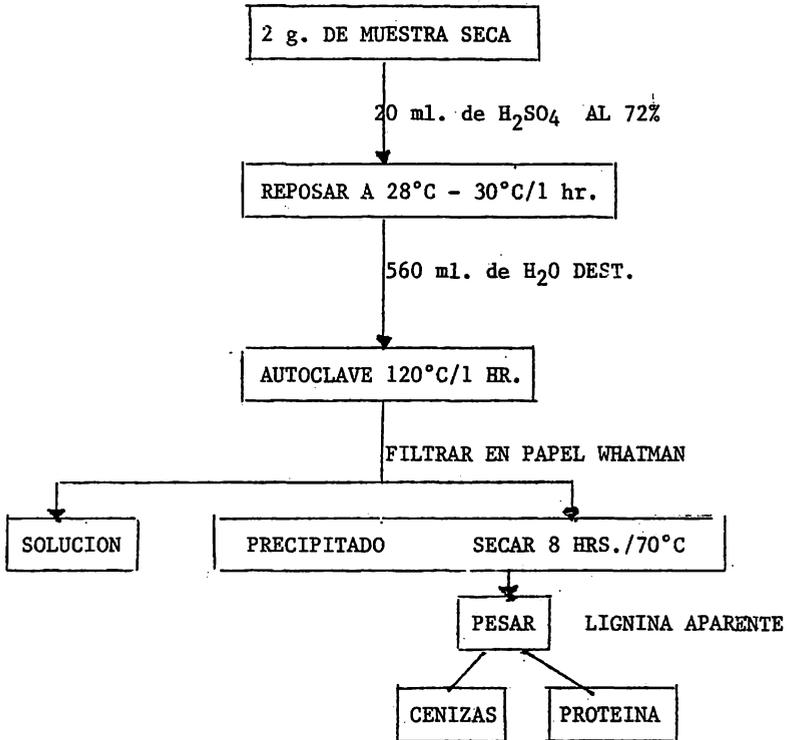
perfectamente la muestra. Después de 1 hora de reposo a 28-30°C se añaden 560 ml. de agua destilada. El matr az es tapado y se le somete a 120°C y a 1 atm. de presión durante 1 hr. Después del tratamiento térmico el contenido del matr az es filtrado en caliente en papel whatman No. 1 previamente tarado. La solución se tira y el papel filtro con la lignina se lava con agua destilada hasta que el pH del agua de lavado alcance un valor cercano a 6. Después de 8 horas en una estufa a 70°C el peso obtenido indica el % de lignina aparente. A continuación se procede a determinar la lignina real determinando las cantidades de proteína y cenizas insolubles que quedaron retenidas en la lignina aparente. Para ello, de la lignina aparente se toman de 0.04 a 0.06 g. para la determinación de proteína por el método de Kjeldhal (ver II.9) y 1 g. para la determinación de cenizas (ver II.8).

La forma de efectuar los cálculos es la siguiente:

$$\% \text{ Lignina aparente} = \frac{\text{Peso lignina} \times 100}{\text{Peso muestra}}$$

$$\% \text{ Lignina real} = \% \text{ lignina aparente} - (\% \text{ cenizas} + \% \text{ proteína})$$

FIG. II.3 PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACION DE LIGNINA



8. DETERMINACION DE CENIZAS.

Poner una cápsula a peso constante a 500°C. Pesar 5 g., carbonizar con mechero y meter en la cápsula a la mufla cuidando que la temperatura no pase de 550°C. Se suspende el calentamiento cuando las cenizas estén blancas o grises (si se observan puntos negros, se humedecen con unas gotas de agua destilada, se secan y se vuelven a calcinar). Enfriar en desecador y pesar. Calcular el porcentaje de cenizas.



9. DETERMINACION DE PROTEINA (METODO DE MICROKJELDHAL).

El principio de este método consiste en que al ser oxidadas proteínas y demás materias orgánicas por el ácido sulfúrico el nitrógeno presente es convertido a sulfato de amonio. Al hacer reaccionar esta sal con una base fuerte se desprende amoniaco que se destila y se recibe en un volumen conocido de ácido bórico. Por titulación del ácido no neutralizado se calcula la cantidad de amoniaco desprendido y así la cantidad de nitrógeno de la muestra. El porcentaje de nitrógeno multiplicado por el factor 6.25 nos da el porcentaje de proteínas (A.O.A.C.) Para la determinación de la fracción de proteína retenida por la lignina aparente se pesan de 0.04 a 0.06 g. de muestra en papel glassine y se colocan en un matraz de microkjeldhal. A continuación se añaden 2 ml. de mezcla digestora (300 ml. de H_2SO_4 , 100 ml. de H_3PO_4 , 3 g. de $CuSO_4$ y 3 g. de -

dióxido de selenio). Se calientan hasta la total destrucción de la materia orgánica, o sea hasta que el contenido del matraz este completamente claro y no presente residuos negros de materia orgánica. Después de haberse enfriado el matraz de digestión, el residuo se disuelve en la menor cantidad de agua posible (5-10 ml), se pasa al aparato de destilación. A la salida del condensador del destilador, se coloca un vaso de precipitados con 15 ml. de ácido bórico al 4% y 2 gotas del indicador. Este indicador se preparó mezclando 2 partes de una solución de rojo de metilo al 0.2% con una parte de solución alcohólica de azul de metileno al 0.2%. Al iniciarse la ebullición en el aparato de destilación se añaden lentamente (gota a gota) 20 ml. de NaOH 1:1 al aparato de destilación empezando entonces la destilación hasta obtener 50 ml. de destilado. Se retira el vaso del aparato de destilación y se titula con HCl 0.01N hasta la aparición del color verde. Se determina un blanco con un pedazo de papel igual al que se usó para la muestra. El contenido de nitrógeno en la muestra se calcula entonces utilizando la siguiente fórmula:

$$\%N = \frac{(\text{ml. HCl del problema} - \text{ml. HCl del blanco}) \times N \times 0.014 \times 100}{\text{g. de muestra}}$$

El contenido de proteína se calcula entonces:

$$\% \text{ de proteína} = \%N \times 6.25$$

III. EXPERIMENTOS Y RESULTADOS

La línea de investigación dentro de la que se encuentra enmarcado el presente estudio tiene como objetivo final el desarrollo de una tecnología que permita utilizar los desperdicios lignocelulósicos en la alimentación animal. Con el presente estudio se deseaba determinar la posibilidad de utilizar el hongo comestible Pleurotus ostreatus con este objeto. Se decidió emplear varias cepas de P. ostreatus en este estudio, ya que previamente no se había investigado sobre las posibles variaciones en los patrones de degradación de la lignocelulosa entre diferentes cepas.

1. SELECCION Y ESTANDARIZACION DE METODOS ANALITICOS

Los patrones de degradación de las diferentes cepas de Pleurotus ostreatus fueron determinados en función de los cambios de composición del sustrato lignocelulósico. Los métodos tradicionales seguidos para el análisis de materiales lignocelulósicos como determinación de fibra cruda (A.O.A.C.), en la cual sólo se determinan cambios en el contenido de celulosa; fibra ácido detergente (A.O.A.C.) donde se emplea H_2SO_4 1N con reflujos de 1 hora,; en estas condiciones la hemicelulosa se separa y únicamente se cuantifica celulosa y lignina.

Estos métodos no proporcionan la información detallada necesaria ya que se deseaba cuantificar cambios en el contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina.

La cuantificación en forma segura de éstos componentes era de suma importancia y su realización representaba varios obstáculos, principalmente para el caso de los polisacáridos.

La hemicelulosa y celulosa son polisacáridos que no pueden ser cuantificados directamente, sino que requieren de que inicialmente sean extraídos del material lignocelulósico por medio de una hidrólisis selectiva para que posteriormente se cuantifiquen los monosacáridos presentes en cada extracto, realizándose una extracción con el método modificado de Deriaz, cuantificando entonces en cada extracto las hexosas y pentosas producidas durante la degradación de hemicelulosa y celulosa.

1.1 CUANTIFICACION DE PENTOSAS POR EL METODO DE TRACEY.

Para la cuantificación de pentosas por el método colorimétrico de Tracey, se procedió a elaborar una curva estándar de xilosa en agua, basándose en las condiciones reportadas por el método original. Se prepararon soluciones de xilosa a concentraciones de 5 a 40 microgramos /ml. La longitud de onda de máxima absorción fue determinada en el tubo de mayor concentración (40 μ g/ml) a temperatura ambiente a las 24 horas después de haberse añadido el reactivo de Tracey. La intensidad del color naranja desarrollado fue medida en el intervalo de 440 a 500 nm. Encontrándose una longitud máxima a 475 nm. como lo muestra la figura III.1.

A esta misma concentración de xilosa se determinaron absorbancias a 475 nm. a temperatura ambiente y a $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ en intervalos de tiempo de 6, 19 y 24 horas después de haberse iniciado la reacción. Los resultados se muestran en la tabla III.1 Se puede observar que el más alto valor de absorbancia (0.79) fue obtenido a un tiempo de reacción de 24 horas y a una temperatura de $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Por lo que la curva estándar de xilosa se

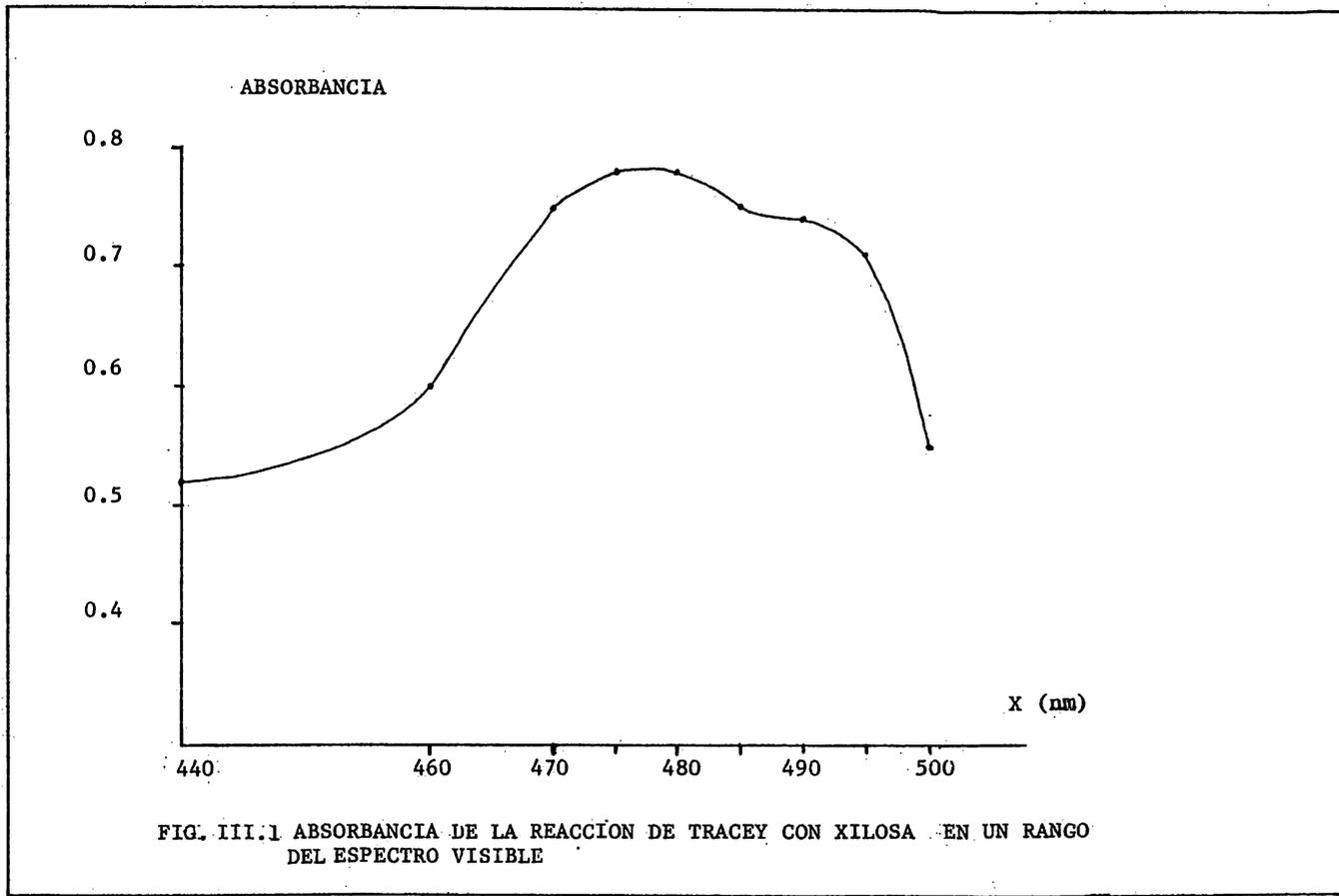


FIG. III.1 ABSORBANCIA DE LA REACCION DE TRACEY CON XILOSA EN UN RANGO DEL ESPECTRO VISIBLE

Tabla 111.1 Absorbancias determinadas a una concentración de Xilosa de 40 $\mu\text{g/ml}$ a diferentes intervalos de tiempo, a temperatura ambiente y a $30 \pm 2^\circ\text{C}$. $\lambda_{\text{max}} = 475 \text{ nm}$.

| Tiempo (hrs.) | Absorbancia $\lambda_{\text{max}} 475\text{nm}$. | |
|---------------|---|------------------------------|
| | t = ambiente | t = $30 \pm 2^\circ\text{C}$ |
| 6 | 0.209 | 0.380 |
| 19 | 0.449 | 0.540 |
| 24 | 0.680 | 0.790 |

elaboró manteniendo en lo sucesivo los tubos de reacción en estas condiciones. En la figura III.2 se muestra la curva estándar de xilosa en agua utilizada en los experimentos de degradación para la cuantificación de pentosas. Se puede observar que en el rango de concentraciones de 5-40 μ g/ml se cumple la Ley de Lambert-Beer.

De acuerdo a la bibliografía para la extracción de hemicelulosa se tenía la opción de emplear diferentes ácidos; ácido sulfúrico 1N (Deriaz, 1961) ácido clorhídrico 12% v/v (Browning, 1977) o ácido acético-nítrico 1:10 (B.B. Acta, 1961). Para la extracción de celulosa se emplea ácido sulfúrico al 67% v/v (B.B. Acta, 1961). Dado que la cuantificación de pentosas debe realizarse en éstos extractos, se procedió a evaluar las posibles interferencias de estos ácidos en la determinación de pentosas.

Inicialmente se prepararon soluciones base, tomando en cuenta las condiciones (tiempos y temperaturas) de reacción para la extracción de celulosa y hemicelulosa (Crampton Maynard, 1938). Así para los ácidos sulfúrico 1N, clorhídrico al 12% v/v y nítrico-acético 1:10, se preparó una solución con 50 miligramos de xilosa en 6 ml. de ácido, calentando durante 30 minutos en baño maría a ebullición. Posteriormente se aforó a 1 lt. con H₂O destilada, teniéndose finalmente una concentración de 50 microgramos/ml. de xilosa. El blanco se preparó con 0.6 ml. del ácido correspondiente aforando a 100 ml. con agua destilada. Para la preparación de la solución base correspondiente, al ácido sulfúrico al 67% v/v, se mezclaron 25 miligramos de xilosa con 10 ml. del ácido. Se dejó reposar durante una hora a temperatura ambiente, posteriormente se aforó a 500 ml. con agua destilada. Obteniéndose una solución de 50 μ g/ml. de xilosa.

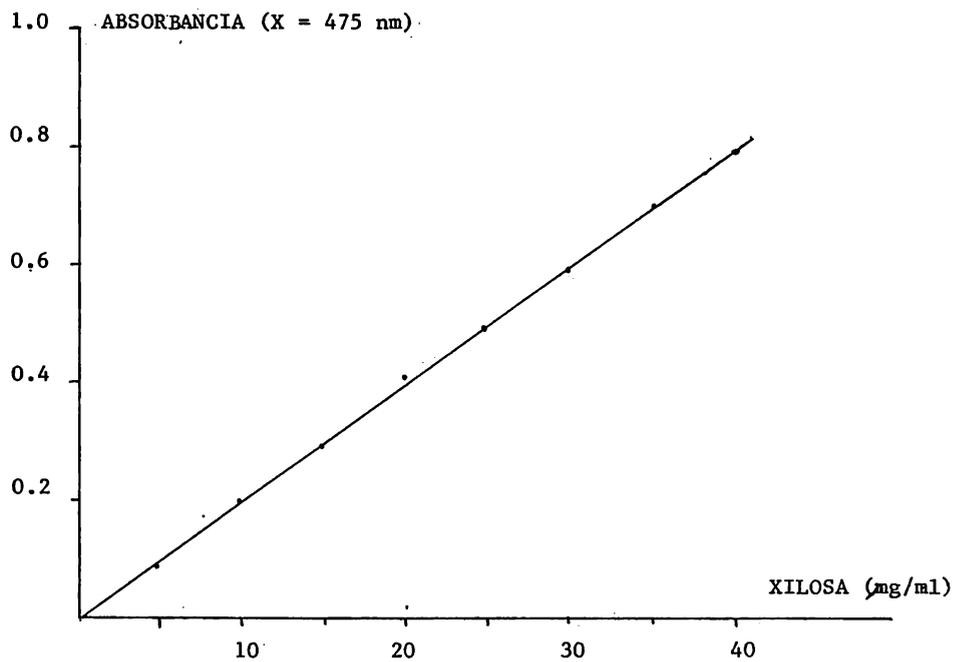


FIG. III.2. CURVA ESTANDAR DE XILOSA EN AGUA (METODO DE TRACEY)

El blanco correspondiente se preparó con 2 ml de ácido sulfúrico al 67% v/v, aforando a 100 ml. con H₂O destilada.

De cada una de estas soluciones base, se tomaron 2 ml. y se mezclaron con 6 ml. del reactivo de Tracey, siguiéndose la metodología anteriormente mencionada para la determinación de xilosa (24 horas a una temperatura de reacción de 30°C ± 2°C).

La tabla III.2 muestra las absorbancias obtenidas a diferentes concentraciones de xilosa en diferentes medios ácidos. De acuerdo a las correlaciones obtenidas, la curva estándar de xilosa, sigue la ley de Lambert-Beer para todos los tratamientos ácidos (figura III.3). Las pendientes correspondientes son menores que la obtenida en la curva estándar de xilosa en agua, a excepción del tratamiento con H₂SO₄ 1N. Para evitar errores de lectura en la determinación de xilosa se requiere emplear la curva estándar específica para cada tratamiento ácido.

Dado que en los extractos de hemicelulosa se tienen mezclas de glucosa y pentosa se decidió evaluar también una posible interferencia de las hexosas en la determinación de pentosas. Los datos de la tabla III.3 muestran las absorbancias producidas por la glucosa al reaccionar con el reactivo de Tracey y su composición con las curvas estándar de xilosa en los medios correspondientes. En la figura III.4 se encuentran graficados estos datos, se puede observar que el nivel de interferencia que pudieran presentar las hexosas en la determinación de pentosas es mínima para todos los medios ácidos, no así en medio acuoso donde las pendientes de xilosa y glucosa en agua son muy parecidas, una concentración de 40 µg/ml. de glucosa en agua presenta la misma absorbancia (0.4) que una concentración de 40 µg/ml. de xilosa en el mismo medio.

Tabla 111.2 Interferencia de los ácidos en la determinación de Xilosa por el método de Tracey.

| Xilosa µg/ml | Absorbancia λ 475 nm. medios ácidos | | | | |
|------------------|--|-----------------------------------|------------------------------------|---------|--------------------------|
| | Control H ₂ O | H ₂ SO ₄ 1N | H ₂ SO ₄ 67% | HCl 12% | HA-HNO ₃ 1:10 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 5 | 0.09 | | 0.07 | | |
| 10 | 0.20 | 0.24 | 0.14 | 0.06 | 0.13 |
| 15 | 0.29 | | | | |
| 20 | 0.41 | 0.42 | 0.27 | 0.10 | 0.28 |
| 25 | 0.49 | | | | |
| 30 | 0.59 | 0.66 | 0.45 | 0.16 | 0.44 |
| 35 | 0.7 | | | | |
| 40 | 0.79 | 0.82 | 0.6 | 0.22 | 0.56 |
| 50 | | 1.0 | 0.65 | | |
| 80 | ∞ | | ∞ | 1.05 | ∞ |
| Coef. de corr | 0.9997 | 0.9981 | 0.9937 | 0.9472 | 0.9989 |
| Pendiente | 0.0199 | 0.0199 | 0.0138 | 0.0131 | 0.0143 |
| Ordenada | -0.0024 | 0.0228 | 0.0045 | -0.1303 | -0.0050 |

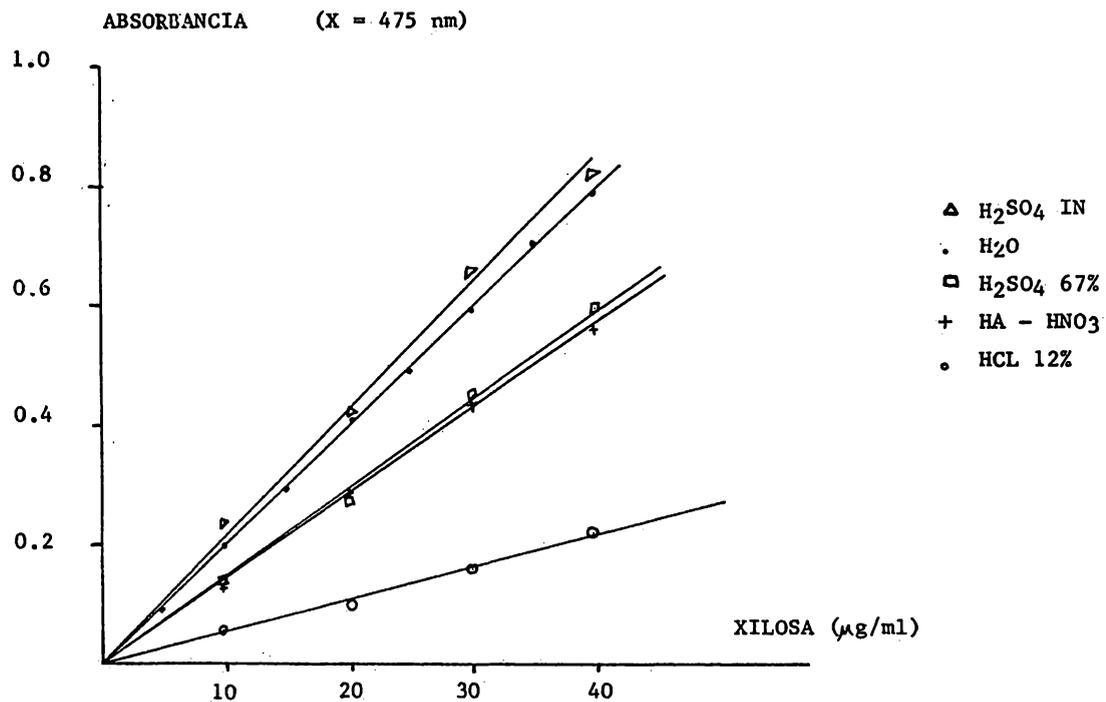


FIG. III.3 CURVAS ESTANDAR DE XILOSA EN DIFERENTES MEDIOS ACIDOS Y EN AGUA (Método de Tracey)

