

Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.



**DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS.**

**TESIS**

**Evaluación de la producción de enzimas celulolíticas utilizando el hongo  
*Pleurotus ostreatus*.**

**Por:**

**ANA CARMEN RIOS SANCHEZ**

**Presentada como requisito para obtener el título de:  
INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA EN ALIMENTOS.**

**Saltillo, Coahuila, México**

**Diciembre 2019**

# Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

**DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS.**

**Evaluación de la producción de enzimas celulolíticas utilizando el hongo  
*Pleurotostreatus.***

Por:

**ANA CARMEN RIOS SANCHEZ.**

Sometida a consideración del comité de asesoría como Requisitos parcial para obtener el título de:

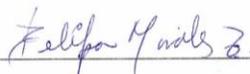
**INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA EN ALIMENTOS.**

**Aprobada por el comité de asesorías**



Dr. Mario Alberto Cruz

Asesor principal



M.C. Felipa Morales Luna

Co-asesor



Dr. Ruth Elizabeth Belmares  
Cerda.

Asesor externo



Dr. Maria Elena Castelo  
Mejia.

Co-asesora

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Diciembre 2019

# Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

**DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS.**

**Evaluación de la producción de enzimas celulolíticas utilizando el hongo  
*Pleurotusostreatus.***

Por:

**ANA CARMEN RIOS SANCHEZ.**

Sometida a consideración del H. jurado examinador como Requisitos parcial para obtener el título de:

**INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA EN ALIMENTOS.**

**Aprobada por el comité de asesorías**



Dr. Mario Alberto Cruz

Asesor principal



Dr. Ruth Elizabeth Belmares  
Cerda.

Asesor externo



M.C. Felipa Morales Luna

Co-asesor



Dr. Maria Elena Castelo  
Mejia.

Co-asesora

Buenvista, Saltillo, Coahuila, México

Diciembre 2019

## **AGRADECIMIENTOS**

Primeramente, agradezco a Dios por permitirme llegar hasta estas instancias de mi carrera universitaria y permitirme cumplir una de mis más preciadas metas.

A mi Alma Terra Mater, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro por permitirme formar parte de esta gran institución y formarme como profesionista.

A mis padres por que sin ellos este logro no sería posible puesto que siempre me brindaron su apoyo incondicional, amor y consejos en toda esta etapa profesional, siempre me arroparon en los momentos más difíciles en ningún momento dejaron que me rindiera hasta lograr mi objetivo.

Agradezco a mi director de tesis en al Dr. Mario Cruz por la oportunidad, la confianza y todo el aprendizaje brindado de su parte ya que contribuyo de una manera muy importante en mi formación como profesionista.

A mi co- asesora MC. Felipa Morales por todo el apoyo brindado para poder realizar este trabajo de investigación y por forma parte importante en mi desarrollo como profesionista.

A mis amigos Leidi y Arturo quienes siempre me alentaron a seguir adelante y me brindaron su apoyo incondicional.

A todos mis maestros por transmitirme sus conocimientos formándome como profesionista.

A todos mis compañeros y amigos por haber compartido conmigo momentos de alegrías y estudio.

## **DEDICATORIAS**

A Dios porque siempre me ha acompañado a lo largo de mi vida y darme la sabiduría e inteligencia para poder culminar mis estudios.

A mis padres Tiburcio Ríos Navarrete y María del Consuelo Amparo Sánchez por todo lo que me han brindado a lo largo de mi vida y por ser los pilares de mi vida y ser las principales personas que me impulsan a seguir mis sueños y metas no me queda más que decirles gracias porque sin ustedes no sería la persona que soy ahora.

A todos mis hermanos ya que formaron una parte muy importante para que yo pudiera culminar mis estudios ya que siempre recibí su apoyo y palabras de aliento para seguir adelante.

A mis amigos Leidi, Mónica, Consuelo, Lorena, Alva, Rodrigo, Lizbeth, Guadalupe por todas las experiencias vividas, los momentos de alegría que me brindaron y por todo lo aprendido juntos.

A mis amigas Leidi, Mónica, Consuelo, Alva por ser una familia para mí que siempre me apoyaron en todo momento.

A todas las personas que contribuyeron a mi formación como profesionista.