TABLA III.3 ABSORBANCIAS DE MEZCLAS DE GLUCOSA CON REACTIVO DE TRACEY DESPUES DE UN TRATAMIENTO ACIDO.

| CONCENTRACION ($\mu\text{g}/\text{ml}$) | A B S O R B A N C I A | | | | |
|--|-----------------------------------|-----------------------|------------------------|-------------------|-----------------------------------|
| | CONTROL | SOLUCIONES DE GLUCOSA | | | |
| | XILOSA EN H_2O | H_2O | HCl a1 12% | HA-HNO_3 | H_2SO_4 a1 67% |
| 10 | 0.20 | 0.08 | 0.04 | 0.002 | - |
| 15 | 0.29 | - | - | - | - |
| 20 | 0.41 | 0.24 | 0.015 | 0.03 | - |
| 25 | 0.49 | - | - | - | - |
| 40 | 0.79 | 0.39 | 0.035 | - | 0.020 |
| 80 | | | 0.1 | 0.12 | 0.04 |
| 160 | | | 0.07 | 0.25 | 0.10 |
| 320 | | | 0.16 | 0.36 | 1.85 |
| 360 | | | 0.26 | | |
| Coef. corr | 0.9997 | | | 0.9811 | 0.9044 |
| m | 0.0199 | | | 0.0011 | 0.0005 |
| b | -0.0024 | | | 0.0112 | 0.2932 |

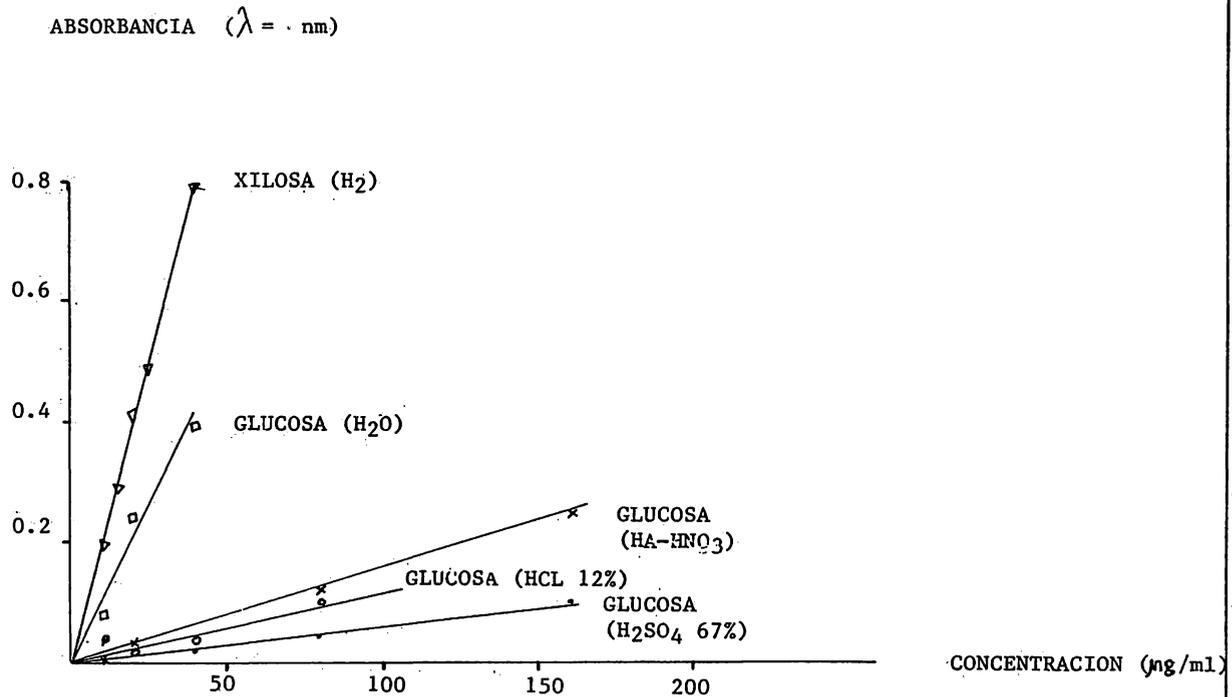


FIG. III.4 CURVAS ESTANDAR DE GLUCOSA EN DIFERENTES MEDIOS (METODO DE TRACEY)

Esta curva de xilosa en agua se emplea únicamente para la cuantificación de carbohidratos en la fracción soluble, por lo que la interferencia no es de importancia, debido a que la cantidad de carbohidratos solubles en el sustrato es mínima.

1.2 CUANTIFICACION DE HEXOSAS POR EL METODO MODIFICADO DE KLEIN-WEISSMAN

Las condiciones óptimas para la determinación de glucosa se fijaron en base al efecto de diferentes variables: longitud de onda, tiempo de calentamiento, concentración de ácido cromotrópico e interferencia con xilosa.

Según Bateman (1970), para la preparación del reactivo de Klein-Weissman, se requieren 5 g. de ácido cromotrópico (sal sódica) en 5 ml. de agua destilada, más 205 ml. de ácido sulfúrico 15M. Sin embargo, según Klein-Weissman (1953) se requieren tan solo 0.1 g. del ácido en 1 ml. de agua destilada y aforado a 50 ml. con ácido sulfúrico 15M. Posteriormente Deriaz (1961), reportó el uso de 0.5 g. de ácido cromotrópico para la misma cantidad de agua y ácido sulfúrico mencionados por Bateman. Por otro lado Klein y Weissman reportan que la reacción responsable del desarrollo del color se hace más cuantitativa conforme la concentración de ácido cromotrópico es mayor (Klein-Weissman, 1953). Por lo que es de suponerse que con 5 g. del mismo, se tenga la mayor cuantitividad.

Para esclarecer estos puntos, se procedió primero a determinar los picos de máxima absorbancia para la reacción de Klein-Weissman con glucosa a concentraciones de 0.5 mg/ml., tomando 30 min. de calentamiento de acuerdo a Klein-Weissman (1953) y para la preparación del reactivo se siguieron las indicaciones de Bateman (1970).

La figura III.5 muestra el pico de máxima absorbancia para la reacción de Klein-Weissman con glucosa. Se observan tres picos en el espectro visible, a 370 nm, de 450 a 470 y a 560 nm. A continuación se preparó una

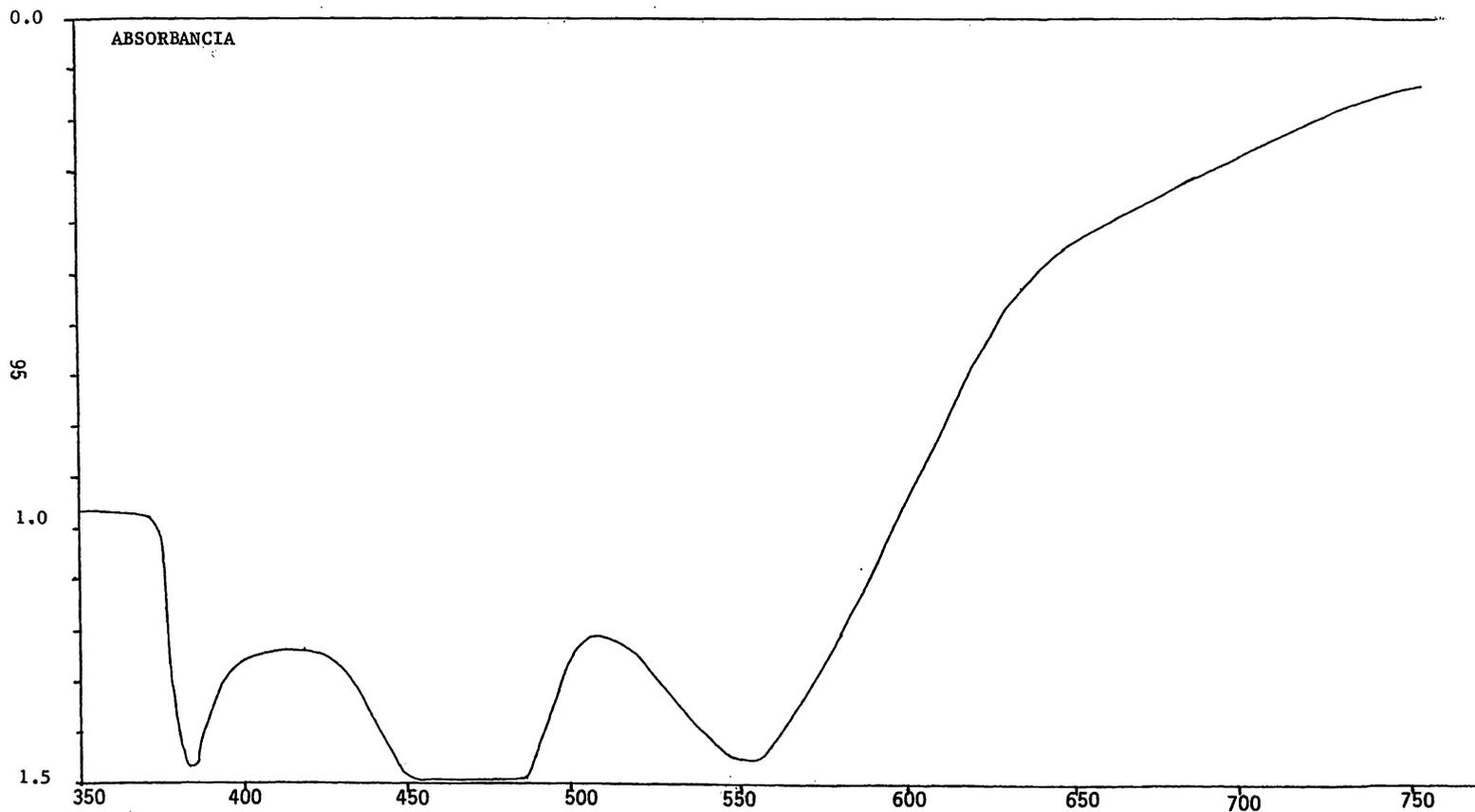


FIG. III.5. ABSORBANCIA DE LA REACCION DE KLEIN WEISSMAN CON GLUCOSA EN EL ESPECTO VISIBLE

X (nm)

solución de glucosa (0.5 mg/ml) y otra de xilosa (1.0 mg/ml). Se hicieron dos variantes en la preparación del reactivo de Klein-Weissman. En una se emplearon 0.5 g. de ácido cromotrópico, se disolvieron en 5 ml. de agua destilada y se agregaron 205 ml. de ácido sulfúrico 15M. En la segunda variable se utilizaron 5 g. de ácido cromotrópico en lugar de 0.5 g. Se tomó 1 ml. de la solución de glucosa y otro de la solución de xilosa y se agregaron 205 ml. del reactivo de Klein-Weissman. Se colocaron en baño maría a diferentes tiempos (20, 35, 50, 65 y 80 min.). Posteriormente se midió su absorbancia a diferentes longitudes de onda cercanos a 570 nm. Según los resultados de la tabla III.4, cuando se emplean 5 g. de ácido cromotrópico, se tiene una longitud de onda máxima a 560 nm. y al emplear 0.5 g. del mismo para 205 ml. de H_2SO_4 (15M) se tiene un máximo de 570 nm. Como se había supuesto, la cuantitividad de la reacción fue mayor al contar con más cantidad de ácido cromotrópico, pero se tiene también más interferencia con xilosa y se consume más reactivo. Por todo lo anterior, se optó por usar el ácido a una concentración de 0.5 mg/205 ml. de H_2SO_4 15M.

En cuanto al tiempo de calentamiento, se buscó aquel en el cual se pudieran leer concentraciones de glucosa pequeños, pues se esperaba que ésta disminuyera en el transcurso de la degradación del sustrato por el P. ostreatus. También se buscó que la interferencia con la xilosa fuera la mínima posible. Si se toma un tiempo de calentamiento de 80 min, la cuantitividad de la reacción se mejora. Para una misma concentración de glucosa, la lectura de absorbancia es mayor conforme aumenta el tiempo de calentamiento. Por ello, el rango de concentraciones que per-

TABLA III.4 EFECTO DE LA CONCENTRACION DE ACIDO CROMOTROPICO, TIEMPO DE CALENTAMIENTO E INTERFERENCIA CON XILOSA SOBRE LA DETERMINACION DE HEXOSAS POR EL METODO DE KLEIN WEISSMAN

| CARBOHIDRATO | | CONC. DE AC. CROMOTROPICO (mg/ml) | ABSORBANCIA LONGITUD DE ONDA (NM) | | | | | |
|------------------------------|------|---|--------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| TIPO | CONC | | 540 | 550 | 560 | 570 | 580 | 590 |
| <u>20 MIN. CALENTAMIENTO</u> | | | | | | | | |
| GLUCOSA | 0.5 | 0.5 | 0.211 | 0.221 | 0.232 | 0.232 | 0.231 | 0.216 |
| XILOSA | 1.0 | 0.5 | - | - | - | 0 | - | - |
| GLUCOSA | 0.5 | 5.0 | - | 0.522 | 0.516 | 0.493 | 0.459 | - |
| XILOSA | 1.0 | 5.0 | - | - | 0.254 | - | - | - |
| <u>35 MIN. CALENTAMIENTO</u> | | | | | | | | |
| GLUCOSA | 0.5 | 0.5 | - | 0.499 | 0.504 | 0.505 | 0.495 | - |
| XILOSA | 1.0 | 0.5 | - | - | - | 0 | - | - |
| GLUCOSA | 0.5 | 5.0 | - | 9.921 | 0.917 | 0.970 | 0.914 | - |
| XILOSA | 1.0 | 5.0 | - | - | - | 0.443 | - | - |
| <u>50 MIN. CALENTAMIENTO</u> | | | | | | | | |
| GLUCOSA | 0.5 | 0.5 | - | - | 0.795 | 0.900 | 0.799 | - |
| XILOSA | 1.0 | 0.5 | - | - | - | 0.005 | - | - |
| GLUCOSA | 0.5 | 5.0 | 1.351 | 1.401 | 1.401 | 1.357 | 1.295 | - |
| XILOSA | 1.0 | 5.0 | - | - | 0.518 | - | - | - |
| <u>65 MIN. CALENTAMIENTO</u> | | | | | | | | |
| GLUCOSA | 0.5 | 0.5 | - | 0.901 | 0.935 | 0.950 | 0.937 | - |
| XILOSA | 1.0 | 0.5 | - | - | - | 0.024 | - | - |
| GLUCOSA | 0.5 | 5.0 | - | 1.256 | 1.299 | 1.256 | - | - |
| XILOSA | 1.0 | 5.0 | - | - | 0.556 | - | - | - |
| <u>80 MIN. CALENTAMIENTO</u> | | | | | | | | |
| GLUCOSA | 0.5 | 0.5 | - | - | 1.134 | 1.142 | 1.118 | - |
| XILOSA | 1.0 | 0.5 | - | - | - | 0.037 | - | - |
| GLUCOSA | 0.5 | 5.0 | - | 1.776 | 1.796 | 1.744 | 1.553 | - |
| XILOSA | 1.0 | 5.0 | - | - | 0.748 | - | - | - |

mite, obtener lecturas de absorbancia se reduce. Además de que es necesario determinar concentraciones bajas de glucosa al final de la degradación, se requería determinar altas concentraciones al inicio (se podrían hacer diluciones pero el error experimental aumentaría). Por otro lado con el espectrofotómetro empleado se obtiene menos error de lectura entre 0.01 y 0.1 de absorbancia. Por todo lo anterior se pensó que el tiempo de calentamiento más adecuado corresponde al de 50 minutos.

Resumiendo, las condiciones óptimas seleccionadas fueron:

Absorbancia máxima: 570 nm.

Tiempo de calentamiento: 50 minutos

Concentración de ácido cromotrópico: 0.5 mg/205 ml. de H_2SO_4 15M.

Con las condiciones óptimas se hizo una curva patrón de glucosa en agua (Tabla III.5). Esta sigue la ley de Lambert-Beer hasta una concentración de 0.35 mg/ml que corresponde a una absorbancia de 1.2 (figura III.6, sin embargo se pueden considerar lecturas confiables entre 0.01 y 0.8 de absorbancia (de acuerdo al espectrofotómetro usado).

La xilosa a una concentración de 1 mg/ml da una lectura de absorbancia de 0.03 con lo que se puede concluir que la xilosa interfiere en un 100% con la glucosa cuando la relación de concentraciones fue de 100:1 (xilosa:glucosa); a lo largo de los experimentos realizados, esta relación nunca se alcanzó.

Debido a que para la extracción de hemicelulosa y celulosa era posible emplear varios tipos de ácidos, se decidió evaluar posibles interferencias en la determinación de glucosa en los extractos. Se consideraron condiciones drásticas, es decir se supuso que en las extracciones se ten-

TABLA III.5. CURVA ESTANDAR DE GLUCOSA EN AGUA (METODO MODIFICADO DE KLEIN WEISSMAN)

| CONCENTRACION DE GLUCOSA (mg/ml) | ABSORBANCIA ($\lambda = 570 \text{ nm}$) |
|--|---|
| 0.01 | 0.03 |
| 0.02 | 0.06 |
| 0.03 | 0.085 |
| 0.04 | 0.12 |
| 0.05 | 0.16 |
| 0.10 | 0.30 |
| 0.15 | 0.48 |
| 0.20 | 0.66 |
| 0.25 | 0.80 |
| 0.30 | 1.05 |
| 0.35 | 1.20 |
| 0.40 | 1.30 |
| 0.50 | 1.50 |
| Coef. de corr. = 0.99946 Pendiente (m) = 3.24945 Intersección (b) = -0.00670 | |

Nota: La xilosa en una concentración de 1 mg/ml, da una lectura de absorbancia de 0.03 a 570 nm., al actuar con el reactivo de Klein Weissman a las mismas condiciones anteriores.

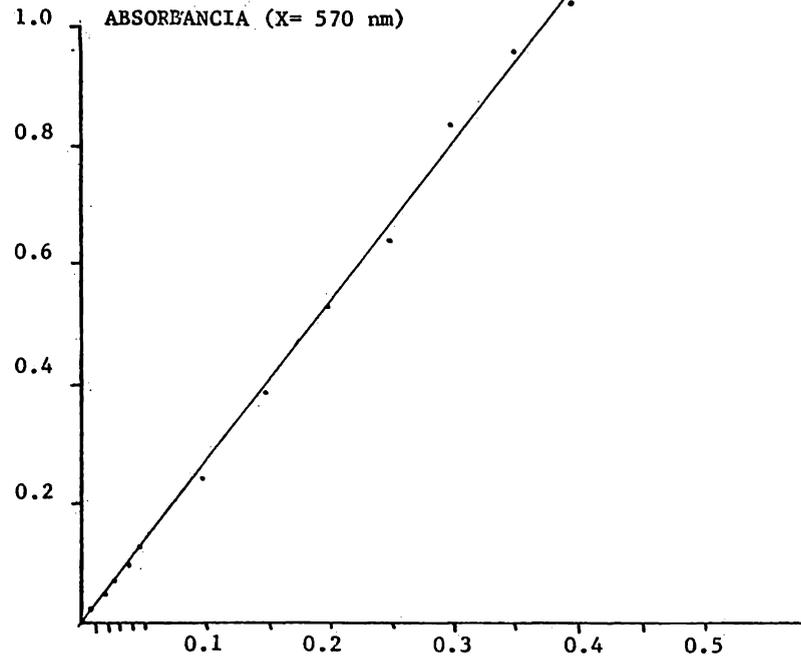


FIG. III.6 CURVAS ESTANDAR DE GLUCOSA EN AGUAS (METODO MODIFICADO DE KLEIN WEISSMAN)

dría glucosa como tal y no hemicelulosa o cèlulosa. Así se elaboraron curvas estándar de glucosa en los diferentes medios ácidos. De soluciones de glucosa en agua, se tomó 1 ml. y se adicionaron 3ml. del ácido correspondiente, de tal manera que se obtuvieron concentraciones finales de glucosa de 0.05, 0.10, 0.20, 0.25, 0.40 y 0.50 mg/ml. Posteriormente se sometieron a calentamiento por 30 min. en baño maría. Se enfriaron al chorro del agua y se tomo 1 ml. de cada uno para la determinación de glucosa por el método de Klein-Weissman.

Lo mismo se hizo con la xilosa, de tal manera que se tuvo al final una concentración de 0.66 mg/ml, de donde se tomo también 1 ml.

Los resultados de estas pruebas están presentados en la tabla III.6 y figura III.7 y se pueden resumir de la siguiente forma:

- a) Nítrico: Acético en una relación 1:10.- La determinación de hexosas no pudo ser realizada, ya que este ácido impide que se forme el color violeta característico, dando más bien un color amarillo en todos los tubos.
- b) HCl al 12% v/v y H_2SO_4 1N.- Se observó que estos ácidos no interfieren en la determinación de glucosa. (Figura III.7), sus pendientes son muy similares a la de la curva estándar de glucosa en agua. La interferencia de la xilosa sobre la determinación de glucosa en estos medios ácidos, y en medio acuoso es despreciable en todos ellos.
- c) H_2SO_4 al 67% v/v.- No hay interferencia con este ácido ya que forma parte del reactivo de Klein-Weissman en una concentración 15M.