## **RESUMEN**

El presente trabajo de investigación se utilizaron residuos agroindustriales paja de trigo y paja de sorgo como sustrato para que el hongo *Pleurotus ostreatus* se desarrollara y poder producir enzimas celulolíticas; Xilanasas, Celulasas, Amilasas y Lacasas, puesto que estos residuos agrícolas son sustratos con un gran contenido de celulosa y lignina, esto permitirá que el hongo degrade dichos compuestos y produzca enzimas celulolíticas. Se trabajó con dos tratamientos para hacer la comparación de comportamiento de producción de las enzimas mencionadas anteriormente, a los sustratos se les dio un proceso de acondicionamiento donde se esterilizaron por una hora esto con la finalidad de evitar contaminación durante el crecimiento del hongo, así también para hidratar la paja y esta tuviera una textura más moldeable y se facilitara el proceso de siembra. Para la siembra utilizó pellets (semilla de sorgo) inoculado con micelio del hongo *Pleurotus ostreatus* conservado a -4°C este fue proporcionado por el departamento de Fitomejoramiento de Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

La cinética enzimática se llevó a cabo durante 35 días de crecimiento del hongo donde se evaluó cada 7 días la actividad enzimática de las enzimas Xilanasas, Celulasas, Amilasas y lacasas, en ambos tratamientos (T1) donde se utilizó paja de sorgo como sustrato y (T2) que se trabajó con el sustrato paja de trigo. En base al comportamiento de la producción de enzimas en los dos tratamientos se puede determinar que la enzima con mayor producción de las 4 evaluadas fue la xilanasas con 20288.30 U/L, y el tratamiento en donde se presentó mayor producción de las tres enzimas fue el T1 donde se utilizó el sustrato paja de sorgo.

Palabras claves: cinética, enzimas, sustratos, *P.ostreatus*.

## **ABSTRACT**

This research work used agroindustrial residues wheat straw and sorghum straw as a substrate for the fungus *Pleurotus ostreatus* to develop and produce cellulolytic enzymes; Xylanases, Cellulases, Amylases and lacases, since these agricultural residues are substrates with a high content of cellulose and lignin, this will allow the deep to degrade said compounds and produce cellulolytic enzymes. We worked with two treatments to compare the production behavior of the enzymes mentioned above, for them the substrates were given a conditioning process where they were sterilized for an hour in order to avoid contamination during the growth of the fungus, thus also to hydrate the straw and it would have a more moldable texture and the planting process will be facilitated. For planting used pellets (sorghum seed) inoculated with mycelium of the fungus *pleurotus ostrestus* preserved at  $-4^{\circ}\text{C}$ . This was provided by the breeding department of the Antonio Narro Autonomous Agrarian University.

The enzymatic kinetics was carried out during 35 days of fungus growth where the enzymatic activity of the enzymes Xylanases, Cellulases, Amylases and lacases was evaluated every 7 days, in both treatments (T1) where sorghum straw was used as substrate and (T2) that worked with the wheat straw substrate. Based on the behavior of the production of enzymes in the two treatments, it can be determined that the enzyme with the highest production of the 4 evaluated was xylanase with 20288.30 U / L, and the treatment where production of the three enzymes was presented was the T1 where the sorghum straw substrate was used.

Keywords: kinetics, enzymes, substrates, *P. ostreatus*

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	12
<b>2. Objetivos</b> .....	13
2.1 Objetivo general.....	13
2.2Objetivos específicos.....	13
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	14
<b>4. ANTECEDENTES</b> .....	15
4.1Generalidades.....	15
4.2 Condiciones de cultivo.....	18
4.2.1Características del sustrato.....	18
4.2.2 Temperatura.....	19
4.2.3 Humedad relativa.....	19
4.3 Sustratos.....	19
4.3.1 Forraje de sorgo.....	20
4.4 Enzimas.....	22
4.4.1 Celulasas.....	23
4.4.2Xilanasas.....	24
4.4.2.1Métodos de producción de xilanasas.....	24
4.4.2.2 Hongos productores de xilanasas.....	26
4.4.2.3 Perspectivas de las xilanasas en la industria de alimentos.....	27
<b>5. METODOLOGÍA</b> .....	28
5.1 Acondicionamiento del área de siembra y cultivo del hongo <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	28
5.1.1Tratamiento del sustrato.....	28
5.1.2 Humedad.....	28
5.1.3 Temperatura.....	28
5.1.4 Establecimiento de la cinética.....	28
5.1.5 Inoculación de los sustratos.....	29
5.2 Cinética de producción.....	29
5.2.1 Obtención de extracto enzimático.....	29
5.2.2 Ensayo enzimático.....	30
5.2.3 Actividad enzimática la de amilasa.....	30
5.2.4 Actividad enzimática la de celulasa.....	30
5.2.5 Actividad enzimática la de xilanasas.....	30

5.2.6 Determinación de lacasa.....	31
5.3 Determinación de biomasa.....	31
5.4 Determinación de Proteína.....	31
<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>32</b>
6.1 Condiciones de cultivo .....	32
6.2 Cinética de producción .....	34
6.2.1 Producción de enzimas en paja de sorgo.....	34
6.2.2 Producción de enzimas en paja de trigo.....	35
6.2.3 Producción de enzima lacasa.....	36
6.3 Determinación de proteína .....	37
6.4 Biomasa.....	40
<b>7. DISCUSIÓN.....</b>	<b>42</b>
7.1 Activación enzimática.....	42
7.2 determinación de proteína.....	43
7.3 producción de biomasa.....	43
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>44</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>45</b>

## INDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA</b>	<b>DESCRIPCION</b>	<b>PÁGINAS</b>
FIGURA 1.	TRATAMIENTO Y ACONDICIONAMIENTO PARA EL CULTIVO DEL HONGO P. OSTREATUS. .....	33
FIGURA 2.	PRODUCCIÓN DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS UTILIZANDO COMO SUSTRATO PAJA DE SORGO. ....	35
FIGURA 3.	PRODUCCIÓN DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS UTILIZANDO COMO SUSTRATO PAJA DE TRIGO. ....	36
FIGURA 4.	PRODUCCIÓN DE ENZIMA LACASA EN AMBOS TRATAMIENTOS T1 (PAJA DE SORGO), T2 (PAJA DE TRIGO). ....	37
FIGURA 5.	DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA EN TRATAMIENTO 2. PAJA DE TRIGO. ....	38
FIGURA 6.	DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA EN EL TRATAMIENTO 1, PAJA DE SORGO. ....	39
FIGURA 7.	DETERMINACIÓN DE BIOMASA EN LOS SUSTRATOS PAJA DE SORGO (T1) Y PAJA DE TRIGO (T2).....	40

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. PROPIEDADES QUÍMICAS DE HONGOS COMESTIBLES.....	16
TABLA 2. PRINCIPALES TIPOS DE MATERIALES LIGNOCELULOSICOS Y SUS APLICACIONES ACTUALES <sup>[5]</sup> . .....	21
<b>TABLA 3.</b> COMPOSICIÓN DE LA BIOMASA LIGNOCELULOTICA DE VARIOS RESIDUOS AGRÍCOLAS <sup>[15]</sup> .....	25
TABLA 4. COMPARACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS CELULOLITICAS. ....	41

## 1. INTRODUCCIÓN

Las enzimas se han implicado en muchas aplicaciones industriales, hablando de enzimas celolíticas las más utilizadas son la Celulasas, Amilasa, Xilanasas estas se pueden ser producidas por diversos microorganismos ya sean bacterias y hongos.

La producción de hongos son una buena fuente de producción de enzimas ya que estos son degradadores de materia orgánica, especialmente de sustratos celilolíticos puesto que se alimentan principalmente de lignina, celulosa y azúcares que se encuentran disponibles en sustratos. La mayor parte de los componentes de las pajas de cereales son la lignina y celulosa (incluyendo proteína y minerales), están asociados a la pared celular, algunos ejemplos de sustrato son paja de trigo, paja de sorgo, de maíz, caña, cebada etc.

Por lo tanto, tiene la capacidad de secretar enzimas celulolíticas y lignocelulolíticas las cuales son proteínas especializadas capaces de acelerar la velocidad de una reacción química, promoviendo así la transformación de diferentes moléculas en productos específicos.

El hongo *P. ostreatus* es uno de los hongos más producidos en Latinoamérica ya que es muy resistente a condiciones hostiles y se puede desarrollar muy fácilmente lo podemos encontrar con mucha facilidad en la naturaleza ya que como se mencionó anteriormente es un hongo degradador de materia orgánica, es por ello que los sustratos seleccionados para producir este hongo son los indicados ya que la paja de trigo y sorgo son desechos agroindustriales ricos en lignina y celulosa y eso permitirá el desarrollo del hongo.

El presente trabajo tiene como objetivo de Evaluar cinéticamente la producción de las enzimas Xilanasas, Celulasas, Amilasa y Lacasa, durante el desarrollo de la cepa *Pleurotus ostreatus* utilizando paja de trigo y paja de sorgo como sustratos en cultivo sólido.

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo general**

Evaluar cinéticamente la producción de las enzimas Xilanasa, Celulasa, Amilasa y Lacasa, durante el desarrollo de la cepa *Pleurotus ostreatus* utilizando paja de trigo y paja de sorgo como sustratos en cultivo sólido.

### **2.2 Objetivos específicos.**

- Establecer las condiciones de producción de la cepa de *P. ostreatus* en cultivo sólido.
- Evaluar la cinética de producción cada 7 días hasta observar la invasión total del sustrato por el micelio.
- Determinar la actividad enzimática de las enzimas Xilanasa, Celulasa, Amilasa y Lacasa.
- Comparación de la producción de enzimas celulolíticas en paja de trigo y de soya.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Los hongos comestibles como el *Pleurotus ostreatus* son degradadores eficientes de lignina y celulosa ya que producen durante su crecimiento enzimas lignocelulolíticas. Los hongos de este tipo requieren de sustratos con nutrientes específicos para su desarrollo, principalmente los que proporcionan fuentes de carbono y energía, estas fuentes nutricionales son la celulosa, la hemicelulosa y la lignina. Por lo tanto, el empleo de desechos agroindustriales como sustrato sólido para el crecimiento del hongo permitiría no solamente obtener un alimento como es el hongo comestible sino también extractos enzimáticos celulolíticos y ligninolíticos del material fermentado residual, lo que daría un gran valor agregado a los desechos agroindustriales.