TABLA III.6 INTERFERENCIA DE LOS ACIDOS EN LA DETERMINACION DE GLUCOSA

| GLUCOSA (mg/ml) | ABSORBANCIA (X = 570 nm) | | | |
|--------------------|--------------------------|----------------|--------------------------------------|----------------|
| | MEDIO ACUOSO | HCL 12% V/V | H ₂ SO ₄ IN | AC-NIT-ACETICO |
| 0.05 | 0.16 | 0.14 | 0.23 | 0 |
| 0.10 | 0.30 | 0.29 | 0.38 | 0 |
| 0.20 | 0.66 | 0.54 | 0.70 | 0 |
| 0.25 | 0.80 | 0.68 | 0.85 | 0 |
| 0.40 | 1.30 | 1.00 | 1.10 | 0 |
| 8.50 | 71.50 | 1.20 | 1.40 | 0 |
| CORR = | 0.9994 | 0.9995 | 0.9974 | - |
| M = | 3.2494 | 2.6976 | 3.3209 | - |
| INT. = | -0.0067 | 0.0062 | 0.0334 | - |

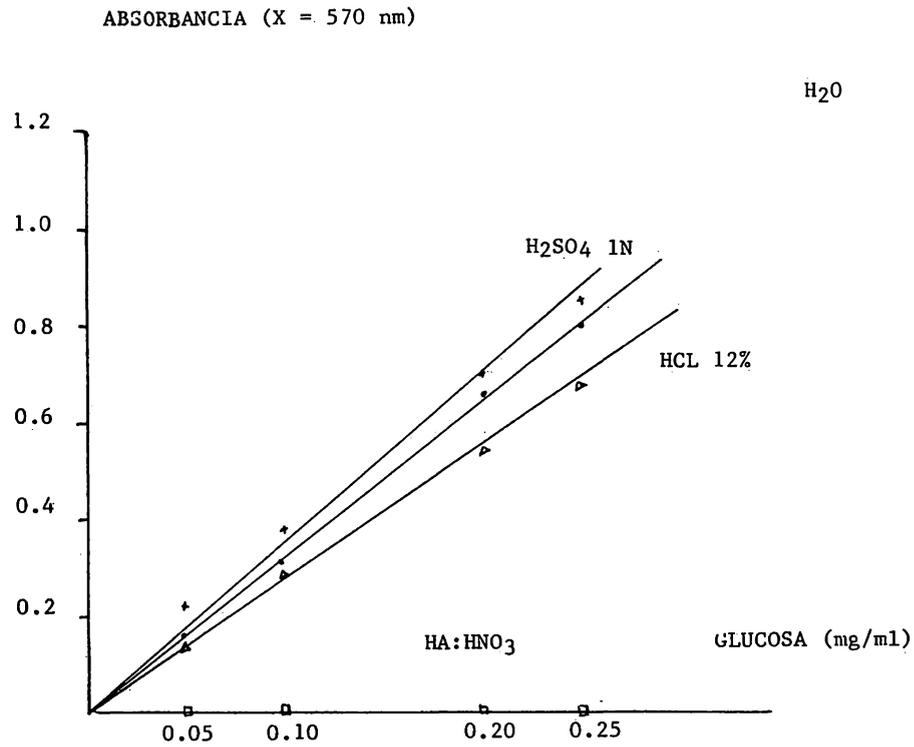


FIG. III.7 CURVAS ESTANDAR DE GLUCOSA EN AGUAS Y DIFERENTES ACIDOS

1.3 EXTRACCION DE CELULOSA Y HEMICELULOSA.

Para la extracción de celulosa y hemicelulosa se partió de los métodos de Deriaz (1961) y el de Crampton-Maynard (1938), y en base a ellos se obtuvo un método nuevo. No se empleó el método de Deriaz como tal, debido a que es muy largo y complicado, teniendo la desventaja de la mayor probabilidad de pérdida de material durante la extracción. (Apéndice No. 1). Tampoco se empleó el método de Crampton-Maynard debido a la dificultad que se presentaba en la cuantificación de hexosas al emplear ácido nítrico-acético para la extracción, como se observa en la figura III.4. El procedimiento seguido fue la selección del método de C.M. como procedimiento de extracción general en una primera instancia para evaluar posteriormente la eficiencia de diferentes ácidos.

Para la separación selectiva de celulosa y hemicelulosa se probaron los efectos de los ácidos sulfúrico 1N, ácido clorhídrico al 12% v/v y nítrico-acético 1:10, sobre diferentes celulosas: Celex P, Celex AE (de uso común en cromatografía) y papel Whatman No. 1 (finamente picado). Para las extracciones se siguió el método de B. B. Acta (1961), solo que se agregaron 3 ml. de ácido clorhídrico o de ácido sulfúrico en lugar de ácido nítrico-acético en el caso correspondiente. Se hizo también una extracción "directa" empleando únicamente ácido sulfúrico al 67% v/v. Para el último caso se hicieron reaccionar 0.2g. de celulosa con 10 ml. de ácido durante 1 hora a temperatura ambiente. En cada extracción se determinó glucosa por el método de Klein-Weissman modificado.

En la tabla III.7 se resúmen los resultados observandose que el porciento

Tabla 111.7 Efecto de los tratamientos ácidos en la extracción de celulosa.

| Tratamiento | Carbohidratos | Tipos de celulosa | | |
|-----------------------------------|---------------|-------------------|--------------|--------------|
| | | Celex P | Celex AE | Whatman # 1 |
| H ₂ SO ₄ IN | Solubles | 0.65 | 0.06 | ND |
| | Hemicelulosa | 0.87 | 1.50 | |
| | Celulosa | <u>98.67</u> | <u>87.45</u> | |
| | % Total | 99.19 | 88.29 | |
| HCl 12% | Solubles | 0.69 | 0.0 | ND |
| | Hemicelulosa | 1.41 | 0.55 | |
| | Celulosa | <u>84.85</u> | <u>93.02</u> | |
| | % Total | 86.95 | 93.57 | |
| HA-HNO ₃ (10:1) | Solubles | 0.73 | ND | 0.03 |
| | Hemicelulosa | ---- | | ---- |
| | Celulosa | <u>97.70</u> | | <u>64.48</u> |
| | % Total | 98.48 | | 66.47 |
| Directo | % Total | 76.75 | 84.28 | ND |

ND no determinado

de recuperación es bajo en la determinación directa debido a que los ácidos que extraen a la hemicelulosa ayudan a la liberación posterior de la celulosa.

El ácido sulfúrico 1N extrae mejor Celex P que Celex AE y con el ácido clorhídrico al 12% v/v sucede lo contrario. No se puede decir que uno es mejor que otro, sino que depende del tipo de celulosa.

En la fracción de hemicelulosa, extraída con ácidos acético: nítrico, únicamente fue posible determinar glucosa en el lavado. Se obtuvo una lectura de absorbancia que correspondió a 5.68% de glucosa en Celex P y 1.96% en Papel Whatman No. 1. El color desarrollado en éste lavado no fue precisamente el violeta característico sino una combinación de violeta y amarillo. Esto indica que a medida que la concentración de ácidos acético:nítrico disminuye, la interferencia para la determinación de glucosa es menor. Sin embargo la dilución requerida es exagerada.

Se concluye que se puede emplear ya sea ácido sulfúrico 1N o ácido clorhídrico al 12% v/v con resultados similares, ya que estos ácidos no interfieren en la cuantificación de hexosas y aparentemente se tiene una extracción aceptable.

2. ANALISIS Y SELECCION DEL SUSTRATO PARA LOS EXPERIMENTOS DE DEGRADACION

Para los estudios de degradación se requería de un sustrato lignocelulósico. Se pensó en la selección de un sustrato modelo en base a dos criterios principales: 1) Que tuviera alto contenido de lignina y 2)

Que su producción en el país fuera alta. Entre los esquilmos agrícolas más abundantes en México se encuentran el rastrojo de maíz y el bagazo de caña. (Tabla 1.1). Además de ellos se decidió analizar también a la cascarilla de arroz debido a que es un material con un alto contenido de lignina.

2.1 ANALISIS QUIMICOS

La tabla No. III.8 muestra las composiciones en base seca respectivos. De acuerdo a estos resultados el sustrato que presentó mayor contenido de lignina es la cascarilla de arroz, 19.18%. La celulosa se encuentra en mayor proporción en el rastrojo de maíz, 28.18%. Por su contenido de lignina, la cascarilla de arroz podría seleccionarse como sustrato modelo, sin embargo su contenido de cenizas (19.06%) es muy elevado, haciendo que la proporción de los otros componentes disminuya. Por ello el rastrojo de maíz, a pesar de tener menos lignina (14.06%), fue seleccionado como sustrato modelo para el presente estudio, ya que también su contenido de celulosa es relativamente alto (28.18%).

2.2 ANALISIS FISICOS

Análisis de tamaño de partícula.

Además de seleccionar la materia prima, fue necesario seleccionar las condiciones de experimentación. El tamaño de partícula era una variable importante ya que esto tiene efecto sobre la retención de la hume-

TABLA IIT.8 COMPOSICION DE DIFERENTES ESQUILMOS AGRICOLAS *
(Base seca)

| COMPONENTE | RASTROJO DE MAIZ % | CASCARILLA DE ARROZ % | BAGAZO DE CAÑA % | OLOTE DE MAIZ % |
|--------------|--------------------------|-----------------------------|------------------------|-----------------------|
| CARBH. SOL | 0.839 | 0.48 | 8.11 | 3.15 |
| HEMICELULOSA | 36.01 | 30.72 | 44.31 | 42.28 |
| CELULOSA | 28.18 | 19.42 | 26.89 | 17.74 |
| LIGNINA | 14.06 | 19.18 | 15.31 | 10.47 |
| CENIZAS | 4.98 | 19.06 | 2.12 | 3.12 |
| TOTAL % | <u>84.07</u> | <u>88.86</u> | <u>96.74</u> | <u>76.76</u> |

* El tamaño de partículas: mallas 18 y 100

dad y sobre la aereación. Se realizaron pruebas de tamización para una muestra pequeña y representativa; de esta forma se homogeneizaron las condiciones para experimentos posteriores, las muestras que se tomaron fueron representativas y la manipulación del material se facilitó. Se tomaron las muestras de rastrojo de maíz, cascarilla de arroz y bagazo de caña y pasándolas por tamices de diferentes tamaños, se determinó el porcentaje de material retenido en cada malla.

En la tabla III.9, se observa que entre las mallas 35 y 100 se retiene el mayor porcentaje de material molido. De acuerdo a esto se decidió que este era el tamaño de partícula conveniente, además de ser de un tamaño pequeño. Considerando que para tener un buen desarrollo del hongo, se requiere una humedad óptima de 70% (D. S. Kim, 1980). Se procedió a determinar los porcentajes de espacio vacío a diferentes contenidos de humedad, con objeto de evitar un exceso de agua y aereación deficiente.

Determinación del porcentaje de espacio vacío del rastrojo de maíz:

Del tamaño de partícula seleccionado anteriormente, se procedió a determinar el porcentaje de humedad máximo que el rastrojo de maíz retiene, sin alcanzar condiciones de anaerobiosis. Para ello se hizo una curva de densidad en función del porcentaje de humedad, con lo que se determinó el porcentaje de humedad máximo y el porcentaje de espacio vacío. La curva se realizó midiendo el volumen con una probeta de 100 ml. Se determinaron dos densidades, una de un volumen compactado y otra con un volumen sin compactar. Los resultados se muestran en la tabla III.10.

TABLA III.9 DISTRIBUCION DE TAMAÑOS LE PARTICULAS DE LOS MATERIALES
LIGNOCELULOSICOS (Molidos)

| PORCENTAJE DE MATERIAL RETENIDO | | | |
|---------------------------------|------------------|---------------------|----------------|
| MALLA (NO.) | RASTROJO DE MAIZ | CASCARILLA DE ARROZ | BAGAZO DE CAÑA |
| 18 | 11.65 | 2.35 | - |
| 20 | 5.05 | 4.70 | 1.91 |
| 35 | 30.53 | 27.02 | - |
| 80 | - | - | 88.56 |
| 100 | 43.31 | 50.0 | 9.54 |
| 150 | 5.81 | 12.27 | - |
| 150 | 3.65 | 3.62 | |

TABLA III.10 DETERMINACION DE LA DENSIDAD Y PORCENTAJE DE ESPACIO VACIO DEL RASTROJO DE MAIZ
(MALLAS 18-100)

| % Humedad | (g) Peso | Volúmen sin compactar (ml) | Volúmen com- pactado (ml) | sin com- pactar (g/ml) | compac- tada (g/ml) | % Espacio vacío |
|--------------|-------------|-------------------------------|------------------------------|---------------------------|------------------------|--------------------|
| 0 | 4.96 | 35 | 25 | 0.1458 | 0.1984 | 91 |
| 20 | 5.83 | 40 | 20 | 0.1458 | 0.2915 | 84.55 |
| 40 | 8.53 | 42 | 20 | 0.2033 | 0.4270 | 69.40 |
| 60 | 11.53 | 44 | 20 | 0.2621 | 0.5765 | 56 |
| 70 | 14.80 | 40 | 20 | 0.3700 | 0.7400 | 39.70 |
| 71.4 | 15.40 | 40 | 20 | 0.3850 | 0.7700 | 36.70 |
| 80 | 22.20 | 40 | 22* | 0.5550 | 1.0091 | 11.54 |
| 90 | 42.73 | 42 | 30.40 | 1.0174 | 1.4243- 1.0683 | 11.6 |

* Empieza a haber separación de agua en el momento de compactar.

De los resultados obtenidos hasta un 71.4% de humedad, el rastrojo de maíz logra todavía absorber el agua, siendo esta última, la adecuada para el desarrollo del hongo; así mismo se observó que no hubo apelmazamiento del sustrato, por lo que se facilita la difusión de O_2 en el medio impidiéndose la anaerobiósis. (Figura III.8)

Se concluye que el tamaño de partícula adecuado se encuentra entre las mallas 35 y 100 y el porcentaje de humedad de 71.4 con un porcentaje de espacio vacío de 36.70. El porcentaje de espacio vacío se obtuvo restando el volumen real al volumen aparente del rastrojo de maíz no compactado, dividiendo entre el volumen real.

3. ESTUDIO DE LOS PATRONES DE DEGRADACION DEL RASTROJO DE MAIZ POR PLEUROTUS OSTREATUS

Para poder determinar las condiciones a las que el hongo (P. ostreatus) es capaz de degradar una mayor cantidad de lignina, se estudió el efecto de:

- El procedimiento de inoculación
- El mezclado del sustrato después de un período de inoculación inicial.
- El tratamiento térmico del sustrato.
- Las condiciones de aereación durante la incubación.

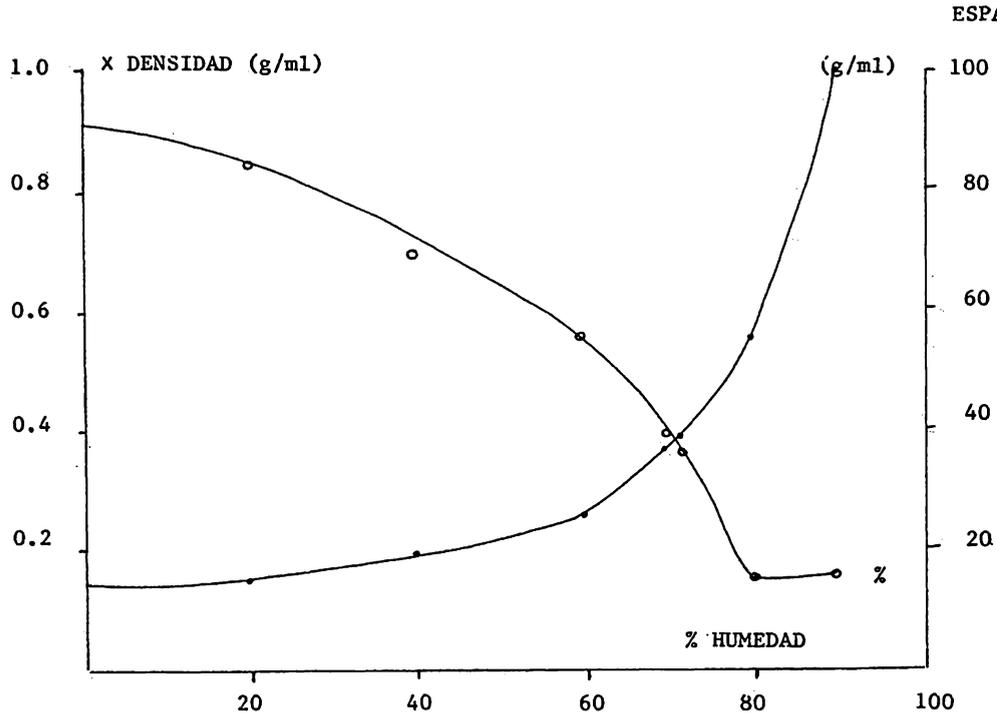


FIG. III.8 % HUMEDAD VS DENSIDAD Y VS ESPACIO VACIO

3.1 MODELO EXPERIMENTAL INICIAL.

Se realizó un experimento inicial en el que se emplearon las condiciones que se creyeron más pertinentes, tomando en consideración la bibliografía revisada. En este experimento se pretendía únicamente conocer las características de crecimiento de las diferentes cepas de P. ostreatus sobre el rastrojo de maíz y medir su capacidad de degradación de lignina, celulosa y hemicelulosa. No se esperaban resultados completamente satisfactorios sino únicamente se buscaba construir un modelo del cual partir y hacer modificaciones pertinentes para lograr el objetivo planteado.

La manera como se preparó el sustrato así como las características del inóculo, se describieron en el capítulo de materiales y métodos. Una vez preparado el rastrojo de maíz, se esterilizó por 30 min. en autoclave y a una presión de 1.1 Kg/cm^2 (la mayoría de los autores consideran las mismas condiciones de esterilización para los sustratos empleados en sus estudios (Zadrazil, 1980). Posteriormente se colocaron tres inóculos en la superficie del sustrato. De esta forma se prepararon y sembraron 12 medios para cada cepa de P. ostreatus, incubándose de acuerdo a como se señala en Materiales y Métodos, a los 14 días de haber sido inoculados; se observó su desarrollo (Tabla III.11), analizándose la composición de los sustratos (carbohidratos solubles, hemicelulosa, celulosa, lignina y cenizas) de las cepas que presentaron un desarrollo regular. (Tabla III.12) De la primera tabla se observa que de las cepas B, F.B., P, P.Q., y 8x3, solo en 2 de los 12 sustratos sembrados, se presentó de-

Tabla III.11 Características de crecimiento de las cepas de Pleurotus ostreatus en el rastrojo de maíz después de 14 días de incubación.

| Cepa | # de frascos con crecimiento * | Tipo de micelio | Crecimiento | |
|------|--------------------------------|---|-------------|--|
| | | | Intensidad | Características |
| B | 2 | extendido algodonoso | regular | penetración en el sustrato, expansión por las paredes del frasco |
| FE | 1 | extendido algodonoso | escaso | superficial |
| FB | 2 | extendido algodonoso | regular | penetración en el sustrato |
| F-2 | 1 | extendido algodonoso | escaso | superficial y sobre el micelio |
| H-1 | 1 | ext. algod. | escaso | superficial |
| P | 2 | compacto algodonoso | regular | interno |
| PQ | 2 | compacto algodonoso | regular | penetración en el sustrato |
| PV | 1 | ext. algod. | escaso | superficial |
| 8X3 | 2 | ext. en forma algodonosa muy fina | regular | superficial con escasa tendencia a penetrar en el sustrato. |

* El número inicial de frascos fue de 12 para cada cepa.

TABLA III.12 COMPOSICION Y PERDIDA DE LOS COMPONENTES DEL RASTROJO DE MAIZ INOCULADO CON CEPAS PLEUROTUS OSTREATUS. DESPUES DE 14 DIAS DE INCUBACION (CONDICIONES DE ACUERDO A LA SECCION 3.1)

| COMPONENTES | CONTROL* | CEPAS PLEUROTUS OSTREATUS | | | | |
|----------------|----------|---------------------------|--------|--------|-------|-------|
| | | B | FB | P | PQ | 8X3 |
| Carb. Solubles | 7.38 | 3.61 | 3.43 | 3.21 | 5.66 | 4.18 |
| Hemicelulosa | 37.60 | 39.55 | 39.22 | 49.73 | 35.77 | 30.61 |
| Celulosa | 27.29 | 31.53 | 32.84 | 34.85 | 30.54 | 29.48 |
| Lignina** | 20.38 | 21.71 | 20.97 | 21.37 | 19.82 | 20.15 |
| Cenizas | 6.86 | 6.00 | 6.13 | 6.65 | 7.61 | 7.47 |
| %Total | 99.51 | 102.4 | 102.59 | 115.81 | 99.30 | 91.89 |

| PORCENTAJE DE PERDIDA DE LOS COMPONENTES | | | | | | |
|--|--|-------|-------|-------|-------|-------|
| Carb. Solubles | | 51.08 | 53.52 | 56.50 | 30.89 | 47.99 |
| Hemicelulosa | | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 14.49 | 25.24 |
| Celulosa | | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.80 |
| Lignina** | | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 12.34 | 9.21 |
| Peso*** | | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 9.86 | 8.17 |

* El control representa el analisis del rastrojo de maiz después del tratamiento térmico y previo a la inoculación.

** La determinación de lignina fue únicamente corregida por contenido de cenizas.

*** La pérdida del peso total del sustrato fue calculada asumiendo una base constante de cenizas

sarrollo, llegando a penetrar completamente el micelio en el sustrato. Sin embargo, a pesar de esa penetración se encontró que B, F.B. y P, no causaron una degradación apreciable sobre alguno de los componentes del sustrato (Tabla III.12), mientras que las cepas P.Q. y 8x3 degradaron ligeramente hemicelulosa y lignina.

La falta de homogeneidad en el desarrollo del micelio, indicaba que las condiciones de experimentación no eran todavía las adecuadas para asegurar una degradación considerable de sustrato.

3.2 PROCEDIMIENTO DE INOCULACION

El sustrato preparado de igual forma que en el experimento anterior fue ahora inoculado repartiendo 3 inóculos en el interior del sustrato y otros 4 sobre la superficie del mismo. Para este experimento se utilizaron solamente las cepas B, P, PQ, 8x3 y F.B., ya que éstas fueron las únicas que presentaron un desarrollo considerable en el experimento anterior. A los 21 días de incubación se observaron diferencias en el desarrollo del micelio entre sustratos inoculados por la misma cepa. Se decidió analizar el sustrato donde se presentaba menor y mayor desarrollo, para poder determinar una eventual relación entre el desarrollo del micelio y la degradación de alguno de los componentes del material lignocelulósico. La cepa F.B. no fue analizada por no presentar desarrollo en el momento del análisis. En la tabla III.13 se muestran los porcentajes de pérdida correspondientes a cada uno de los componentes del sustrato. La degradación de lignina fue nula, a excepción del sustrato donde la cepa

Tabla 111.13 Composición y pérdida de los componentes del rastrojo de maíz inoculados con las cepas de Pleurotus ostreatus después de 21 días de incubación: (condiciones de acuerdo a la sección 3.2).

| Componentes | Control | Cepas de <u>Pleurotus ostreatus</u> | | | | | | | |
|----------------|-------------|-------------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | | B++ | B* | P++ | P+ | PQ++ | PQ+ | 8X3++ | 8X3+ |
| Carb. solubles | 8.91 | 2.71 | 8.28 | 4.97 | 6.56 | 2.73 | 7.46 | 2.95 | 7.29 |
| Hemicelulosa | 31.60 | 27.95 | 52.78 | 51.25 | 31.23 | 29.47 | 30.38 | 32.47 | 31.16 |
| Celulosa | 32.35 | 31.96 | 26.26 | 34.28 | 30.04 | 32.51 | 29.32 | 33.90 | 34.18 |
| Lignina | 17.86 | 20.12 | 20.05 | 20.53 | 20.06 | 16.28 | 20.47 | 19.71 | 19.55 |
| Cenizas | <u>6.74</u> | <u>7.50</u> | <u>7.70</u> | <u>7.40</u> | <u>7.10</u> | <u>7.17</u> | <u>7.45</u> | <u>7.38</u> | <u>7.11</u> |
| % Total | 97.46 | 90.24 | 115.07 | 118.43 | 95.00 | 88.26 | 95.08 | 96.41 | 99.20 |

Porcentajes de pérdida

| | | | | | | | | |
|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Carb. solubles | 72.66 | 18.66 | 49.20 | 30.11 | 71.20 | 24.25 | 69.76 | 22.44 |
| Hemicelulosa | 20.51 | ND | ND | 6.18 | 12.34 | 13.02 | 6.16 | 6.52 |
| Celulosa | 11.21 | 28.95 | 3.49 | 11.85 | 5.54 | 18.00 | 4.29 | 0.00 |
| Lignina | 0.00 | 1.74 | 0.00 | 0.00 | 14.32 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| Peso | 10.13 | 12.47 | 8.92 | 5.07 | 6.00 | 9.53 | 8.67 | 5.20 |

ND. no determinado

++ mayor desarrollo de micelio . + menor desarrollo de micelio.