El presente trabajo se determinó la cinética de producción de enzimas durante todo el crecimiento del hongo, utilizando como sustratos paja de sorgo y paja de trigo. Presentando una nueva alternativa de obtención de enzimas de este tipo aprovechando los residuos agroindustriales.

## 4. ANTECEDENTES

### 4.1 Generalidades

*P. ostreatus* es un hongo lignícola saprófito, conocido con el nombre común de hongo ostra. Pertenece a la clase *Basidiomycetes*, orden *Agaricales*, familia *Agaricaceae*. Su desarrollo ocurre durante la estación otoñal e inicio de primavera, aunque en sitios húmedos también es posible encontrarlo en otras estaciones del año. Esta especie presenta gran versatilidad y adaptabilidad, ya que tolera un rango amplio de temperaturas; además, presenta resistencia a plagas y enfermedades, y se puede cultivar prácticamente sobre cualquier sustrato lignocelulósico como troncos, corteza o aserrín. [8]

En condiciones silvestres crece en troncos y ramas de planifolios muertos o debilitados, en bosques de ribera, parques y jardines. Su desarrollo ocurre durante la estación otoñal e inicio de primavera, aunque en sitios húmedos también es posible encontrarlo en otras estaciones del año. Esta especie presenta gran versatilidad y adaptabilidad, ya que tolera un rango amplio de temperaturas; además, presenta resistencia a plagas y enfermedades, y se puede cultivar prácticamente sobre cualquier sustrato lignocelulósico como troncos, corteza o aserrín. [19]

La composición química de *P. ostreatus* es muy variable y depende del estado de desarrollo y la cepa utilizada; la variabilidad es ocasionada por diferencias en el contenido de humedad, temperatura y la presencia de nutrientes. Esta especie constituye un alimento altamente proteico, posee un elevado contenido de vitaminas (Tiamina (B1), Riboflavina (B2), Piridoxina (B6) y Cobalamina (B12)); y actúa como una fuente importante de calcio y fósforo. Además de su valor nutritivo, *P. ostreatus* posee enzimas específicas capaces de degradar lignina,

fenoles y polifenoles hasta un 60% del contenido original, por lo que es una de las especies más utilizadas en la investigación de residuos aptos para su cultivo. Normalmente, el cultivo de *Pleurotus* se realiza sobre sustratos preparados con paja de cereales, como trigo, centeno o cebada, cortados en trozos de 2 a 4 cm de longitud. A modo de ejemplo, se ha observado una producción de 100 a 200 kg por tonelada de paja de trigo, también observaron una elevada producción de *P. ostreatus* en residuos derivados de actividades agroindustriales, como pulpa de café, hojas usadas en la extracción de aceites esenciales y bagazo de caña de azúcar.[19]

El cultivo de hongos comestibles (setas) es un sistema de bioconversión ecológica, debido a la transformación de los residuos agrícolas en alimentos energéticos y proteínicos realizada por los microorganismos. Las setas poseen un alto contenido de humedad, entre 87 y 93% según las condiciones de manejo al momento de la cosecha, la mayoría de los hongos frescos contienen de 2 a 4% de proteína en base húmeda, y de 10,5 a un 30,5% en base seca, contienen nueve aminoácidos esenciales como leucina y lisina, que están ausentes en la mayoría de los cereales, las propiedades químicas del hongo se pueden observar en la tabla 1. [19]

**Tabla 1.** Propiedades químicas de hongos comestibles.

Especie de Hongo	Gramos por cada 100 g de materia fresca					Referencia
	Humedad	Grasa cruda	Minerales	Proteína cruda	Fibra cruda	
<i>Agaricus bisporus</i>	91.4	0.3	0.8	1.8	2.0	(24) (25)
<i>Amanita caesarea</i>	93.8	nr	0.7	0.81	1.02	(27)
<i>Boletus edulis</i>	90.8	0.5	0.6	1.7	2.1	(24) (27)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	92	0.4	0.9	1.6	nr	(24) (25)
<i>Pleurotus spp.</i>	92.4	nr	0.6	1.2	1.7	(27)
<i>Ramaria flava</i>	92.7	nr	0.6	1.1	1.7	(27)

El alto valor nutricional que posee *P. ostreatus* le ha permitido ser catalogado como la carne vegetal, porque presenta el doble del contenido proteico que los vegetales tradicionales, además tiene un elevado contenido de vitaminas (tiamina (B1), riboflavina (B2), piridoxina (B6), cobalamina (B12), ácido ascórbico (C), ácido nicotínico, ácido fólico y tocoferol), y actúa como fuente importante de calcio y fósforo. Además, contiene ácidos grasos esenciales como el oleico, palmítico y linoléico [7].