PQ presentó mayor desarrollo, teniendo un porcentaje de pérdida de lignina de 14.32. La degradación de lignina en el sustrato donde presentó menor desarrollo la cepa B fue mínima (1.74%).

En lo que respecta a la degradación de celulosa, en general, los sustratos donde las cepa B, P y P.Q. presentaron menor desarrollo, tuvieron mayor degradación de celulosa que en los sustratos donde estas mismas cepas presentaron mayor desarrollo. La degradación de hemicelulosa fue baja y similar entre la mayoría de las cepas, independientemente de su grado de desarrollo..

La degradación de carbohidatos solubles fue mayor en los sustratos con mayor desarrollo de micelio para cada una de las cepas. Estas durante su desarrollo necesitaron de una fuente de carbono más directa proporcionada por los carbohidatos solubles. En casi todos los casos, los sustratos donde las cepas presentaron menor desarrollo se registró una degradación mayor de celulosa, pero menor degradación de carbohidatos solubles. Sin embargo al considerar conjuntamente proporciones de celulosa y carbohidatos solubles que constituyen el sustrato degradado en cada caso, se obtienen valores similares entre las cepas de mayor y menor desarrollo. Por ejemplo, al sumar las composiciones de carbohidatos solubles y celulosa de los sustratos donde la cepa B presentó mayor y menor desarrollo se tiene una proporción similar. El sustrato donde la cepa B presentó mayor desarrollo tuvo en su composición 2.71% de carbohidatos solubles y 31.96% de celulosa sumando 34.67%, el sustrato donde esta misma cepa presentó menor desarrollo tuvo en su composición 8.28% de carbohidatos solubles y 26.26% de celulosa sumando 34.54%.

Esto indica que posiblemente la celulosa degradada y no utilizada aún por el hongo para su desarrollo está siendo cuantificada en la fracción soluble.

A los 56 días de incubación se realizó un segundo análisis de los sustratos donde se presentó un mayor desarrollo. Para la cepa 8x3 fue posible analizar muestras de dos diferentes sustratos, mientras que para las cepas F, F.B., P y P.Q., solo se efectuó el análisis de una sola muestra, ya que en la mayoría de los sustratos el desarrollo fue escaso. Los resultados del análisis se muestran en la tabla III.14 . Con las cepas F.B. y B no se registró una degradación de lignina, aún en el período mayor de incubación. Las cepas P, P.Q. y 8x3 degradaron más celulosa y hemicelulosa, que en el período de incubación de 21 días. A pesar de que el número de inóculos en el sustrato fue mayor que en el experimento anterior, el porcentaje de pérdida de lignina fue similar, habiendo únicamente una mayor degradación de carbohidratos en general, no teniéndose aún las condiciones adecuadas como para alcanzar un desarrollo homogéneo del micelio en todos los cultivos.

3.3 EFECTO DEL MEZCLADO DEL SUSTRATO.

En experimentos realizados por Kirk (1976), se observó que los cultivos inoculados con hongos degradadores de lignina deben permanecer estáticos por lo menos durante los primeros 10 días de incubación, para permitir que se establezca el contacto necesario entre la lignina y el micelio. Posteriormente los cultivos pueden ser agitados para incremen-

Tabla 111.14 Composición y pérdida de los componentes del rastrojo de maíz inoculado con las cepas de Pleurotus ostreatus después de 56 días de incubación (condiciones de acuerdo a la sección 3.2)

121

| Componente | Control | Cepas de <u>Pleurotus ostreatus</u> | | | | |
|----------------|-------------|-------------------------------------|-------------|-------------|-------------|---------------|
| | | B | FB | P | PQ | 8X3 * |
| Carb. solubles | 8.91 | 3.23 | 5.26 | 3.99 | 3.93 | 5.19 + |
| Hemicelulosa | 31.60 | 31.51 | 37.88 | 44.27 | 22.39 | 37.76 + |
| Celulosa | 32.35 | 36.51 | 33.10 | 34.24 | 33.80 | 35.10 + |
| Lignina | 17.86 | 21.07 | 20.79 | 18.90 | 15.06 | 15.83 + |
| Cenizas | <u>6.74</u> | <u>7.37</u> | <u>7.75</u> | <u>8.70</u> | <u>8.47</u> | <u>9.21 +</u> |
| % Total | 97.46 | 99.69 | 104.78 | 110.10 | 87.10 | 103.04 |

Porcentajes de pérdida

| | | | | | |
|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Carb. solubles | 66.85 | 48.66 | 65.31 | 65.17 | 57.36 |
| Hemicelulosa | 8.81 | 4.25 | 0.00 | 43.63 | 12.48 |
| Celulosa | 0.00 | 11.01 | 18.00 | 16.63 | 20.67 |
| Lignina | 0.00 | 1.24 | 18.02 | 17.71 | 35.17 |
| Peso | 8.55 | 13.03 | 22.53 | 20.31 | 26.78 |

* Promedio de 2 determinaciones.

tar la difusión del oxígeno al sustrato, observándose que de ésta manera se incrementa la degradación de lignina.

Basándose en estos estudios, se decidió realizar el experimento anterior utilizando las cepas que habían presentado un menor desarrollo (F-2, F-E y PV). Después de 14 días de incubación se mezcló el sustrato con una varilla de vidrio procurando homogeneizar el material lo más posible. Los frascos con el sustrato fueron nuevamente cubiertos con sus tapas originales e incubados a las mismas condiciones. Después de 21 días de haberse efectuado el mezclado, ninguno de los 12 frascos inoculados con la cepa FE presentó desarrollo. En solo uno de los 12 frascos inoculados con la cepa PV se desarrolló micelio cubriendo en este caso completamente el sustrato. En sustratos inoculados con la cepa F-2, se presentó desarrollo en 6 de los 12, siendo este característico de la cepa, por presentar pequeñas partes de micelio distribuidas en todo el sustrato y no el micelio continuo característico de las otras cepas.

El desarrollo únicamente de la cepa F-2 fue debido probablemente a que el tiempo de penetración del micelio no había sido suficiente como para que el micelio de las cepas PV y FE se pudieran fijar al sustrato. Es también posible que estas cepas sean más susceptibles al daño mecánico.

El sustrato inoculado con la cepa F-2 fue analizado tomando muestras de 2 frascos diferentes a los 27 y 62 días, de incubación después del mezclado. Los resultados del análisis se encuentran en la tabla III.15.

De acuerdo a los resultados se observa que en general los porcentajes de pérdida de carbohidratos solubles, hemicelulosa y celulosa se incrementaron conforme transcurre el tiempo, sin embargo los porcentajes de pér-

Tabla 111.15 Composición y pérdida de los componentes del rastrojo de maíz inoculado con la cepa F-2 a los 27 y 62 días después de que el sustrato fue mezclado.

| Componente | Control | Cepa de <i>Pleurotus ostreatus</i> F-2 | |
|----------------|-------------|--|-------------|
| | | 27 días * | 62 días * |
| Carb. solubles | 8.91 | 3.81 | 3.5 |
| Hemicelulosa | 31.60 | 28.80 | 28.08 |
| Celulosa | 32.35 | 29.74 | 32.35 |
| Lignina | 17.86 | 23.18 | 22.29 |
| Genizas | <u>6.74</u> | <u>8.24</u> | <u>9.34</u> |
| % Total | 97.46 | 93.75 | 95.55 |

Porcentajes de pérdida

| | | |
|----------------|-------|-------|
| Carb. solubles | 64.78 | 71.97 |
| Hemicelulosa | 25.65 | 34.52 |
| Celulosa | 24.60 | 27.23 |
| Lignina | 0.00 | 9.97 |
| Peso | 18.00 | 27.02 |

* Promedios de 2 determinaciones.

dida de lignina no mejoraron con respecto al experimento anterior. En conclusión el mezclado del sustrato no es conveniente a los 14 días después de la inoculación, debido a que no se obtuvo un desarrollo homogéneo del micelio. Unicamente la cepa F-2 se desarrolló después de haberse mezclado el sustrato, las otras cepas (FE y PV) tal vez no resistieron el daño mecánico.

3.4 EFECTO DEL TRATAMIENTO TERMICO SOBRE EL SUSTRATO.

En vista de que el crecimiento del micelio en el sustrato no fue homogéneo y que los porcentajes de pérdida de lignina no mejoraron notablemente, se procedió a analizar los cambios ocurridos en el rastrojo de maíz al variar las condiciones de esterilización, ya que se pensó que un tratamiento térmico fuerte sobre el sustrato probablemente produce algún compuesto tóxico que inhibe el crecimiento de los hongos, por lo que se optó a variar las condiciones de esterilización del sustrato con el objeto de obtener la homogeneización del micelio y una mayor degradación de lignina. Las variaciones en las condiciones de "esterilización" consistieron en tratamientos leves y fuertes sobre el sustrato. El más leve consistía en mantener el sustrato durante 1 hora a 65°C en una estufa. En un segundo tratamiento, el material fue colocado en un autoclave donde después de purgar durante 5 minutos, se permitió que la presión en ella alcanzara 0.1 Kg/cm² desconectando entonces inmediatamente. En un último tratamiento, se dejó que la presión subiera a 1.1 Kg/cm² en el autoclave, desconectando inmediatamente.

Para este experimento se prepararon 8 frascos con sustrato para cada uno de los tratamientos térmicos. Dos de los cuáles se analizaron químicamente y se sembraron los 6 restantes con las cepas P, B y FB (2 frascos por cepa), colocando 3 inóculos en el interior del sustrato y 4 en la superficie. La tabla III.16 muestra el desarrollo de las cepas en el sustrato a los 14 días de haber sido inculado, y la tabla III.17 la composición.

El análisis de los diferentes tratamientos térmicos muestran que no existe diferencia notable entre los porcentajes de composición del sustrato. Comparando los resultados con el blanco (sustrato sin tratamiento térmico), se observó un incremento en los porcentajes de lignina y carbohidratos solubles, sin existir cambios notables en la fracción de hemicelulosa y celulosa. El incremento hizo que los porcentajes totales subieran respecto al blanco, a consecuencia de un probable aflojamiento de las estructuras, de tal manera que se puede cuantificar mejor cada una de las fracciones.

En cuanto a las cepas sembradas, se observó (Tabla III.16) un mayor crecimiento del micelio en los sustratos que habían sufrido los dos tratamientos térmicos más fuertes.

El sustrato tratado térmicamente a 65°C durante 1 hora e inoculado con la cepa B presentó una coloración verdosa, por lo que se pensó en una posible contaminación, debido a que el tratamiento térmico no fue el suficiente como para causar una "esterilización" adecuada en el sustrato, compitiendo el hongo en estudio con los microorganismos contaminantes.

Se procedió a realizar un análisis de varianza por el método del rango, con el objeto de determinar si existían diferencias significativas entre

Tabla 111.16 Crecimiento de las cepas de Pleurotus ostreatus P, B y FB después de 14 días de incubación en rastrojo de maíz sometido a diferentes tratamientos térmicos.

| Tratamiento térmico | Cepas de <u>Pleurotus ostreatus</u> | | | | | |
|--|-------------------------------------|---|---|---|----|---|
| | P | | B | | FB | |
| Estufa 65 °C/1hr. | 5 | 2 | 3 | 4 | 5 | 4 |
| Autoclave purgar 5 min. a 0.1Kg/cm ² . | 5 | 4 | 5 | 4 | 5 | 5 |
| Autoclave hasta 1.1Kg/cm ² desconectando inmediatamente | 1 | 2 | 3 | 2 | 3 | 3 |
| Autoclave 30 min. hasta 1.1Kg/cm ² | 2 | 2 | 3 | 3 | 2 | 3 |

Clasificación del crecimiento observado del micelio en el sustrato con la siguiente escala: 1. Muy bueno, 2. Bueno, 3. Regular, 4. Malo, 5. Nulo.

Tabla 111.17 Composición del rastrojo de maíz después de diferentes tratamientos térmicos.

| Componente | Tratamiento térmico | | | | |
|----------------|---------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | Control | a | b | c | d |
| Carb. solubles | 0.84 | 6.60 | 8.03 | 8.07 | 8.90 |
| Hemicelulosa | 36.01 | 36.21 | 34.00 | 36.57 | 31.59 |
| Celulosa | 28.18 | 29.18 | 30.21 | 32.70 | 32.35 |
| Lignina | 14.86 | 18.12 | 18.11 | 17.27 | 17.86 |
| Cenizas | <u>5.96</u> | <u>7.19</u> | <u>6.85</u> | <u>6.45</u> | <u>6.61</u> |
| % Total | 85.85 | 97.29 | 97.18 | 100.89 | 97.34 |

nota; cada resultado es el promedio de 2 análisis.
control: rastrojo de maíz sin tratamiento térmico.
a. 1 hr. a 65°C, b. Autoclave 0.1Kg/cm², c. Autoclave 1.1Kg/cm²,
d. Autoclave 30 min. a 1.1 Kg/cm².

los crecimientos del micelio a los diferentes tratamientos térmicos. Los cálculos se presentan en el Apéndice No. 2. De donde se observa que no hay diferencia significativa entre los tratamientos 1 y 2, pero sí entre 2 y 3 y 3 y 4.

Se decidió llevar a cabo el tratamiento 2 (autoclave hasta 1.1 Kg/cm^2 de presión y desconectar inmediatamente) en los experimentos posteriores, por facilidad de manejo.

De acuerdo a los resultados obtenidos en los experimentos realizados para conocer el efecto del número de inóculos, mezclado y tratamiento térmico sobre el sustrato, se observó que con las dos primeras variaciones mencionadas, el crecimiento del micelio se favoreció ligeramente sin llegar a una homogeneidad completa aún considerando una misma cepa. En cuanto a la variación en el tratamiento térmico, se vió que el mejor tratamiento, corresponde al que se había estado empleando en los experimentos anteriores y junto con el de autoclave hasta 1.1 Kg/cm^2 de presión y desconectar inmediatamente, sin haber diferencia significativa entre ambos. Sin embargo se optó por emplear el segundo tratamiento, únicamente por facilidad de preparación del sustrato.

En conclusión: Todas las variaciones antes mencionadas al modelo experimental inicial, no permitieron un mayor desarrollo del micelio, así como tampoco una degradación de lignina apreciable, por lo que se decidió permitir la transferencia de gases al sistema.

Zadrazil (1972) reportó que el sustrato con 28% de CO₂ en volúmen favorece el desarrollo del hongo e incrementa la degradación de lignina, por lo que se procedió a elaborar calculos para determinar el contenido de CO₂ del medio.

Si se tienen 5 g. de rastrojo de maíz en un frasco de 100 ml. de capacidad, con un contenido de humedad de 71.4%, y un volúmen compactado de 20 ml, quedan por lo tanto, 80 m. de aire. Suponiendo que existe un 20% de pérdida de material durante el crecimiento del hongo P. ostreatus y suponiendo que toda esa pérdida es como CO₂. Un gramo de CO₂ producido equivale a 0.02272 moles obtenidos de la relación:

$$n_{CO_2} = \frac{1g}{44 \text{ g/g mol}}$$

Esas moles de CO₂ ejercen una presión de 7.02 atm.

$$P_{CO_2} = \frac{n_{CO_2} RT}{V}$$

$$P_{CO_2} = (0.0227273 \text{ moles}) \left(0.082054 \frac{\text{l atm}}{\text{mol}^\circ\text{K}} \right) \left(\frac{301.15^\circ\text{K}}{0.08 \text{ l}} \right) = 7.02 \text{ atm}$$

Siendo mayor que la presión atmosférica por lo que resulta imposible, lo que indica que hubo un intercambio forzoso de gases.

Considerando que el frasco estuviera bien cerrado se hicieron los siguientes cálculos.

A las condiciones de presión y temperatura a las que se trabajó en el laboratorio se calculó el número de moles de CO₂ presente en la atmósfera siendo este de 0.002496

$$n_t = \frac{P_t V_t}{RT} = \frac{0.7710526 \text{ atm } 0.08 \text{ l mol } ^\circ\text{K}}{0.082054 \text{ l atm } 301.15^\circ\text{K}} = 0.002496 \text{ moles}$$

Si el volúmen vacío que se tiene en el frasco es de 80 ml. y si la cantidad de CO₂ óptimo para el desarrollo del hongo es de 28% el volúmen ocupado de CO₂ es de 22.4 ml.

$$V_{\text{CO}_2} = X_{\text{CO}_2} V_t = \frac{n_{\text{CO}_2}}{n_t} V_t$$

$$V_{\text{CO}_2} = 80 \times \frac{28\%}{100} = 22.4 \text{ ml}$$

Conociendo el volúmen puede obtenerse el número de moles de CO₂ en el frasco siendo este de 0.00070, lo que corresponde a 0.031 g. de CO₂, siendo los gramos que podría perder el sustrato durante la fermentación.

$$n_{\text{CO}_2} = \frac{0.0224 \text{ l } (0.0024963 \text{ moles})}{0.08} = 0.00070 \text{ moles}$$

$$g_{\text{CO}_2} = 0.031 \text{ gramos}$$

Según los resultados obtenidos se tiene que para un contenido de CO₂ de 28% solo se lograría una pérdida de peso de 0.62%, por lo que se requiere de un medio capaz de intercambiar CO₂ y O₂. Por lo anterior las tapas originales del frasco fueron cambiadas por placas de hule espuma de 0.5 cm. de grosor, cubiertas con papel aluminio.

4. DETERMINACION DE PATRONES DE DEGRADACION DE LA LIGNOCELULOSA POR CEPAS DE P. OSTREATUS.

4.1 PRIMER EXPERIMENTO.

De acuerdo a los resultados obtenidos durante los experimentos preliminares, se seleccionaron las condiciones para la realización de los experimentos de degradación. El tratamiento térmico del sustrato consistió en permitir que el autoclave alcanzara la presión de 1.1 Kg/cm^2 desconectando inmediatamente, retirando los sustratos de la misma hasta que la presión había descendido a la atmosférica. Se decidió realizar la inoculación del rastrojo de maíz con 3 inóculos repartidos en el interior del sustrato y 4 en la superficie del mismo. Los inóculos consistieron de cubos de $0.5 \text{ cm} \times 0.5 \text{ cm}$. de lado, cortados del margen de una colonia en crecimiento en medio de agar-malta. Los frascos se cubrieron con una placa de hule espuma de $1/2 \text{ cm}$. de grosor, colocandose encima de ésta papel aluminio. La incubación se realizó a $28-30^\circ\text{C}$. Las cepas seleccionadas para esta parte del estudio fueron B, FB, P, PQ y 8x3 por haber sido las que en los experimentos preliminares presentaron mayor desarrollo y degradación de lignina.

Se sembraron 6 frascos por cepa determinándose los cambios de composición del sustrato a los 20, 42 y 73 días de haberse inoculado. Estos períodos de incubación se escogieron ya que en los experimentos preliminares se observó que a los 14 días no se detectó una degradación de lignina apreciable. Teniéndose en cuenta que en éste experimento se tenían mejores condiciones para la degradación, se permitió un crecimiento más prolonga

do para detectar los cambios ocurridos. Para los análisis del sustrato, se tomaron de 2 frascos por cada cepa y cada uno se analizó por duplicado, teniéndose en total 4 resultados para cada tiempo de muestreo.

En las tablas III.18, III.19 y III.20 se reporta la composición del rastrojo de maíz en base seca y la pérdida de cada componente como un promedio de los 4 resultados obtenidos a los 20, 42 y 73 días de incubación respectivamente.

Se puede observar que existe una pérdida considerable de los componentes del rastrojo de maíz analizados (carbohidratos solubles, hemicelulosa, celulosa y lignina). La pérdida de carbohidratos solubles de las 5 cepas a los 20 días está en el rango de 67.44 a 72.62%; de 20 a 42 días está en el rango de 65.19 y 69.58 y se observa que la pérdida disminuye en el caso de las cepas P, 8x3 y B. En el caso de las cepas FB y PQ se tiene un ligero incremento en la pérdida de carbohidratos aumentando de 72.44 a 78.0 y de 67.44 a 69.0 respectivamente. En el período de incubación de 42 a 73 días los porcentajes de pérdida de carbohidratos solubles disminuye para todas las cepas encontrándose en un intervalo de 65.19 a 78.0

La pérdida de hemicelulosa en los primeros 20 días se incrementa en un intervalo de 22.18 a 35.12; de 20 a 42 días se alcanza una pérdida entre 38.15 y 62.63; en el período de 42 a 73 días se alcanza una pérdida de hemicelulosa entre 54.18 y 75.2.

La pérdida de celulosa en el inicio de la incubación hasta los 20 días es similar en las 5 cepas encontrándose en un intervalo de 21.63 a 26.41; de 20 a 42 días la pérdida de celulosa se incrementa ligeramente hasta un intervalo de 24.86 y 29.75 para el caso de las cepas PQ, B, P y 8x3. En

TABLA III.18 COMPOSICION Y PERDIDA DE LOS COMPONENTES DEL RASTROJO DE MAIZ INOCULADO CON CEPAS DE PLEUROTUS OSTREATUS DESPUES DE 20 DIAS DE INCUBACION (CONDICIONES DE ACUERDO A LA SECCION 4.1)

| COMPONENTES | CONTROL | CEPAS DE PLEUROTUS OSTREATUS | | | | |
|----------------|---------|------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| | | B | FB | P | PQ | 8X3 |
| Carb. Solubles | 8.07 | 2.18 | 2.76 | 3.08 | 3.50 | 3.03 |
| | | +0.81 | +0.58 | +0.22 | +0.81 | +0.30 |
| Hemicelulosa | 36.58 | 36.73 | 33.66 | 32.21 | 38.29 | 36.15 |
| | | +0.62 | +0.23 | +0.19 | +0.88 | +1.10 |
| Celulosa | 32.70 | 31.94 | 33.75 | 34.04 | 33.07 | 32.32 |
| | | +0.86 | +0.75 | +0.32 | +0.39 | +1.00 |
| Lignina | 18.70 | 12.31 | 13.60 | 14.79 | 13.02 | 12.78 |
| | | +0.65 | +0.74 | +0.30 | +0.61 | +0.40 |
| Cenizas | 6.45 | 8.60 | 8.54 | 8.85 | 8.60 | 8.41 |
| | | +0.34 | +0.67 | +0.63 | +0.17 | +0.41 |
| % TOTAL | 102.33 | 91.75 | 92.30 | 97.11 | 96.47 | 96.89 |

| PORCENTAJES DE PERDIDA DE LOS COMPONENTES | | | | | |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|
| Carb. Solubles | 70.57 | 72.44 | 72.62 | 67.44 | 71.15 |
| Hemicelulosa | 24.56 | 30.36 | 35.12 | 22.18 | 23.88 |
| Celulosa | 26.41 | 21.63 | 23.95 | 24.07 | 25.09 |
| Lignina | 50.73 | 51.34 | 48.26 | 47.67 | 47.43 |
| Peso | 24.82 | 24.04 | 26.71 | 24.92 | 23.08 |

Los resultados son el promedio de 4 analisis

TABLA III.19 COMPOSICION Y PERDIDA DE LOS COMPONENTES DEL RASTROJO DE MAIZ INOCULADO CON CEPAS DE PLEUROTUS OSTREATUS DESPUES DE 42 DIAS DE INCUBACION (CONDICIONES DE ACUERDO A LA SECCION 4.1)

| COMPONENTES | CONTROL | CEPAS DE PLEUROTUS OSTREATUS | | | | |
|----------------|---------|------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | | B | FB | P | PQ | 8X3 |
| Carb. Solubles | 8.07 | 2.95 | 2.52 | 2.90 | 3.2 | 3.81 |
| | | <u>+0.13</u> | <u>+0.13</u> | <u>+0.56</u> | <u>+0.14</u> | <u>+0.19</u> |
| Hemicelulosa | 36.58 | 26.69 | 19.46 | 22.96 | 28.63 | 28.29 |
| | | <u>+1.35</u> | <u>+0.30</u> | <u>+0.32</u> | <u>+0.98</u> | <u>+0.46</u> |
| Celulosa | 32.70 | 28.41 | 25.04 | 28.91 | 29.39 | 31.71 |
| | | <u>+0.60</u> | <u>+0.47</u> | <u>+0.41</u> | <u>+0.15</u> | <u>+0.42</u> |
| Lignina | 18.70 | 11.16 | 9.11 | 9.24 | 12.26 | 10.56 |
| | | <u>+0.73</u> | <u>+0.50</u> | <u>+0.30</u> | <u>+0.31</u> | <u>+0.46</u> |
| Cenizas | 6.45 | 7.75 | 9.18 | 7.33 | 8.24 | 8.76 |
| | | <u>+1.09</u> | <u>+0.45</u> | <u>+0.17</u> | <u>+0.80</u> | <u>+0.22</u> |
| % Total | 102.33 | 76.78 | 65.34 | 70.33 | 80.82 | 81.26 |

PORCENTAJES DE PERDIDA DE COMPONENTES

| | | | | | |
|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Carb. Solubles | 69.58 | 78.00 | 68.48 | 69.00 | 65.19 |
| Hemicelulosa | 38.15 | 62.60 | 44.71 | 46.43 | 43.06 |
| Celulosa | 27.13 | 46.28 | 24.88 | 29.75 | 28.57 |
| Lignina | 49.74 | 65.67 | 56.52 | 48.74 | 58.43 |
| Peso | 15.64 | 29.47 | 11.86 | 21.08 | 26.26 |

Los resultados son el promedio de 4 analisis

TABLA III.20 COMPOSICION Y PERDIDA DE LOS COMPONENTES DEL RASTROJO DE MAIZ INOCULADO CON CEPAS DE PLEUROTUS OSTREATUS DESPUES DE 73 DIAS DE INCUBACION. (CONDICIONES DE ACUERDO A LA SECCION 4.1)

| COMPONENTES | CONTROL | CEPAS DE PLEUROTUS OSTREATUS | | | | |
|----------------|---------|------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| | | B | FB | P | PQ | 8X3 |
| Carb. Solubles | 8.07 | 4.13 | 5.71 | 4.28 | 3.74 | 5.28 |
| | | +0.54 | +0.41 | +0.22 | +0.20 | +0.55 |
| Hemicelulosa | 36.58 | 20.18 | 18.24 | 21.36 | 19.75 | 19.29 |
| | | +0.59 | +0.20 | +0.00 | +0.15 | +0.20 |
| Celulosa | 32.70 | 30.11 | 23.71 | 30.08 | 29.51 | 32.86 |
| | | +0.46 | +0.35 | +1.17 | +0.10 | +0.32 |
| Lignina | 18.70 | 12.66 | 11.60 | 12.61 | 13.05 | 11.10 |
| | | +1.04 | +0.41 | +0.39 | +0.27 | +0.47 |
| Cenizas | 6.45 | 8.32 | 12.97 | 8.22 | 9.11 | 8.05 |
| | | +0.92 | +0.04 | +0.06 | +0.22 | +0.15 |
| % TOTAL | 102.33 | 75.37 | 72.21 | 76.54 | 75.15 | 76.57 |

PORCENTAJES DE PERDIDA DE COMPONENTES

| | | | | | |
|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Carb. Solubles | 59.95 | 64.81 | 58.39 | 67.17 | 47.58 |
| Hemicelulosa | 56.74 | 75.20 | 54.18 | 61.79 | 57.76 |
| Celulosa | 28.35 | 63.94 | 27.83 | 36.14 | 19.39 |
| Lignina | 46.64 | 69.43 | 47.06 | 50.68 | 52.46 |
| Peso | 21.65 | 50.23 | 21.48 | 28.60 | 19.82 |

Los resultados son el promedio de 4 analisis

la cepa FB, el porcentaje de pérdida de celulosa alcanza un valor hasta de 46.28. De los 42 a 73 días de incubación, en las cepas PQ, B y P, la pérdida se incrementa ligeramente alcanzando valores de 27.82-36.14%. En el caso de la cepa FB, este incremento es muy grande hasta de un - 69.43%. En este período la cepa 8x3, presenta una disminución de la pérdida de celulosa bajando de 28.57 a 19.39%; esto puede deberse a un error en la determinación de cenizas.

La pérdida de lignina en los primeros 20 días de incubación alcanza valores de 47.43 a 51.34, en las 5 cepas.

De los 20 a los 42 días el incremento en la pérdida de este componente no es tan brusco, presentando valores en el intervalo de 48.74-65.67%. La cepa B no presenta un incremento en la pérdida de lignina en ese período. A los 73 días de incubación las cepas FB y PQ, causaron un incremento en la pérdida de lignina hasta valores de 69.18 y 50.59, respectivamente.

En lo que respecta a las cepas 8x3, B y P, se presenta una disminución en la pérdida de lignina de 58.43% a 52.46%, de 49.74% a 46.64% y de - 56.52% a 47.06% respectivamente.

En lo que respecta a la pérdida total, se observan valores de 23.0 a - 26.7% a los 20 días (Tabla III.18), mientras que a los 42 días el rango oscila entre 11.86 y 29.47%. A los 73 días el porcentaje de pérdida de terminado está entre 19.82 y 50.23%. De las figuras III.11; III.12 y III.9 se observa que el porcentaje de pérdida en el peso total disminuye para las cepas P, PQ y B a los 42 días y en la figura III. 13 la cepa 8x3 a los 73 días, la pérdida determinada está entre 19.82 y 50.23%. El que se tenga una pérdida en porciento de celulosa, lignina o de peso

total negativo en algunas de las cepas a los 42 y 73 días, indica que las condiciones experimentales no fueron siempre constantes, ya sea en las determinaciones analíticas o durante la fermentación o en ambas. Se considera que los métodos analíticos seleccionados son los adecuados así que el error es más bien experimental, debido principalmente al uso de equipo (balanzas, estufas, etc.), diferente cada vez y a las cantidades de muestra tan pequeñas que se toman para hacer dichos análisis. Las curvas obtenidas al graficar el porcentaje de pérdida de los diferentes componentes del rastrojo de maíz por las 5 cepas de P. ostreatus a los 20, 42 y 73 días de incubación se encuentran en las figuras III.14, III.15, III.16 y III.17. De acuerdo a las gráficas se puede observar un comportamiento similar entre las cepas en los primeros 20 días de incubación.

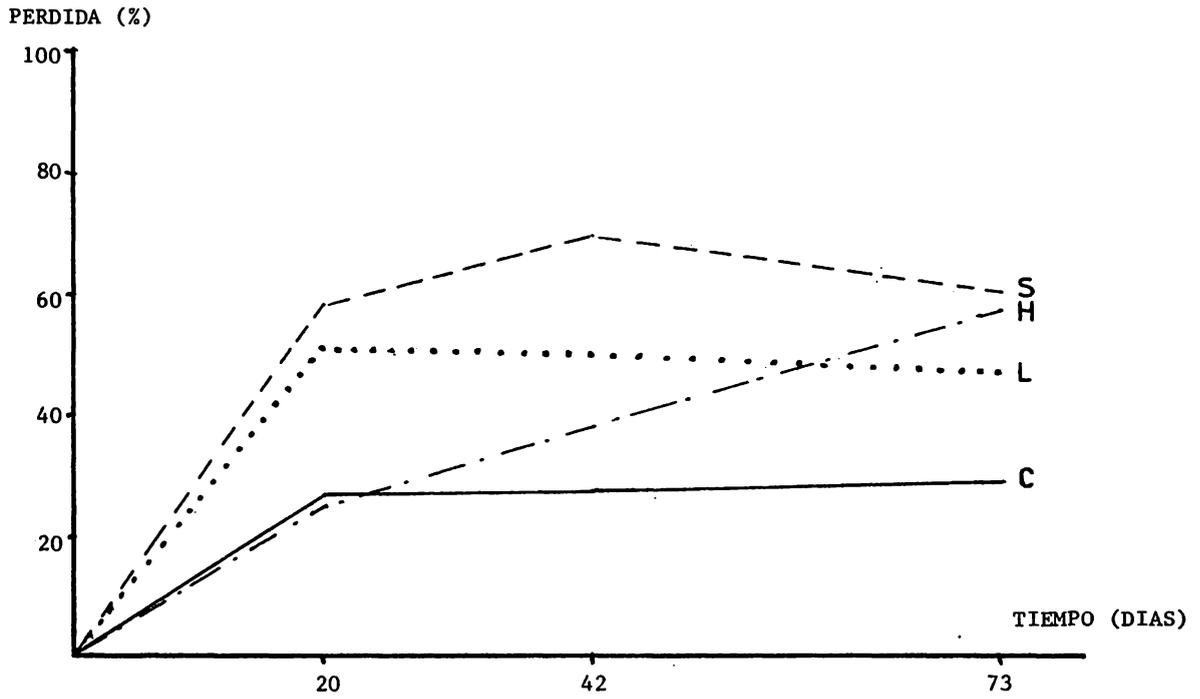


FIG. III.9 % DE PERDIDA DE LOS DIFERENTES COMPONENTES DEL RASTROJO DE MAIZ POR L.
 CEPA 'B' A LOS 20, 42 Y 73 DIAS.

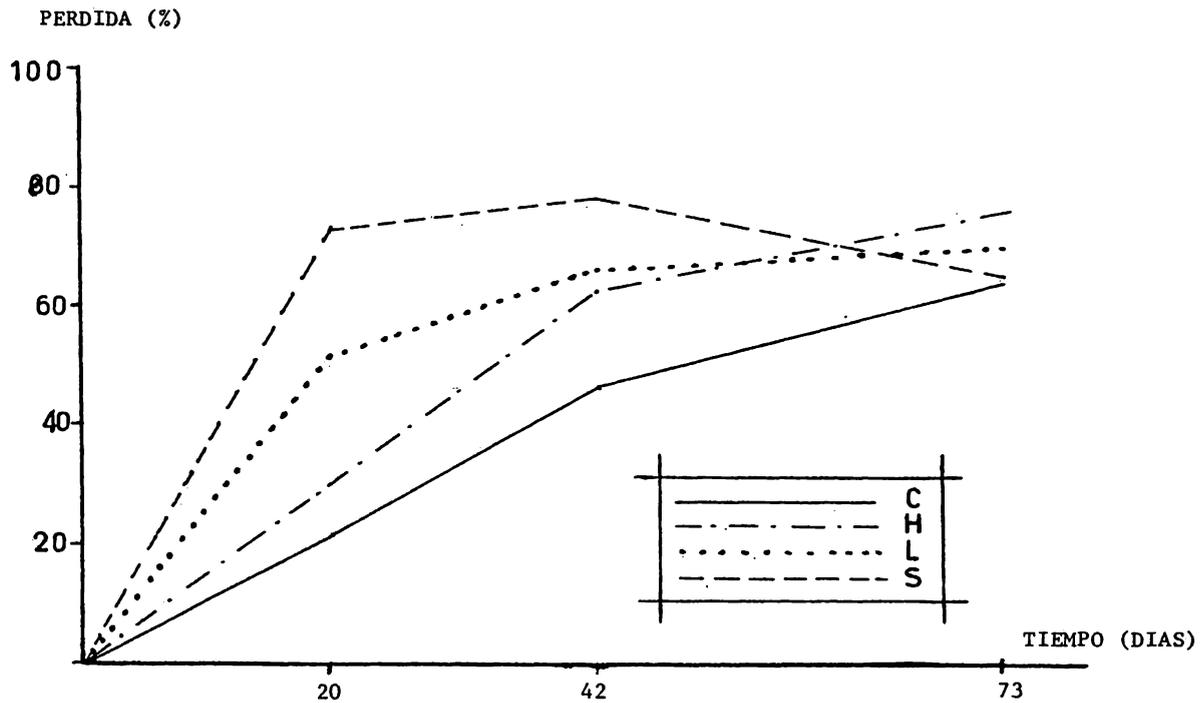


FIG. III. 10% DE PERDIDA DE LOS DIFERENTES COMPONENTES DEL RASTROJO DE MAIZ POR LA CEPA 'FB' A LOS 20, 42 Y 73 DIAS.

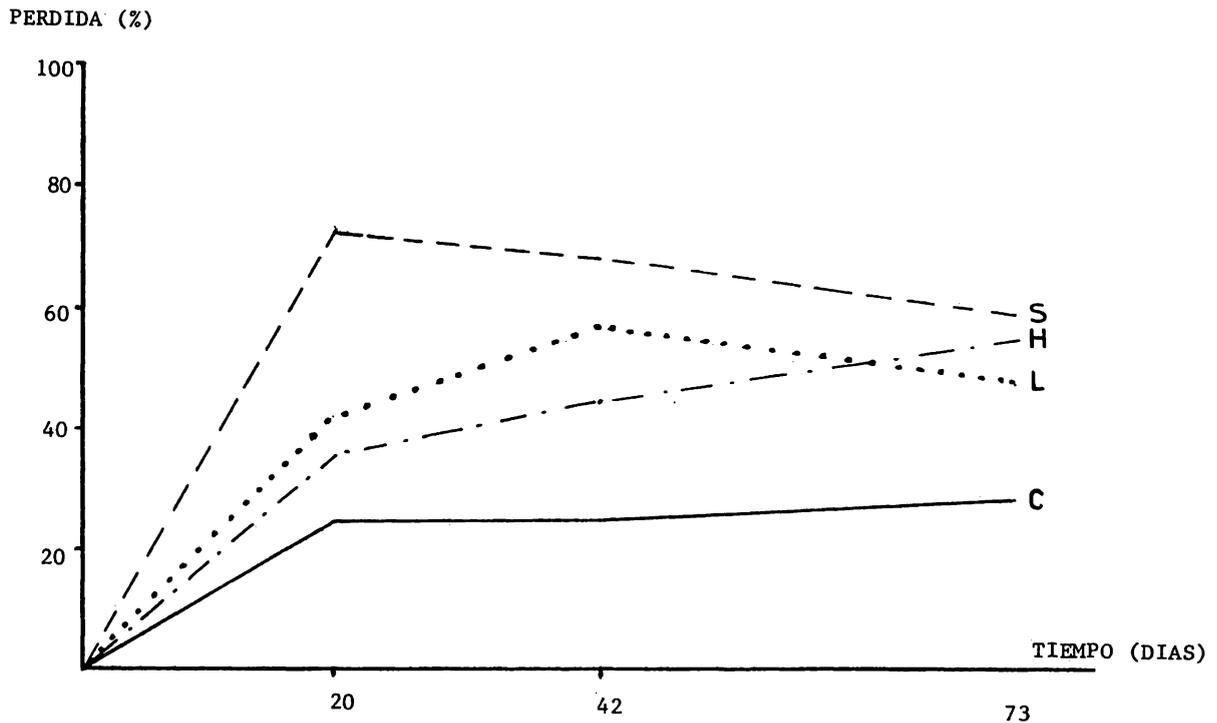


FIG.III.11% DE PERDIDA DE LOS DIFERENTES COMPONENTES DEL RASTROJO DE MAIZ POR LA CEPA 'P' A LOS 20, 42 y 73 DIAS.

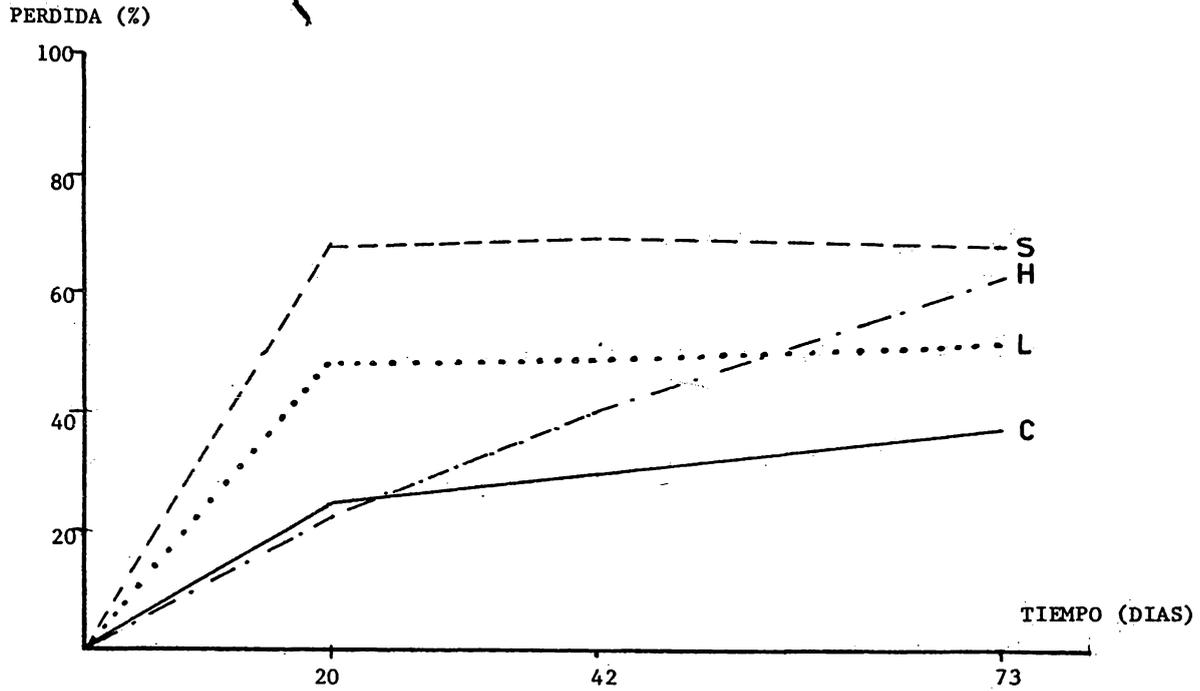


FIG.III.12% DE PERDIDA DE LOS DIFERENTES COMPONENTES DEL RASTROJO DE MAIZ POR LA CEPA 'PQ' A LOS 20, 42 Y 73 DIAS.

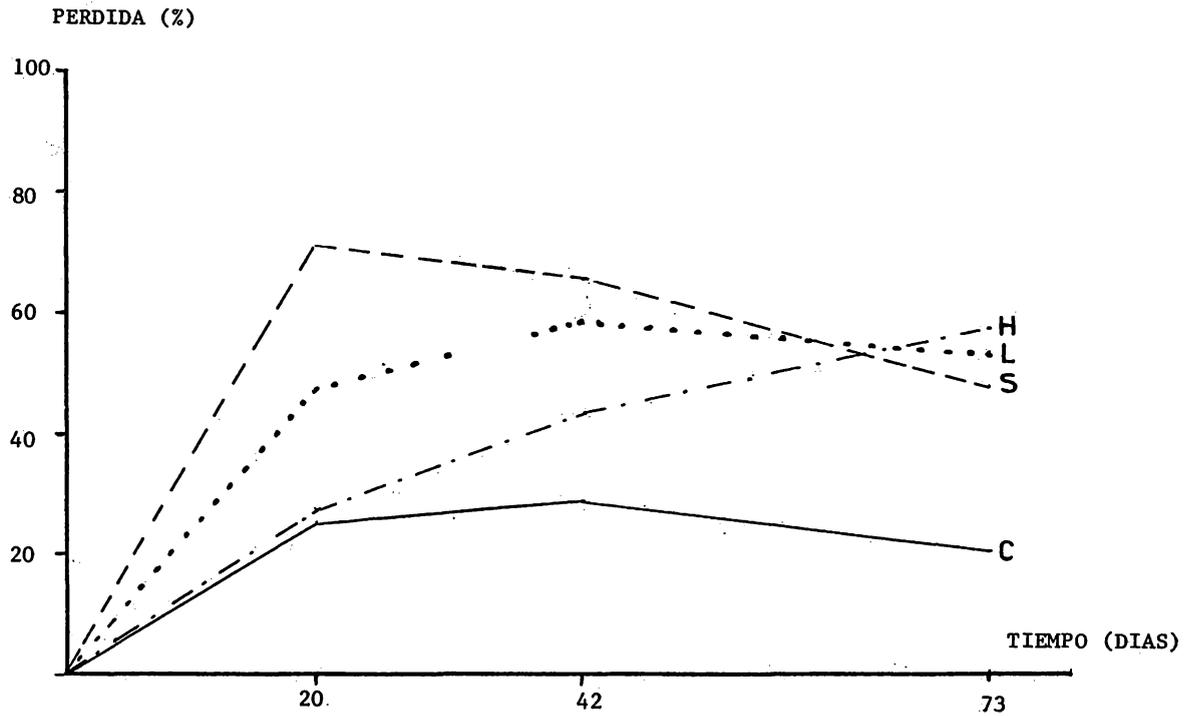


FIG.III.13% DE PERDIDA DE LOS DIFERENTES COMPONENTES DEL RASTROJO DE MAIZ POR LA CEPA '8x3' A LOS 20, 42 Y 73 DIAS.