Los hongos del género *Pleurotus* son los más fáciles y menos costosos de producir, debido a la alta adaptabilidad, agresividad y productividad, además tienen la habilidad de crecer en diferentes residuos orgánicos. Presentan buen desarrollo en productos secundarios (viruta) de la industria maderera, residuos vegetales de los cereales, bagazo de la caña de azúcar, rastrojos de maíz, cáscaras de oleaginosas (soya, frejol, garbanzo, maní, pseudotallo de plátano), etc. Los nutrientes necesarios para el crecimiento y desarrollo de los hongos comestibles son fundamentalmente carbohidratos (celulosa y hemicelulosa), compuestos nitrogenados (por adición de compuestos que poseen nitrógeno como los sulfatos de amonio, urea o guanidina) y minerales [18].

El beneficio de cultivar esta especie de hongos es muy atractivo, por su bajo costo de producción debido a que puede ser cultivado en desechos agroindustriales lignocelulósicos. Estos materiales lignocelulósicos son poco aprovechados al tiempo que se producen de forma natural en cantidades enormes en la tierra, pues se estima sean producidas 1x10<sup>10</sup> TM cada año. [11]

Estudios realizados han demostrado que aproximadamente el 70% de los desechos agrícolas no están siendo utilizados en su totalidad. Los hongos al ser cultivados sobre este tipo de desechos, no solo pueden convertir toda esta biomasa lignocelulósica en alimento, sino que además, generan productos biomedicinales con notables beneficios a la salud. La bioconversión de dicho material lignocelulósico en alimento y otros productos contribuyen al manejo de desechos agrícolas e industriales; además,

presenta uno de los procesos de reciclaje orgánico más económico. Las setas que produce el hongo son aptas para incluirlo en la dieta humana, contiene alto valor nutricional. Posterior a la cosecha del hongo, el residuo (rastrojo) presenta mejorías que podrían ser aprovechadas en la alimentación animal. [2]

## **4.2 Condiciones de cultivo**

El hongo comestible *Pleurotus ostreatus* requiere de condiciones ambientales especiales para su óptimo desarrollo y crecimiento. Los factores que se deben tomar en cuenta para favorecer el crecimiento son: características del sustrato, temperatura, humedad relativa, concentración de CO<sub>2</sub> en la cámara y la influencia de la luz.

### **4.2.1 Características del sustrato**

El hongo *Pleurotus ostreatus* requiere sustratos con nutrientes específicos para su desarrollo, principalmente los que proporcionan fuentes de carbono y energía. Estas fuentes nutricionales son la celulosa, la hemicelulosa y la lignina. Este hongo puede crecer a relaciones carbono/nitrógeno (C/N) entre 30 y 300. La relación óptima varía con relación a la fase de crecimiento en la que se encuentra el hongo. La etapa de desarrollo del micelio se ve favorecida con relaciones C/N altas, mientras que las bajas relaciones C/N favorecen el desarrollo del cuerpo fructífero [3].

#### **4.2.2 Temperatura**

La temperatura es un factor importante en el crecimiento de hongo, así como en la cantidad y calidad de cuerpos fructíferos producidos. El micelio del hongo *Pleurotus ostreatus* puede crecer en un rango de temperaturas entre 0 y 35°C. Estudios demuestran que la temperatura óptima para el desarrollo del micelio es de 25 °C [3].

#### **4.2.3 Humedad relativa**

La humedad relativa es un factor importante que se encuentra ligado a la temperatura, ya que, si aumenta la temperatura en el cuarto de cultivo, la humedad relativa disminuye. El contenido de humedad en el sustrato debe estar entre 50 y 80% para favorecer el desarrollo del micelio. La humedad relativa óptima para el fructificación está entre el 85 y el 90% [3].

#### **4.3 Sustratos**

La paja de cereales es un subproducto fibroso altamente disponible, aunque su utilización en alimentación animal está limitada por su bajo valor nutritivo. La composición de la paja depende de la proporción de hojas/tallos, el diámetro del tallo y la altura de la planta, de modo que se presentan variaciones ligadas a la especie, el ecotipo o la climatología. La mayor parte de los componentes de las pajas de cereales (incluyendo proteína y minerales), están asociados a la pared celular. Como media, contienen un 72% de FND distribuida en un 38% de celulosa, un 25% de hemicelulosa, un 8% de lignina y un 0,2% de cutina. Las dos primeras son potencialmente fermentables por la flora digestiva, pero su degradación se ve limitada por la estructura cristalina de la celulosa y por la existencia de enlaces covalentes con la lignina. [10]

#### **4.3.1 Forraje de sorgo**

El sorgo es una planta originaria de la India y uno de los principales cultivos de México. La producción se utiliza prácticamente en su totalidad para el consumo animal. Las denominaciones “sorgo forrajero” y “sorgo grano” provocan algunas confusiones, debido a que se trata de la misma planta y el sorgo grano está también considerado como un producto forrajero. La diferencia es que cuando se habla de sorgo forrajero, se refiere a la utilización de toda la planta, ya sea verde o seca, y no sólo del grano. El sorgo forrajero puede achicalarse, ensilarse o henificarse; siempre para consumo animal [16].