% PERDIDA SOLUBLES

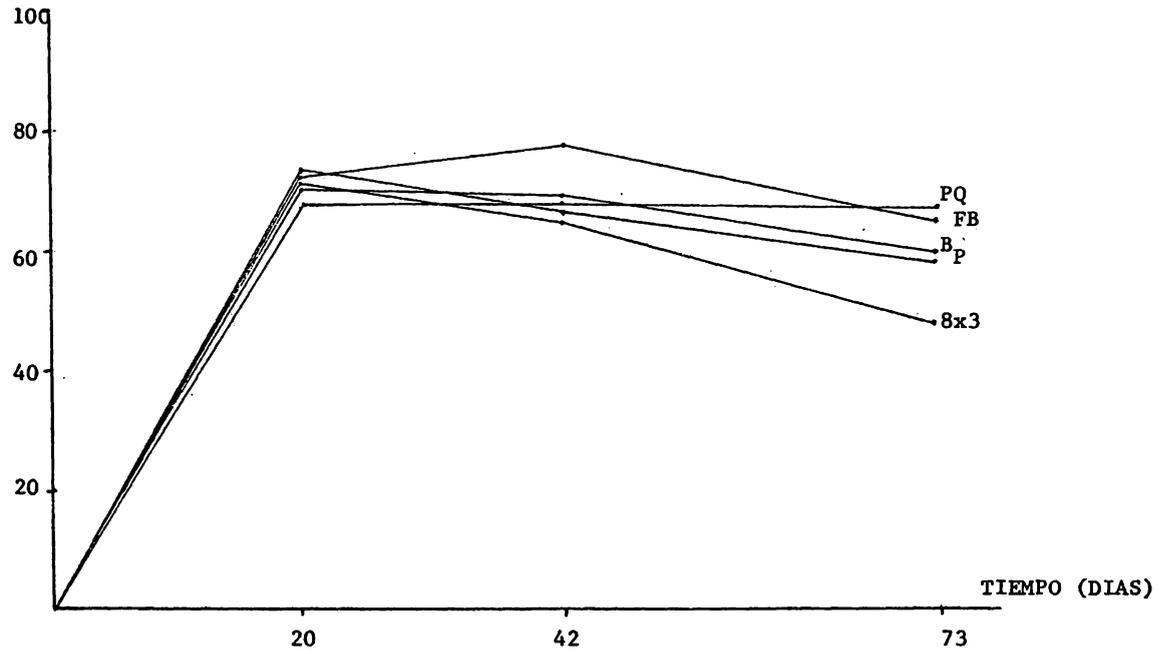
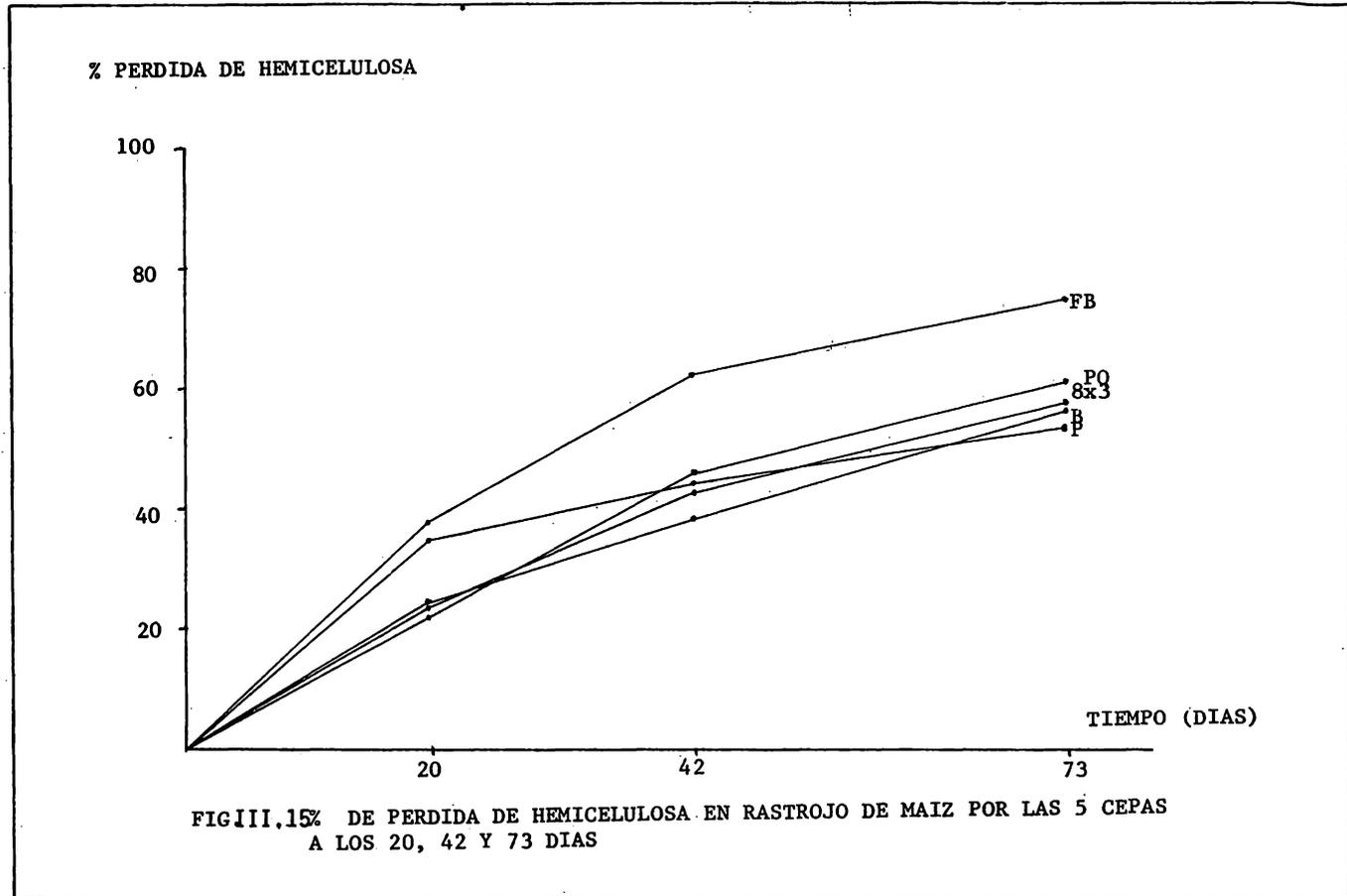
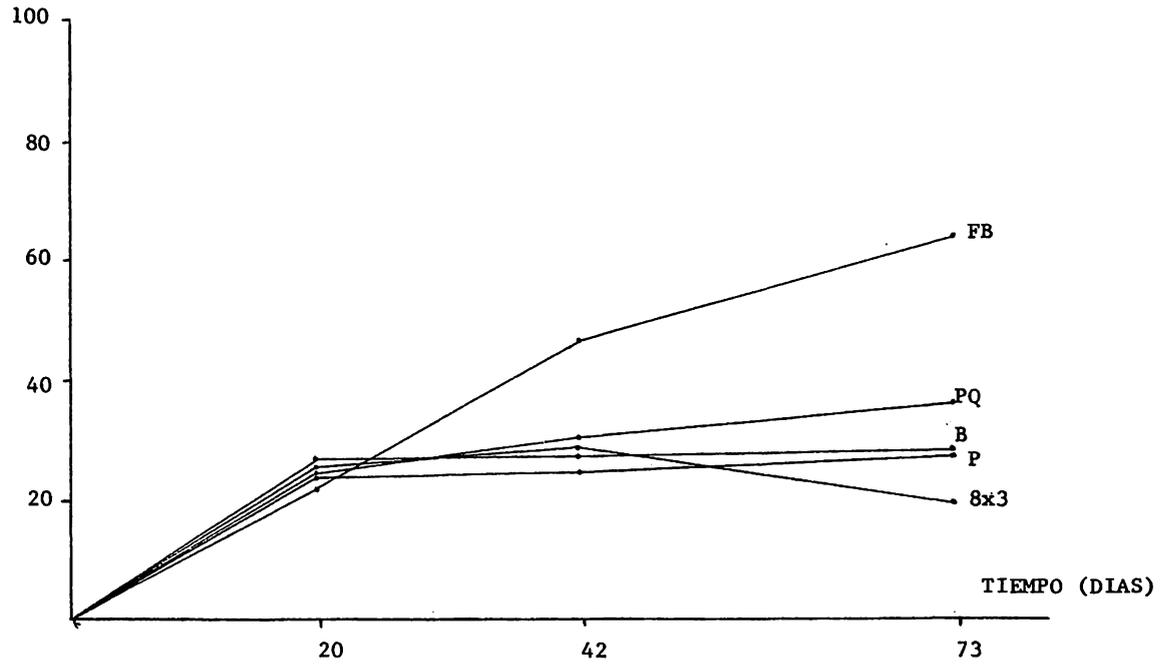


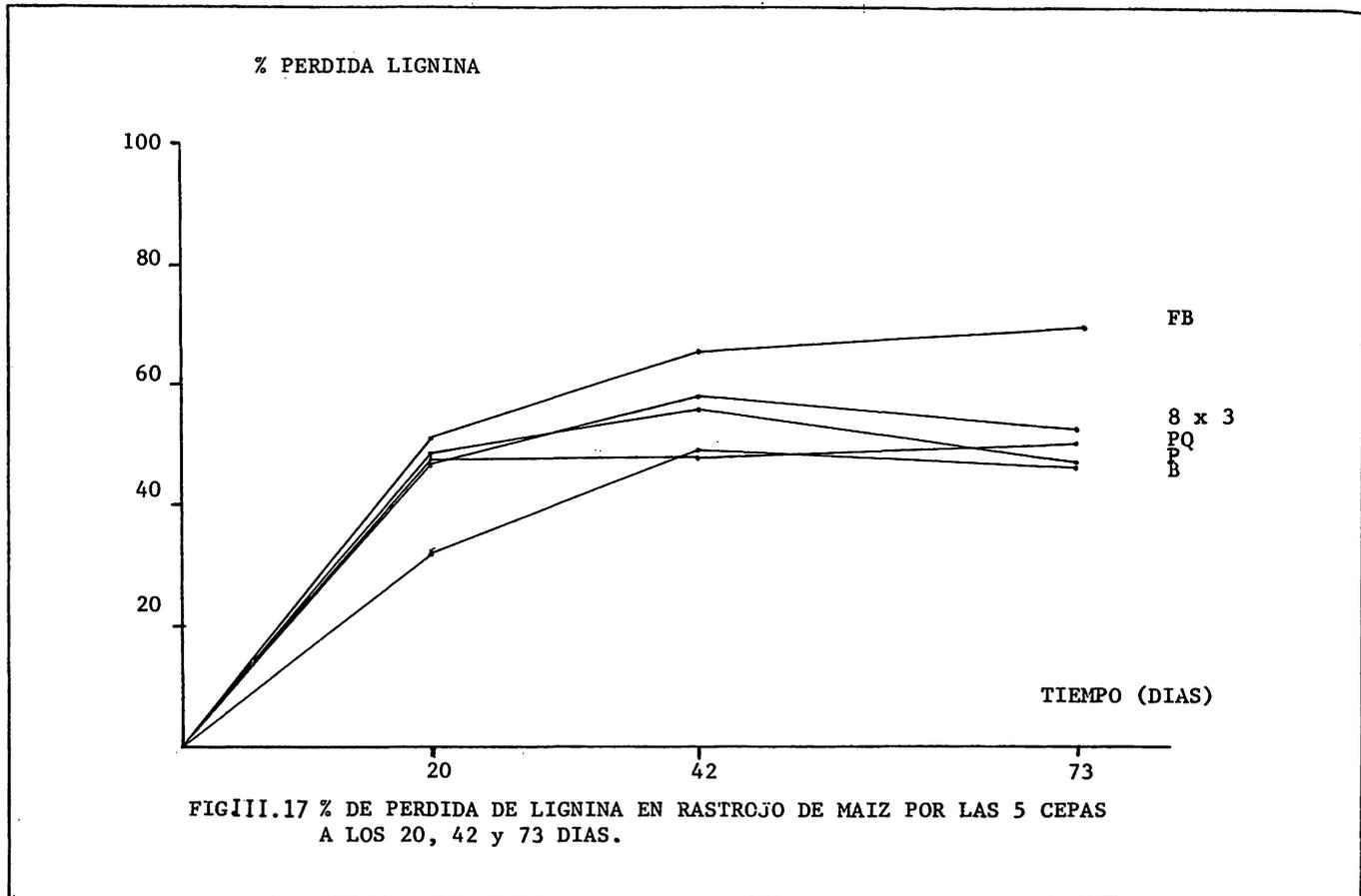
FIG.III.14% DE PERDIDA DE CARBOHIDRATOS SOLUBLES EN RASTROJO DE MAIZ POR LAS 5 CEPAS A LOS 20, 42 Y 73 DIAS.



% PERDIDA CELULOSA



FIGIII.16% DE PERDIDA DE CELULOSA EN RASTROJO DE MAIZ POR LAS 5 CEPAS
A LOS 20, 42 Y 73 DIAS.



4.2 SEGUNDO EXPERIMENTO

Se decidió repetir el experimento anterior tratando de controlar mejor las condiciones de incubación, ya que el desarrollo de las cepas de incubación no fue del todo homogéneo teniéndose a lo largo de la incubación pérdidas negativas de algunos componentes.

Se analizaron los sustratos a los 20 y 42 días de haberse inoculado. Los resultados de las Tablas III.21 y III.22, muestran la composición y pérdida de los componentes del rastrojo de maíz a los 20 y 42 días de incubación respectivamente. Durante la incubación los cuatro componentes del rastrojo de maíz (carbohidratos solubles, hemicelulosa, celulosa y lignina) sufren pérdidas considerables. La pérdida de carbohidratos solubles por las 5 cepas a los 20 días está en el rango de 69.65 - 74.57%. A los 42 días la pérdida fue mínima encontrándose en el rango de 60.60 a 72.3, exceptuando la cepa "P" donde en este período se incrementa de 72.65 a 80.04.

La pérdida de hemicelulosa a los 20 días también es muy grande, encontrándose en el rango de 34.5 a 51.08. A los 42 días continúa incrementándose aunque en menor proporción, alcanzando valores de 42.4 a 57.57. La pérdida de celulosa a los 20 días asciende a 11.45-29.87%. A los 42 días el incremento es menor encontrándose entre 31.82 y 38.68%, a excepción de la cepa P, donde la pérdida de celulosa en este período es menor, incrementándose de 12.04 a 16.67%.

En cuanto a la pérdida de lignina en los primeros 20 días alcanza valores de 27.06 a 35.42%, y a los 42 días se encuentra en un rango de 36.81 a 65.43%.

A los 42 días la cepa 8x3 causa un porcentaje de pérdida de lignina más

TABLA III. 21 COMPOSICION Y PERDIDA DE LOS COMPONENTES DEL RASTROJO DEL MAIZ INOCULADO CON CEPAS DE PLEUROTUS OSTREATUS DESPUES DE 20 - DIAS DE INCUBACION. (CONDICIONES DE ACUERDO A LA SECCION 4.1)

| COMPONENTES | CONTROL | CEPAS PLEUROTUS OSTREATUS | | | | |
|----------------|---------|---------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | | B | FB | P | PQ | 8X3 |
| Carb. Solubles | 8.07 | 3.14 | 2.77 | 2.43 | 2.88 | 2.45 |
| | | <u>+0.34</u> | <u>+0.21</u> | <u>+0.21</u> | <u>+0.16</u> | <u>+0.15</u> |
| Hemicelulosa | 36.58 | 25.86 | 24.07 | 26.38 | 24.46 | 23.39 |
| | | <u>+0.17</u> | <u>+0.25</u> | <u>+0.78</u> | <u>+0.40</u> | <u>+0.12</u> |
| Celulosa | 32.70 | 31.11 | 30.85 | 25.95 | 24.32 | 23.39 |
| | | <u>+0.45</u> | <u>+0.57</u> | <u>+1.55</u> | <u>+0.82</u> | <u>+0.36</u> |
| Lignina | 18.70 | 16.24 | 16.26 | 15.02 | 15.39 | 14.43 |
| | | <u>+0.40</u> | <u>+0.28</u> | <u>+0.33</u> | <u>+0.53</u> | <u>+0.33</u> |
| Cenizas | 6.45 | 8.24 | 8.69 | 7.11 | 7.56 | 7.56 |
| | | <u>+0.17</u> | <u>+0.54</u> | <u>+0.40</u> | <u>+0.40</u> | <u>+0.41</u> |
| % TOTAL | 102.33 | 84.56 | 81.96 | 85.16 | 83.87 | 81.30 |

PORCENTAJE DE PERDIDA DE COMPONENTES

| | | | | | |
|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Carb. Solubles | 69.65 | 74.57 | 72.65 | 69.51 | 74.05 |
| Hemicelulosa | 44.67 | 51.08 | 34.50 | 42.84 | 45.41 |
| Celulosa | 25.50 | 29.87 | 12.04 | 11.45 | 12.86 |
| Lignina | 32.00 | 35.42 | 27.07 | 30.96 | 34.06 |
| Peso | 21.68 | 25.42 | 9.09 | 14.54 | 14.45 |

Los resultados son el promedio de 4 analisis

TABLA III.22 COMPOSICION Y PERDIDA DE LOS COMPONENTES DEL RASTROJO DE MAIZ INOCULADO CON CEPAS DE PLEUROTUS OSTREATUS DESPUES DE 42 DIAS DE INCUBACION. (CONDICIONES DE ACUERDO A LA SECCION 4.1)

| COMPONENTES | CONTROL | CEPAS DE PLEUROTUS OSTREATUS | | | | |
|----------------|---------|------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| | | B | FB | P | PQ | 8X3 |
| Carb. Solubles | 8.07 | 3.61 | 3.76 | 2.04 | 4.65 | 3.54 |
| | | +0.30 | +0.13 | +0.92 | +0.20 | +0.52 |
| Hemicelulosa | 36.58 | 25.25 | 24.35 | 25.67 | 26.96 | 24.62 |
| | | +0.20 | +0.12 | +0.59 | +0.43 | +0.23 |
| Celulosa | 32.70 | 31.11 | 30.38 | 32.61 | 31.36 | 31.58 |
| | | +0.40 | +0.20 | +1.34 | +0.33 | +0.10 |
| Lignina | 18.70 | 12.76 | 14.02 | 14.41 | 12.53 | 10.24 |
| | | +0.24 | +0.17 | +0.56 | +0.22 | +0.21 |
| Cenizas | 6.45 | 9.16 | 8.79 | 7.91 | 9.42 | 10.22 |
| | | +0.40 | +0.13 | +0.83 | +0.36 | +0.12 |
| % Total | 102.33 | 81.88 | 81.30 | 82.51 | 84.92 | 80.40 |

PORCENTAJE DE PERDIDA DE LOS COMPONENTES

| | | | | | |
|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Carb. Solubles | 68.57 | 65.82 | 80.04 | 60.60 | 72.31 |
| Hemicelulosa | 51.45 | 51.17 | 42.40 | 45.93 | 57.51 |
| Celulosa | 32.38 | 31.82 | 16.67 | 34.33 | 38.68 |
| Lignina | 51.82 | 45.00 | 36.81 | 54.11 | 65.43 |
| Peso | 29.34 | 26.62 | 17.85 | 31.31 | 36.81 |

Los resultados son el promedio de cuatro analisis

elevado (65.43%), sin embargo, también los porcentajes de pérdida de celulosa y hemicelulosa son los más elevados, 38.68% y 57.51%, respectivamente. Considerando los comportamientos de las otras cepas, la cepa PQ tiene un porcentaje de pérdida de lignina de 54.11%, la cepa B de 51.82 seguida por la cepa FB con 45.0% y la cepa P con 36.81%.

Las curvas obtenidas al graficar el porcentaje de pérdida de los diferentes componentes del rastrojo de maíz por las 5 cepas de P. ostreatus a los 20 y 42 días de incubación se encuentra en las figuras III.18, III.19 III.20, III.21 y III.22, y la pérdida de los diferentes componentes se encuentran en las figuras III.23, III.24, III.25 y III.26.

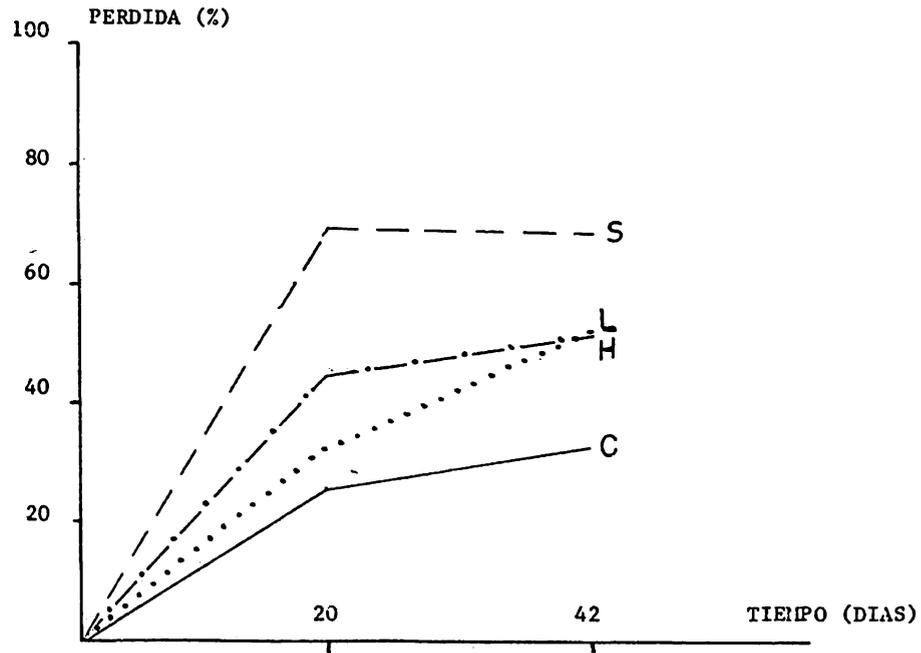


FIG. III.18 % PERDIDA DE LOS DIFERENTES COMPONENTES DEL RASTROJO DE MAIZ POR LA CEPA 'B' A LOS 20 Y 42 DIAS.