El sorgo pertenece a la familia de las gramíneas. Tiene cañas de dos a tres metros de altura, llenas de un tejido blanco y algo dulce, vellosas en los nudos. Tiene hojas lampiñas, ásperas en los bordes. Las flores aparecen en una panoja floja, grande y derecha; o bien espesa, arracimada y colgante. La planta se adapta bien en zonas áridas o semiáridas con calor [16].

El rastrojo de sorgo constituye una excelente fuente de fibra (8 a 10 toneladas de forraje por hectárea), disponible en un momento “clave” en el manejo de pasturas y animales, en la tabla 2 se puede observar el uso y los principales sustratos lignocelulosicos y sus aplicaciones actuales en la cual se encuentran los sustratos que se utilizaran. [6]

**Tabla 2.** Principales tipos de materiales lignocelulosicos y sus aplicaciones actuales <sup>[5]</sup>.

<b>Material Lignocelulósico</b>	<b>Residuos</b>	<b>Uso común</b>
Cosecha de grano	Paja, mazorcas, tallos, cáscaras	Comida de animal, combustible, composta, acondicionador de suelo
Trigo, arroz, avena y maíz	Aguas residuales, salvado	Comida de animal
Granos procesados: Maíz, trigo, arroz y soja	Semillas, cáscaras, cortezas.	Comida para peces y animales, algunas semillas para extracción de aceite
Cosecha de frutas y vegetales	Fruta entera rechazada y jugo	Comida para peces y animales, algunas semillas para extracción de aceite
Procesamiento de frutas y vegetales	Semillas, cortezas, aguas residuales, cáscaras, fruta entera rechazada y jugo	Combustible
Caña de azúcar y otros productos del azúcar	Bagazo	Comida para animales, fertilizante y combustible
Aceites y plantas oleaginosas. Nueces, semillas de algodón, aceitunas, soja, etc.	Cáscaras, pelusas, fibras, lodos, fangos y aguas residuales	Acondicionadores de suelos
Residuos animales	Estiércol, otros desperdicios	Acondicionador de suelo
Papel de origen vegetal y pulpa. Talado de árboles	Residuos de madera, hojas, corteza, etc.	Industria del papel y la pulpa, viruta.
Residuos de aserradero y contrachapado de madera	Astillas, viruta, aserrín	Fibra de madera
Molinos de pulpa y papel	Residuos de fibra, licor de sulfito	Reutilización como pulpa y en la industria de la madera como combustible
Desperdicios lignocelulósicos de comunidades	Periódicos viejos, papel, cartón, tablas viejas, maderas en desuso	Un porcentaje pequeño es reciclado, la mayoría es quemado.
Hierba	Hierba sin uso	Quemado

#### **4.4 Enzimas**

A lo largo de la historia se han venido empleando las enzimas para usos industriales, una de las enzimas comúnmente utilizadas es la celulosa obtenida mediante fermentación de diferentes microorganismos puede sintetizarse durante parte de su ciclo de crecimiento [9].

Las enzimas son proteínas especializadas capaces de acelerar la velocidad de una reacción química, promoviendo así la transformación de diferentes moléculas en productos específicos. La alta especificidad con la que se llevan a cabo dichas transformaciones, el volumen reducido de desechos que generan dichos procesos y las condiciones poco agresivas en las que se operan, han permitido que estos biocatalizadores se posicionen como elementos preponderantes en diversos sectores industriales. En efecto, se considera que en aquellos sectores industriales en donde está involucrada al menos una reacción química, existe la posibilidad de integrar una enzima al proceso de transformación. No obstante que las enzimas se han utilizado desde hace varios siglos en industrias como la cervecera, láctea, de panificación o peletera, es hasta finales del siglo XIX y principios del XX que se establece su naturaleza o mecanismo de acción. De hecho, aun cuando la compañía Röhm (Alemania) utilizó por primera vez en 1914 la enzima tripsina en la industria de detergentes, la naturaleza proteica de las enzimas fue probada hasta 1926 por Sumner. Más aún, se considera que su producción por fermentación a gran escala la inició formalmente la compañía Novo Industri (actualmente Novozymes) en la primera parte de los años sesenta, al producir una glucoamilasa útil en la transformación de almidón en glucosa.[12]

Bacterias y hongos pueden producir enzimas celulasas para la hidrólisis de material lignocelulósico. Estos microorganismos pueden ser aeróbicos o anaeróbicos, mesófilos o termófilos. Géneros y especies de hongos tales como *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Neurosporacrassa*, incluyendo

además hongos comestibles como: *Lentinula edodes*, *Volvariella volvacea*, *Pleurotus* sp., producen celulasas [9].

#### **4.4.1 Celulasas**

Las celulasas y xilanasas son enzimas hidrolíticas que participan en el rompimiento de los enlaces glicosídicos  $\beta$ -1,4 presentes en los polisacáridos de la celulosa y hemicelulosa, respectivamente.

La celulosa es el componente más abundante en la biomasa de las plantas. Cualquier proceso que pueda convertir material celulósico en glucosa de manera eficiente y económica tendría un enorme significado industrial. Las enzimas celulolíticas son sintetizadas por numerosos microorganismos. Las bacterias y hongos son los principales agentes naturales de la degradación de la celulosa, sin embargo, los hongos son bien conocidos por la descomposición de materia orgánica, en particular de sustratos celulósicos [8].

Las celulasas es el nombre genérico que recibe el complejo enzimático celulolítico que, como su nombre lo indica, es capaz de hidrolizar la celulosa, homopolímero compuesto por unidades de glucosa unidas mediante un enlace glicosídico  $\beta$ -1,4. Las celulasas se diferencian de otras glicosil-hidrolasas por su habilidad de hidrolizar el enlace glicosídico  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4); estas enzimas están clasificadas de acuerdo con su sitio de acción en el sustrato celulósico y se dividen en tres grandes grupos: Endoglucanasas (EnG) que cortan uniones de fibra celulósica generando oligosacaridos de varias longitudes, Exoglucanasas o también conocidas como celobiohidrolasas (ExG) que actúan en regiones externas de celulosa liberando unidades de celobiosa, y las  $\beta$ -glucosidasas (BG) que hidrolizan celobiosa y oligosacaridos solubles en. Siendo la glucosa el resultado final de la acción degradativa del complejo celulolítico sobre el polímero de celulosa. [4]

#### **4.4.2 Xilanasas**

Las xilanasas pueden obtenerse de fuentes microbianas como bacterias y hongos. Los hongos pueden producir una variedad de  $\beta$ -xilanasas inducidas por xilanos, los cuales son sustratos caros que hacen poco rentable su producción incrementando los costos del proceso. Materiales lignocelulósicos como el bagazo de caña de azúcar, el rastrojo de maíz, granos de cereales, salvado de trigo y salvado de avena se han usado como sustratos para el crecimiento de los microorganismos por medio de cultivos en fase sólida, el cual es un método de cultivo llevado a cabo sobre un material no soluble que actúa como un soporte físico y como una fuente de nutrientes [8]. Esta forma de cultivo ha sido usada como una herramienta útil en la producción compuestos con valor agregado como edulcorantes, etanol, ácidos orgánicos, aminoácidos, metabolitos secundarios con actividad biológica y xilanasas. [13]

##### **4.4.2.1 Métodos de producción de xilanasas**

Las xilanasas representan uno de los mercados comerciales de mayor éxito entre las hemicelulasas comerciales, éstas representan un mercado de ganancias de alrededor de los 200 millones dólares. Una tendencia creciente en las ventas generadas por su comercialización, se deben a su uso potencial en aplicaciones en la industria de alimentos y otras más.

Como se mencionó las xilanasas microbianas son inducidas por xilanos, los cuales hacen altamente costoso el proceso de producción, en la tabla 3 se menciona la el contenido de celulosa, hemicelilosa y lignina de varios residuos agrícolas que se pueden utilizar como sustrato, es por ello el uso de subproductos agrícolas, que resultan ser abundantes y de bajo costo como sustratos en los procesos de fermentación para la producción de xilanasas, es una de las alternativas sustentables para reducir los costos de producción.

**Tabla 3.** Composición de la biomasa lignocelulotica de varios residuos agrícolas <sup>[15]</sup>

	Composición (% base seca)		
	Celulosa	Hemicelulosa	Lignina
Fibra de maíz	15	35	8
Mazorca de maíz	45	35	15
Rastrojo de maíz	40	25	17
Salvado de arroz	35	25	12
Salvado de trigo	30	50	20
Bagazo de caña de azúcar	40	24	25
Pasto varilla (Switchgrass)	45	30	12
Pasto de la costa de Bermuda	25	35	6

Entre las tecnologías existentes para la producción industrial de las xilanasas, se encuentra la fermentación en fase sólida (SSF, por sus siglas en inglés). Ésta muestra algunas ventajas sobre métodos de fermentación tradicionales de cultivo sumergido y bajo costo. Además, esta tecnología de cultivo permite el uso de diferentes materiales agrícolas o residuos agroindustriales como sustratos tal como el salvado de soya, salvado de trigo y el salvado de avena, materiales fibrosos como el bagazo de caña de azúcar, piel de limón y naranja, entre otros. Enzimas xilanolíticas son producidas satisfactoriamente usando sustratos sólidos como granos de maíz, salvado de trigo, salvado de arroz, cabezas de cempasúchil, pasta de uvas [1].