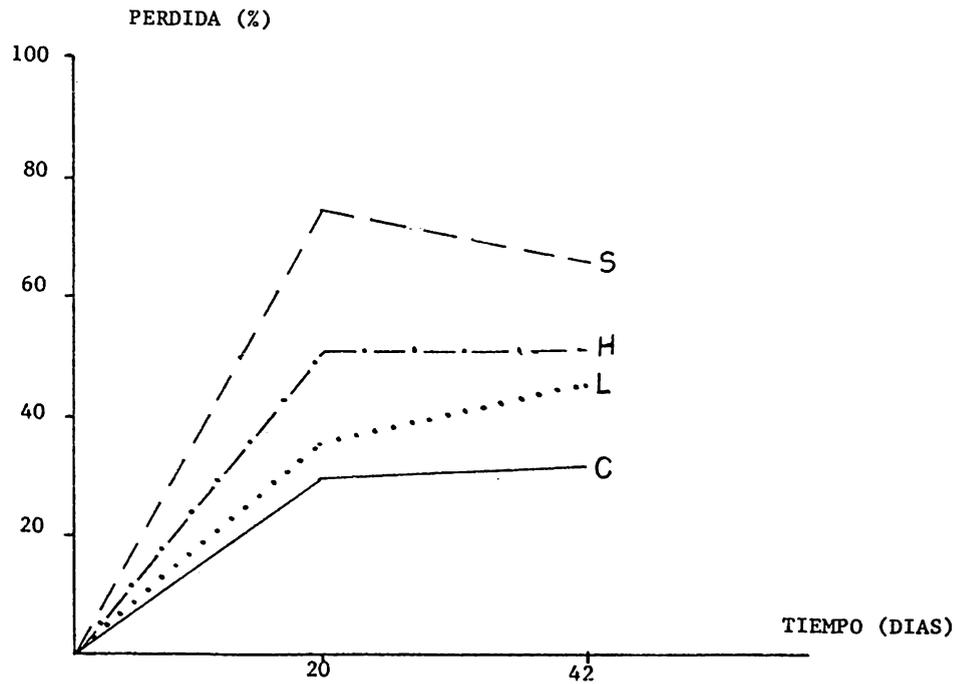


FIG.III.19 DE PERDIDA DE LOS DIFERENTES COMPONENTES DEL RASTROJO DE MAIZ POR LA CEPA 'FB' A LOS 20 Y 42 DIAS.

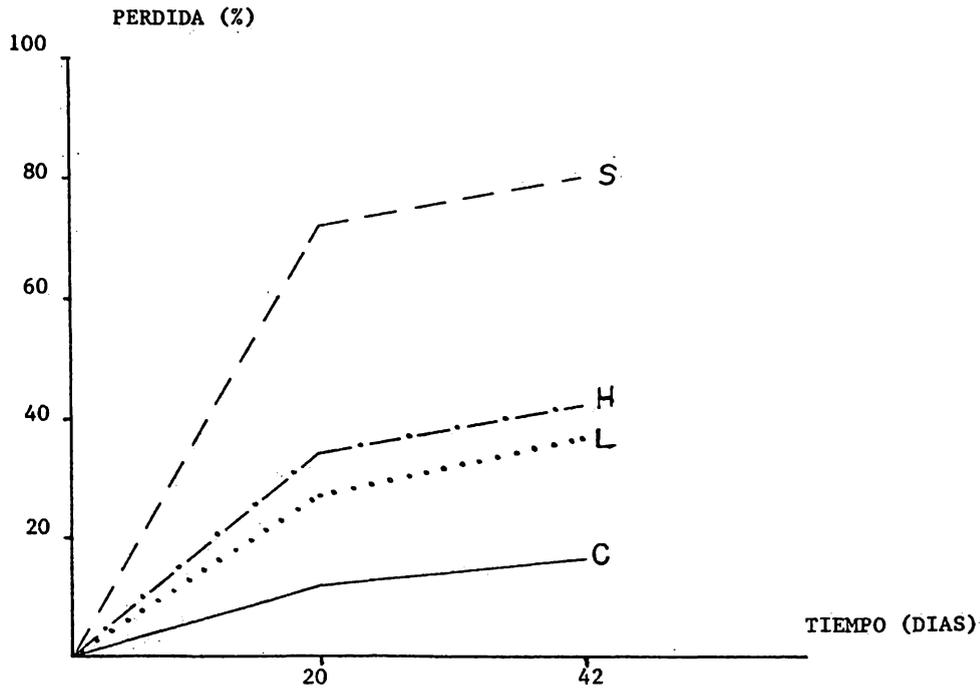


FIG. 1120 % DE PERDIDA DE LOS DIFERENTES COMPONENTES DEL RASTROJO DE MAIZ POR LA CEPA 'P' A LOS 20 Y 42 DIAS.

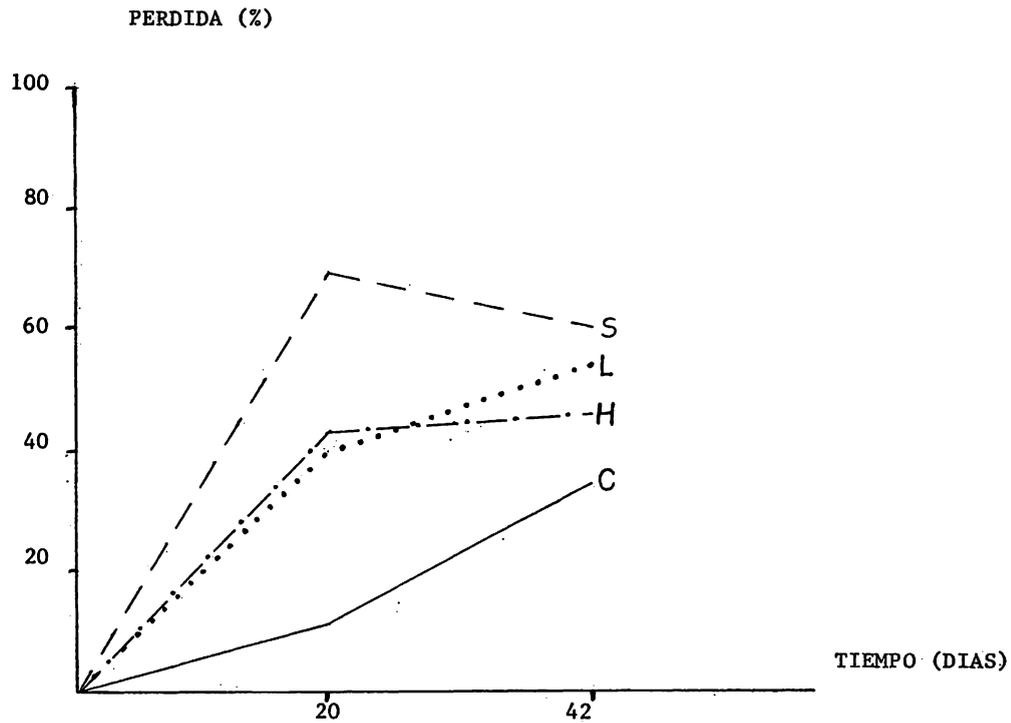


FIG. III. 21 % DE PERDIDA DE LOS DIFERENTES COMPONENTES DEL RASTROJO DE MAIZ
POR LA CEPA 'PQ' A LOS 20 Y 42 DIAS

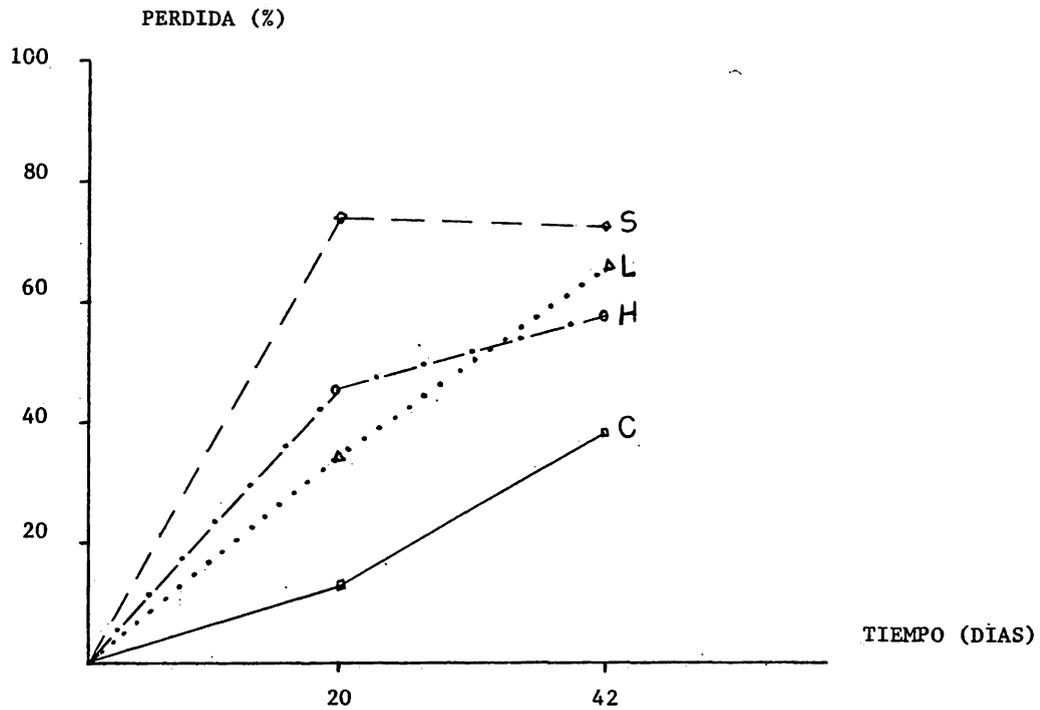


FIG.III.22 % DE PERDIDA DE LOS DIFERENTES COMPONENTES DEL RASTROJO DE MAIZ
POR LA CEPA 8 x 3 A LOS 20 Y 42 DÍAS

% de Pérdida de Solubles

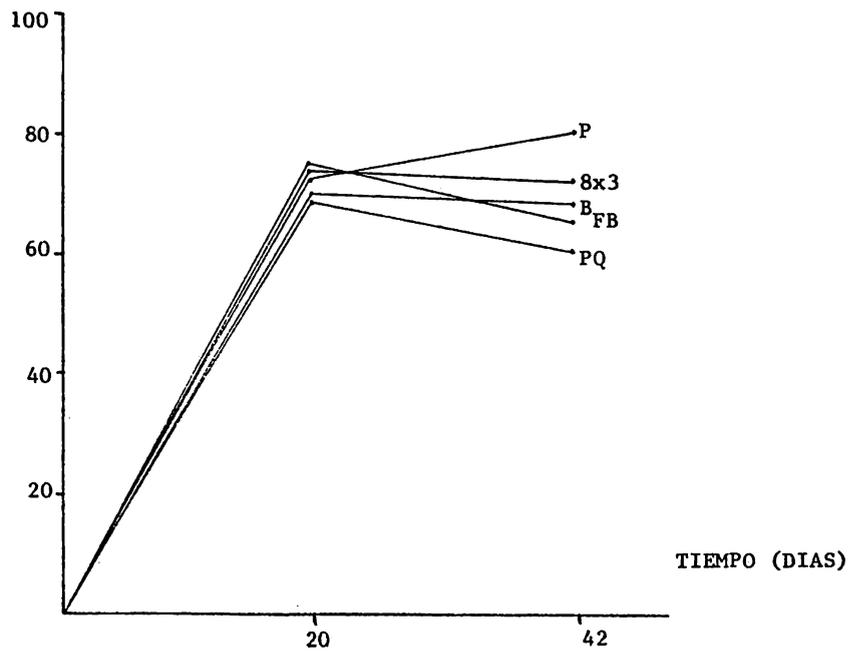


FIG. PERDIDA DE CARBOHIDRATOS SOLUBLES EN RASTROJO DE MAIZ POR LAS 5 CEPAS III.23 A LOS 20 Y 42 DIAS

% de Pérdida en Hemicelulosa

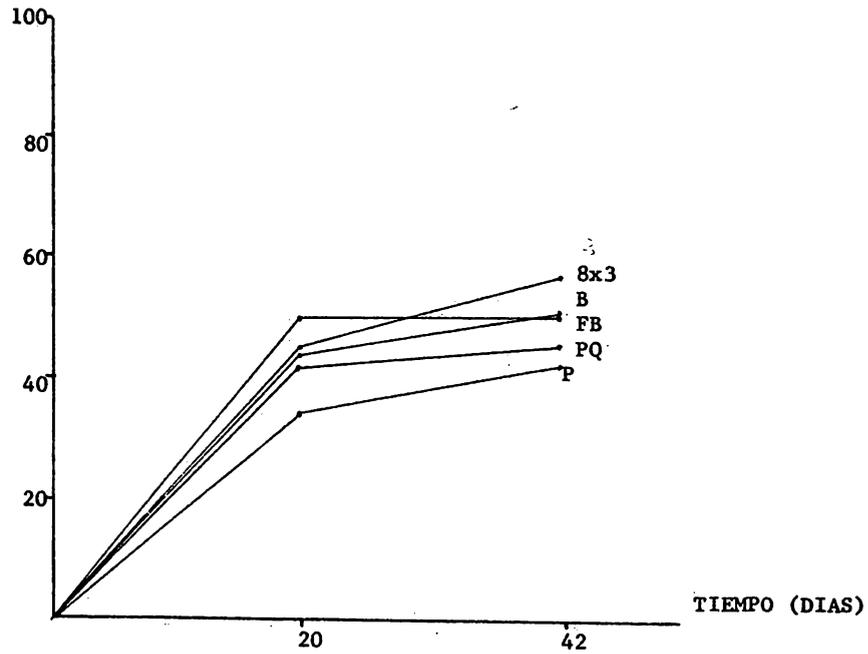


FIG. III.24 % DE PERDIDA DE HEMICELULOSA EN RASTROJO DE MAIZ POR LAS 5 CEPPAS A LOS 20 Y 42 DIAS.

% de Pérdida de Celulosa

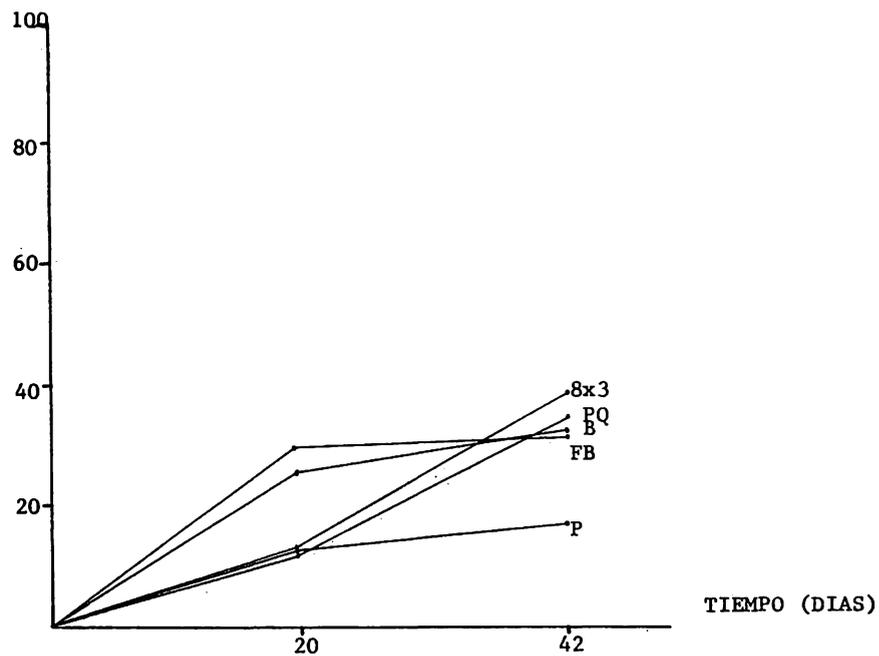


FIG. % DE PERDIDA DE CELULOSA EN RASTROJO DE MAIZ POR LAS % CEPAS III.25 A LOS 20 Y 42 DIAS.

% de Pérdida de Lignina

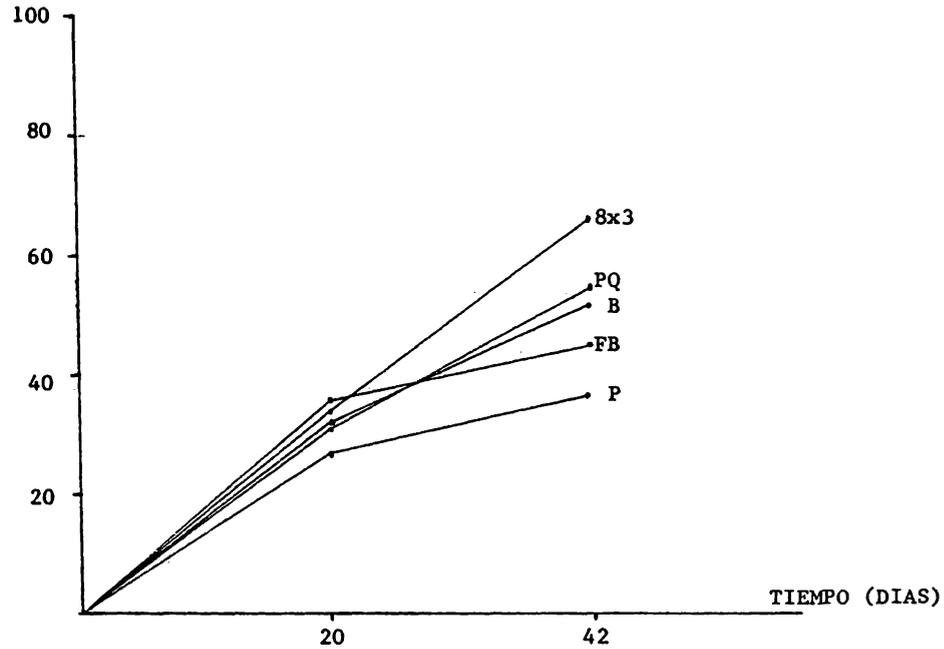


FIG. III.26 % DE PERDIDA DE LIGNINA EN RASTROJO DE MAIZ POR LAS 5 CEPAS A LOS 20 Y 42 DIAS.

De la figura III.27 donde se grafica composición de celulosa más hemi-celulosa/composición de lignina, contra tiempo, se observa que a los 20 días de incubación no hay una gran diferencia entre las 5 cepas de P. ostreatus. A los 42 días, la cepa 8x3 fue la que permitió una relación mayor de dichos componentes, lo que indica que consume menos -carbohidratos por cantidad de lignina degradada, en comparación a las demás cepas. Por otro lado, esta relación es menor a los 20 días (para todas las cepas) (3.17 a 3.51) que al día cero, tomando como datos los del control (3.70), a los 42 días fue mayor (3.90 a 5.49). Parece ser que durante los primeros 20 días de incubación las cepas requieren de más carbohidratos y posteriormente ya no los degrada en la misma magnitud, mientras que con la lignina sucede lo contrario.

Relación de composición

$\frac{\% \text{ de cel+hem}}{\% \text{ de lignina}}$

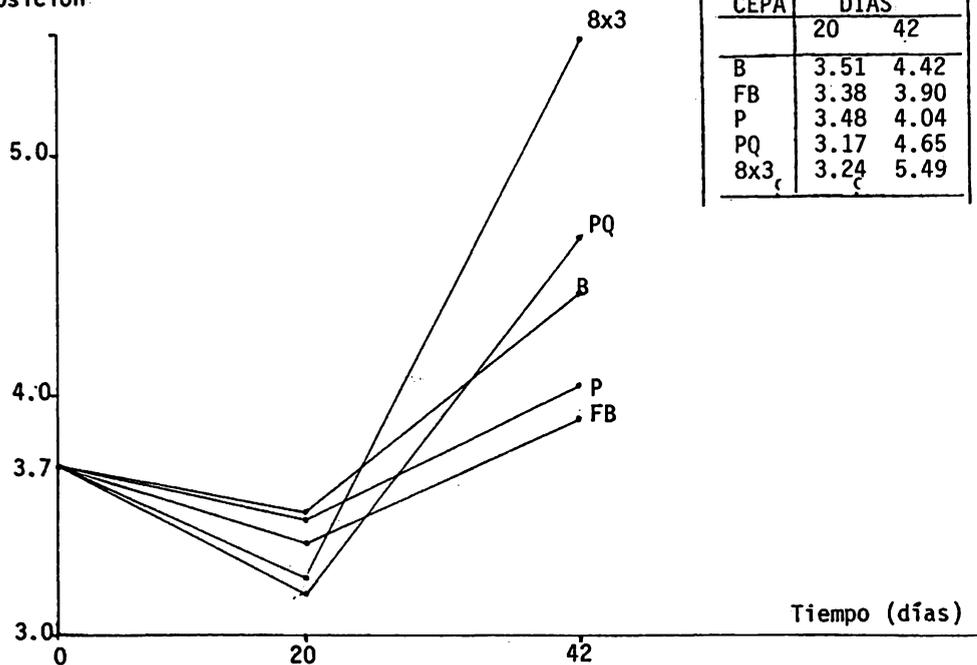


Fig. III.27 Relación de composición de carbohidratos (cel+hem) con respecto a la lignina del rastrojo de maíz a los 20 y 42 días de incubación con P. ostreatus

IV. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. En cuanto a la extracción de hemicelulosa y celulosa, se observó que el grado de separación de una con otra, por el método seleccionado, dependió del tipo de esquilmo. Así para el rastrojo de maíz, olote de maíz y bagazo de caña, la separación no fue completa, teniéndose una cantidad de hemicelulosa apreciable en la fracción de celulosa. Mientras que con la cascarilla de arroz, se logró una separación casi completa de hemicelulosa y celulosa.
2. Durante la selección de los métodos analíticos para la determinación de pentosas y hexosas, se encontró que éstos presentaron un rango de medición confiable, a excepción de la determinación de pentosas en medio acuoso donde aparentemente hubo una interferencia apreciable con glucosa. Posteriormente esta interferencia no fue notoria, por ejemplo en el bagazo de caña con un alto contenido de carbohidratos solubles (8.11%), se determinó 8.08% de glucosa por el método de K. Weissman, y tan solo, 0.03% de xilosa por el método de Tracey. Si éste último método detectara tanta cantidad de hexosas como se observó durante la estandarización de técnicas se hubiera detectado una mayor concentración de pentosas en esta fracción.
3. De los diferentes esquilmos agrícolas analizados se eligió al rastrojo de maíz por ser uno de los que presentan un alto

contenido de lignina (14.06%) y su producción en el país es la mas alta.

4. Después de realizar un Experimento Preliminar no se logró una homogeneidad de crecimiento en el sustrato, por lo que se realizaron diversas pruebas, haciendo variaciones en la cantidad de inóculos, mezclado, tratamiento térmico del sustrato y concentración de oxígeno en el medio.
Al aumentar el número de inóculos y hacer variaciones en el tratamiento térmico del sustrato no se presentó un desarrollo homogéneo ni degradación de lignina apreciables. Al mezclar el sustrato después de 14 días de haber sido inoculado se observo una exhibición de crecimiento a excepción de la cepa F-2, probablemente por presentar mayor resistencia al mezclado.
5. La variable que mas influyó fue la concentración de oxígeno en el medio. Al permitir un mayor intercambio de gases se logró una mayor homogeneidad, un crecimiento más rápido y una mayor degradación de lignina.
6. Las cepas seleccionadas para los experimentos de degradación fueron las cepas B, F.B., P., P.Q., y 8 x 3, ya que las otras cepas (H-1, F-2, F-3, P.V.) presentaron menor desarrollo en experimentos preliminares.
7. Los métodos analíticos y procedimientos de incubación utilizados, permitieron una dispersión de resultados baja. Teniéndose reproducibilidad en las determinaciones y en el crecimiento.

8. Se concluye que la mejor cepa es la 8 x 3, ya que habiendo una relación de procentaje de carbohidratos (celulosa + hemicelulosa) entre procentaje de lignina, (Figura III.27), se ve que esta cepa es la que consume menos carbohidratos por cantidad de lignina degradada, a los 42 días de incubación.

RECOMENDAR

Es posible que el rastrojo de maíz tratado con P. Ostreatus tenga ya una aplicación como forraje de buena calidad. Ya que a los 42 días se observó una disminución en el contenido de lignina bastante apreciable. Para la cepa 8 x 3 varió de 18.70% a 10.24%, lo que daría valores de digestibilidad altos. Quedaría por realizar pruebas de digestibilidad para corroborar esta aseveración. Se deberá tomar en cuenta que el porcentaje de un perdida total todo es considerable (36.81% para 8 x 3 a los 42 días), lo que debe tomarse en cuenta para evaluar el rendimiento del preceso.

Por medio de mutaciones genéticas, se lobra obtener una cepa degradadora selectiva de lignina. De tal manera que la pérdida de carbóhidratos son mínima y el rendimiento es mayor.

V. APENDICE

APENDICE No. 1

EXTRACCION DE CARBOHIDRATOS SOLUBLES, HEMICELULOSA Y CELULOSA POR EL METODO DE DERIAZ. (Deriaz, 1961)

Esta extracción se hace por cuadruplicado.

1. 1 g. de muestra secada y molida
2. Extraer con éter.
3. Secar.
4. Digerir 2 horas con 150 ml. de oxalato de amonio+ 6 gotas de silicón
5. Enfriar y agregar 1 g. de celite
6. Transferir a tubos de centrifuga lavando con 50 ml. de agua. Centrifugar por 10 min. a 5000 r.p.m.
7. El líquido se filtra y el residuo se lava con 100 ml. de agua y se centrifuga, se separa el líquido sobrenadante, se filtra y se junta con el filtrado anterior.
8. El residuo de las dos centrifugaciones anteriores, se digiere con 67 ml. de H_2SO_4 por 1 hora, adicionando 6 gotas de silicón al 1% en cloroformo.
9. Enfriar y centrifugar 10 min/5000 rpm agregando 67 ml. de agua para lavar el recipiente de la digestión.
10. El sobrenadante se guarda, en un vaso para fibra.
11. El residuo se lava con 105 ml. de agua y se centrifuga
12. El sobrenadante se coloca en el vaso para fibra del punto 10.
13. El residuo se lava con 100 ml. de acetona, se centrifuga.

14. El residuo se seca en horno a 40°C por 12 horas y luego en horno a 100°C por 15 min.
15. Se deja enfriar y se agregan 12 ml. de H₂SO₄ al 72%
16. Se deja enfriar por 4 horas.
17. Se agregan 105 ml. de agua y 6 gotas de silicón.
18. Se transfiere al vaso para fibra del punto 10.
19. Se digiere todo por dos horas. Se enfría
20. Dos muestras de las cuatro, se filtran y se lavan con 150 ml. de agua, acetona y éter.
21. El líquido es la solución B.
22. El residuo después de los lavados se seca a 105°C por una noche, se enfría y se pesa, se mete a la mufla a 550°C por dos horas, se pesa.
23. Las otras dos muestras se transfieren a un tubo de centrifuga y se centrifugan por 10 min/5000 rpm. (por separado).
24. Se filtra a través de un crisol de vidrio poroso del # 1. Se lava con 50 ml. de acetona y 50 ml. de éter.
25. Al residuo se le determina proteína por Microkjeldahl.

APENDICE No. 2

CALCULOS PARA LA OBTENCION DEL PORCIENTO DE PERDIDA DE CADA COMPONENTE DEL SUSTRATO.

Durante el proceso de incubación, los diferentes componentes orgánicos del rastrojo de maíz, son degradados a bióxido de carbono (que se desprende como gas) y agua, de la cual parte se evapora y parte es retenida por el sustrato. Sin embargo el contenido de minerales se mantiene constante, no así su porcentaje en relación a los demás componentes, ya que al disminuir la cantidad de ellos, el porcentaje de cenizas se incrementa. Considerando entonces que la cantidad de cenizas se mantiene constante durante todo el experimento, es posible determinar la pérdida de cada uno de los demás componentes, con respecto a la cantidad de sustrato inicial.

Se puede tomar como ejemplo los datos de la tabla No. III.12 (hoja 116) titulada "Composición y Pérdidas de los Componentes del Rastrojo de Maíz, inoculado con cepas de P. ostreatus después de 14 días de incubación".

1. Obtención del Porciento de Pérdida en peso total.

Este se determina tomando en cuenta el valor de las cenizas del control y de cada muestra.

Datos: % de cenizas del blanco= 6.86
% de cenizas en PQ= 7.61

Cálculos: $\frac{6.86}{7.61} = \frac{100\%}{X}$ $X = \frac{6.86}{7.61} = 90.14\%$

(Regla de tres inversa, porque se considera pérdida de materia)

$$\% \text{ Pérdida en peso} = 100 - 90.15 = 9.86$$

$$\% \text{ Pérdida en peso} = 9.86$$

2. Determinación del porcentaje de pérdida de carbohidratos solubles totales.

Datos: % de carbohidratos solubles totales = 5.66

% de pérdida en peso total = 9.86

% de carbohidratos solubles en el blanco = 7.38

Cálculos:

a) Determinación de carbohidratos solubles totales corregidos (por cenizas).

$$\text{Carbohidratos sol. totales corregidos} = 5.66 - 9.86\% = 5.10$$

Este valor de 5.10% significa el porcentaje de carbohidratos solubles totales tomando como base los 5 gramos de materia original.

b) Determinación del porcentaje de pérdida de carbohidratos solubles con respecto al blanco.

$$\% \text{ de Pérdida de Carb. Solubles} = 5.10$$

$$\begin{array}{r} 7.38 \text{ -----} 100\% \\ 5.10 \text{ -----} X \end{array} \quad X = 69.11$$

$$\% \text{ de Pérdida de Carbohidratos solubles} = 100 - 69.11 = 30.89\%$$

3. Para la determinación del porcentaje de pérdida en hemicelulosa, celulosa y lignina, los cálculos se realizan en la misma forma.

APENDICE NO. 3

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS CON LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS TÉRMICOS EMPLEANDO EL MÉTODO DEL INTERVALO.

Para conocer si existía diferencia significativa entre los diferentes tratamientos térmicos, hechos al rastrojo de maíz, de tal manera que influyeran en el desarrollo de las cepas de P. ostreatus se hizo un análisis de los resultados experimentales por el método del intervalo, cuyos cálculos se presentan a continuación.

Primero se tabulan los tratamientos térmicos contra las cepas empleadas. (Tabla III.16) Posteriormente se obtiene un sumatoria por tratamiento, además del rango de cada una de estas columnas (restando el valor más bajo al más alto). Cada uno de estos rangos se suma ($1+2+1+3= 7$).

De la tabla 90 (Kramer, 1970), se obtienen datos, conociendo el número de tratamiento y el número de cepas.

Entonces para conocer si existe diferencia significativa al 5% y 1% entre los diferentes tratamientos térmicos se multiplican los valores de la tabla 90 por la sumatoria de los rangos:

$$0.71 (7) = 4.97$$

$$0.96 (7) = 6.72$$

Para comparar un tratamiento con otro, se restan las sumatorias de ambos y si el valor obtenido es mayor a 4.97 y/o a 6.72, entonces si hay diferencia significativa entre dichos tratamientos al 5% y/o 1%. Así entre los tratamientos:

TABLA A. ANALISIS DE RESULTADOS DEL TRATAMIENTO TERMICO POR MEDIO DEL METODO DEL INTERVALO.

| TRATAMIENTO | | | | |
|----------------------|----|----|----|----|
| CEPA. | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 1 | 2 | 1 | 5 | 5 |
| 2 | 2 | 2 | 4 | 2 |
| 3 | 3 | 3 | 5 | 3 |
| 4 | 3 | 2 | 4 | 4 |
| 5 | 2 | 3 | 5 | 5 |
| 6 | 3 | 3 | 5 | 4 |
| ANALISIS ESTADISTICO | | | | |
| | 15 | 14 | 28 | 23 |
| * RANGO | 1 | 2 | 1 | 3 |

$$\text{RANGO}^* = 1 + 2 + 1 + 3 = 7$$

a. Los tratamientos son:

1. En autoclave 30 min. a 1.1 Kg/cm² de presión
2. En autoclave, esperar que la presión llegue a 1.1 Kg/cm² y desconectar enseguida.
3. En autoclave, purgar 5 min., cerrar por 2 min. y desconectar.
4. En estufa a 60°C por 1 hora

- 1 y 2 tenemos $|\bar{z}_1 - \bar{z}_2| = 15 - 14 = 1$, $1 < 4.97 < 6.72$ por lo tanto no hay diferencia significativa al 5% y al 1%.
- 1 y 3, $|\bar{z}_1 - \bar{z}_3| = 28 - 15 = 13$, $13 > 4.97$ y $13 > 6.72$ por lo tanto si hay diferencia significativa al 5% y al 1%.
- 1 y 4, $|\bar{z}_1 - \bar{z}_4| = 23 - 15 = 8$, $8 > 4.97$ y $8 > 6.72$, por lo que si hay diferencia significativa al 5% y al 1%.
- 2 y 3, $|\bar{z}_2 - \bar{z}_3| = 28 - 14 = 14$, $14 > 4.97$, y $14 > 6.72$ con lo que si hay diferencia significativa al 5% y al 1%.
- 2 y 4, $|\bar{z}_2 - \bar{z}_4| = 23 - 14 = 9$, $9 > 4.97$ y $9 > 6.72$, entonces si hay diferencia significativa a los niveles de 5% y 1%.
- 3 y 4, $|\bar{z}_3 - \bar{z}_4| = 28 - 23 = 5$, $5 > 4.97$ y $5 > 6.72$ por lo que no hay diferencia significativa al 5% pero si al 1%

Con esto se concluye el indistinto emplear el tratamiento 1 o el 2.

VI. BIBLIOGRAFIA

- Alexopoulos C. J. (1966). Introducción a la Micología. EUDEBA. Editorial Universitaria de Buenos Aires (Argentina) p. 433 - 446 y 512 527.
- Ander P. & K. E. Eriksson (1976) Arch. Microbiol. 109, 1
- Ander P. & K. E. Eriksson (1978). Lignin Degradation and Utilization by micro-organism. Progress in Industrial Microbiology, M. J. Ball, Elsevier Scientific Publishing Co., New York. 14, 2-53
- AOAC (Association of Official Agricultural Chemists) (1960). Official methods of Analysis. 9th Ed., Washington, D. C. AOAC. p. 832
- Bartolomé (1980). Ciencia y Desarrollo. Julio-Agosto, Núm. 33, año VI.
- Bateman V. J. (1970). Nutrición Animal, Manual de Métodos Analíticos. Ed. Herrero Hermanos Sucesores, S. A. p. 22 - 253.
- B.B. Acta (1961). 48, 591.
- Bellamy D. W. (1974). Single Cell Proteins from Cellulosic Wastes. Biotechnology and Bioengineering. 21 , 869-880
- Bender F., P. D. Heaney and A. Bowden (1970) Potencial of Steamed Wood as a Feed for Ruminants. Forest Products Journal. 20, (4)
- Bilton R. F. & R. B. Cain (1968). Biochem. J., 8, 829 Browning B.L. & M. Dekker (Editors), Inc. New York. p. 63 - 77.
- Browning & Dekker (1977). Analysis of Paper 2nd. Ed. Marcel Dekker Ing. New York, p. 63 - 77.
- Cain R. B., R. F. Bilton & J. A. Darrah. (1968). Biochem. J., 108, 797.
- Cartwright J. N. & K. S. Holdom (1973). Microbios. 8, 7.
- Cowling B. E. (1961) Comparative Biochemistry of the decay of Sweetgum Sapwood by White-Rot and Brown-Rot Fungi. Technical Bulletin,

- U. S. Department of Agriculture. (1258), 1-9, December.
- Crampton, E. W. & L. A. Maynard (1938). The relation of cellulose and lignin content to the nutritive value of animal feeds. *Journal of Nutrition*. 15, (4), 385-395.
- Chang S. T. (1980). Mushrooms as human food. Reprinted from *Bioscience*. 30, (6), 399-401, June.
- Dagley S. (1971). *Advan. Microb. Physiol.*, 6, 1
Dekker (1967)
- Dekker R.F. H. & W.L. Lindner (1979). Bioutilization of lignocellulosic waste materials: A review. *South African Journal of Science*. 75 (2), 65-71.
- De la Torre M. M. M. (1981). Producción de proteínas a partir de residuos lignocelulósicos. *Ciencia y Desarrollo*. Marzo-abril, Núm. 37, Año CII, p. 111-116.
- Deriaz R. E. (1961). Routine analysis of carbohydrates and lignin in herbage. *J. Sci. Food Agric*. 12 (2), 152-160.
- Dévore G., E.M. Mena (1975). *Química Orgánica*. 4a. Impresión. Publicaciones cultural S. A. México, p. 583.
- Dirección General de Aprovechamientos Forrajeros (1978).
- Ethland J. M. (1977) Modified procedure to determine acid-insoluble - lignin in wood and pulp. *TAPPI*. 60, (10), 143-144, October.
- Eriksson K. E. (1977). *Proc. Bioconversion Symp. ITT Delhi*. 195, 201.
- Eriksson K. E. & Hiroit. (1976). *Svensk Papperstidn*. 79, 157.
- Eriksson K. E. & L. Vallander (1975). To be published.

Eslyn E. W., K. T. Kirk, & J. M. Effland (1975). *Phytopathology*. 65, 473.

FAO Production Year Book (1977).

Fukuzumi T., H. Takatuka & K. Minami (1969). *Arch. Biochem. Biophys.*, 129, 396.

Greaves H. (1971). *Wood Sci. Technol.*, 5, 6

Haider K. & Z. K. Grabbe (1967). *Bakteriol., Parasitenk., Infektionskr., Hyg.*, 205, 91

Haider K. & J. Trojanowski (1975). *Arch. Microbiol.*, 105, 33

Hall L. P. (1980) Enzymatic Transformation of Lignin. *Enzyme Microb. Technol.*, 2, July

Han W. Y. & C. D. Callihan (1974). Cellulose Fermentation: Effect of Substrate Pretreatment on Microbial Growth. *Applied Microbiology*. 27, (1), 154 - 165, Jan.

Haraguchi T. (1968). *Bull. Exptl. Forest Tokyo Univ. Agr. Technol.* 7, 53

Hata K. (1966). *Holz for Schung*. 20, 142

Haikin J. M. & J. R. (1976) *Ost. Fappi*. 57, 118

Hartley D. R., J. C. Edwin, K. J. Norman & S. A. Gordon (1974). Modified Wodd Waste and Strow as Potential Components of Animal Feeds. *J. Sci. Fd. Agric.*, 25, 433 - 437

Hayaishi, O. (1974). *Molecular Mechanisms of Oxygen Activation*. Hayaishi O. (Editor), Academic Press, New York. p. 1

- Higuchi T. (1971). F. F. Mord (Editor). *Adian. Enzymol*, Wiley Interscience, New York. 34, 207
- Hiroi T. & K. E. Eriksson (1976). *Svensk Papperstidn.* 79, 157
- Ishihara T., & M. Miyazaki (1974). *J. Jap. Wood Res. Soc.* 20, 39
- Ishikawa, H. & T. Oki (1966). *J. Jap. Wood Res. Soc.* 12, 101
- Jonansson, M. & E. Hagerby (1974). *Phsyiol. Plant.* 32, 23
- Kaarik A. (1974). *Biology of Plant Litter Decomposition*, C. H. Dickinson & G. J. F. Pugh (Editors)., Academic Press, New York 1, 129
- Kawakami H. (1975). *J. Jap. Wood Res. Soc.* 21, 629
- Kawakami H. (1976). *J. Jap. Wood Res. Soc.* 22, 252
- Kent L. N. (1971). *Tecnología de los Cereales*. Ed. Acribia, España. p. 259
- Kim D. S. (1980) *S. An. Rev. of the Musinroom*, 22, 83
- Kirk K. T. (1971). *Effects of Microorganisms on Lignin. Annual Review of Phytopathology.* 9, 185 - 210
- Kirk K. T. (1975). *Holz for Schung.* 29, 99
- Kirk K. T. & E. Adler (1970). *Acta Chem. Scand.* 24, 3379
- Kirk K. T., W. J. Connors & J.G. Zeikus (1977) *Rec. Adv. Phytochem*, 11 In press.
- Kirk k. T., W. J. Connors, W. F. Bleam, & J. G. Zeikus (1975). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 72, 2515
- Kirk K. T. & H.-m. Chang (1974). *Decomposition of Lignin by White-Rot Fungi I. Isolation of Heavily Degraded Lignings from Decayed Spruce Holz for Schung.* 28, 217-222

- Kirk K. T. & H.- M. Chang (1975). Holz for Schung, 29, 56
- Kirk K. T. & L. T. Highley (1973). Phytopathology. 63, 1338
- Kirk K. t. & L. F. Lorenz (1973). Appl. Microbiol. 26, 173
- Kirk K. T. & E. W. Moore (1972). Removing Lignin from Wood with White-Rot Fungi and Digestibility of Resulting Wood. Wood and Fiber. 4, (2), 72 - 79
- Kirk K. T., J. G. Zeikus & W. J. Connors (1971)., Rec. Adv. Phytochem., 11, in press
- Klein, B. & M. Weissman (1953). New Color Reagent for Determination of Hixoses: Determination of Glucose in Blood Serum. Analytical Chemisty. 25, (5), 771 - 774
- Krammer a. (1970). Quality Control for the Food Industry. 3rd. Edi. The AVI Publ. Co., Inc. West Port Connecticut. p. 497
- Leal L. H. (1980). Sporelessness in the Basidiomycetes P. ostreatus, A. Genetical Study by Means of a New Dedikaryotization Method. Marburg/Lahn . P. 9 - 11
- Lyr. H. (1958). Plants. 50, 359
- Millett A. M., A. J. Baker, W. C. Feist, R. W. Mellenberger & L. D. Satter (1970). Modifying Wood to Increase its Vitro Digestibility J. of Animal Science. 31, (4), 781 - 788
- Millett M. A., A. J. Baker & L. D. Satter (1975). Cellulose as a Chemical and Energy Resource. Biotechnol. Bioeng., Symp., John Wiley & Sons, New York. (5), 193

Mushroom Newsletter for the Tropics (1980). 1, (1), August.

Nilsson T. (1974). Stud. for Svec., 114

Rogers J. Ch., E. Coleman, D. F. Spino & T. C. Purcell (1972).
Production of Fungal Protein from Cellulose and W. Cellulosics.
Environmental S. C. Technol. 6, (8), 715 - 718, August

Sánchez J. E. (1976). Cambios en la Composición Química y Digestibilidad de Forrajes de Baja Calidad Nutritiva mediante el uso de diversos Compuestos Químicos (Rev. Bibliográfica). Técnica Pecuaria en México, Secretaría de Agricultura y Ganadería. (31), 68 - 74, Juli - Diciembre.

Sanginés G. R., B. Carrasco, L. Martínez, E. Salinas & S. A. Shimada, (1976). Composición Proximal del Bagazo de Henquén y su Uso en la Alimentación de Borregos. Técnica Pecuaria en México, Secretaría de Agricultura y Ganadería, (31), 75 -78, Julio - Diciembre.

SARH (1980). Ante proyecto del Programa Nal. de Aprovechamiento de Esquilmos Agrícolas y Sub-productos Industriales para la Alimentación Animal.

Sarkanen V. K. & H. L. Hergert (1971). Lignins: Occurrence, Formation, Structure and Reactions, Sarkanen V. K. & H. C. Ludwig (Editors), Willey Interscience, New York, P. 1 y 43

Schánel, L. & K. Esser (1971). Arch. Mikrobiol. 77, 111

Stanier, R. Y., & N. L. Ornston (1973). Advan. Microb. Physiol. 9, 89

Sternberg D., P. Vijayakumar, & E. T. Reese (1977). - Glucosidase: Microbiol Production and Effect on Enzymatic Hydrolysis of Cellulose Canadian J. of Microbiol. 23, (2), 139 - 147

- Tracey, M. V. (1950). Colorimetric Method for the Determination of Pentoses in the Presence of Hexoses and Uronic Acids. *Biochemical J.* 47, 433 - 436.
- Updegraff M. D. & D. W. Grant (1975). Microbiol. Utilization of Pinus Radiata Bark. *Applied Microbiology.* 30, (5), 722 - 726, November.
- Van Soest, P. J. (1961). A Rapid Method for Determination of Fiber and Lignin Using Detergent. Beltsville, Maryland, U.S. D. A. Animal Husbandry Research Division P. 12
- Vanneste, W. F. & A. Zuberbuler. (1974). Molecular mechanisms of oxygen activation. O. Hyaishi (Editor), Academic Press, New York. p. 371.
- Westermarck, V. & K. E. Eriksson (1974). *Acta. Chem. Scan.*, 828, 209.
- Wilcox W. W. (1973). Wood Deterioration and its prevention by preservative treatments. Nicholas D.D. (Editor), Syracuse University Press. 1, 107.