#### **4.4.2.2 Hongos productores de xilanasas**

Por otro lado los hongos filamentosos son organismos modelo para la producción de xilanasas debido a sus altas actividades enzimáticas. Además, los hongos se pueden desarrollar perfectamente sobre sustratos sólidos por medio de un crecimiento en hifas, lo cual promueve un crecimiento estable y permite una buena tolerancia a bajas actividades de agua ( $a_w$ ), así como resistencia a condiciones de baja presiones osmótica. De esta forma los hongos son buenos candidatos para la producción de xilanasas en sistemas de fase sólida. El modelo de crecimiento en hifas permite una ventaja competitiva de los hongos filamentosos sobre el desarrollo unicelular de los microorganismos, ya que pueden colonizar el soporte sólido en forma más eficiente y aprovechar los nutrientes disponibles del soporte sólido. El crecimiento en hifas permite al hongo un mejor contacto sobre el soporte sólido; además de esto, la secreción de enzimas hidrolíticas de las hifas permite una mejor acción más eficiente de las enzimas permitiendo un incremento de la invasión del microorganismo y por tanto aumenta la accesibilidad de nutrientes disponibles. Los hongos no pueden transportar sustrato macromolecular, sin embargo las hifas permiten un mejor contacto entre la anatomía del hongo y la superficie del soporte sólido. El micelio del hongo sintetiza y excreta altas cantidades de exoenzimas hidrolíticas, resultando en una catálisis eficiente y los productos de la hidrólisis que corresponden a nutrientes simples (azúcares simples y proteínas) en contacto con el micelio, atraviesan de la membrana celular y promueven la biosíntesis y actividad metabólica de los hongos filamentosos [1].

#### **4.2.2.3 Perspectivas de las xilanasas en la industria de alimentos**

La degradación enzimática del xilano ha encontrado diversas aplicaciones en diferentes industrias alimentarias y otras. Una de las áreas de mayor uso es la industria de la panificación debido a la degradación enzimática de los arabinoxilanos presentes en las masas. Las xilanasas rompen los componentes insolubles de la pared celular (pentosanos) resultando en la solubilización de los componentes, cuyos efectos se ven reflejados desde los procedimientos del amasado y un aumento del volumen del pan ya horneado. La adición de varias enzimas como hemicelulasas, amilasa, lipasa, glucosa oxidasa, celulasas y xilanasas sobre las propiedades físicas, químicas y sensoriales del pan se ha estudiado [17].

## **5. METODOLOGÍA**

### **5.1 Acondicionamiento del área de siembra y cultivo del hongo *Pleurotus ostreatus*.**

#### **5.1.1 Tratamiento del sustrato**

Los sustratos se sometieron a un tratamiento térmico (esterilización), para esto primero se pesaron 50g de cada sustrato para 21 muestras de cada sustrato, después se colocaron en mallas identificadas, y se inició con el proceso de esterilización por un periodo de una hora esto se realizó con la finalidad de evitar la contaminación de las muestras.

#### **5.1.2 Humedad**

La humedad relativa debe de estar entre 80 y 90% esto se controló aplicando riegos de dos a tres veces al día, mojando pisos y paredes del cuarto donde se encontraban las muestras esto para tener una humedad dentro de los parámetros mencionados anteriormente.

#### **5.1.3 Temperatura**

La temperatura del cuarto donde se encuentran las muestras debe de estar en un rango 20 a 28°C, pero la temperatura óptima para el desarrollo del micelio es de 23°C, la temperatura se estuvo monitoreando mediante un termómetro, para aumentar la temperatura se hacía mediante un calentador.

#### **5.1.4 Establecimiento de la cinética.**

Se sembraron 21 bolsas para cada tratamiento por un periodo de 35 días, colocadas en estantes en un cuarto donde se controlaron los parámetros de humedad y temperatura, se tomaron tres muestras cada 7 días a las cuales se les evaluaron: peso, fibra, proteína y se extrajo el extracto enzimático.

### **5.1.5 Inoculación de los sustratos.**

Para los dos tratamientos trabajados se utilizó pellets(semilla de sorgo) inoculado con micelio del hongo *Pleurotus ostrestus* conservado a -4°C este fue proporcionado por el departamento Fitomejoramiento de la universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Los sustratos empleados para los dos tratamientos fueron paja de trigo y sorgo utilizando 50g los cuales se colocaron en mallas para posteriormente ser esterilizados en un recipiente de aluminio por un periodo de 1 hora.

Después de esterilizar los sustratos se prosiguió a la siembra en una área previamente desinfectada para evitar la contaminación de las muestras , se sembraron 21 bolsas para cada tratamiento colocando los 50g de sustrato y el 15% de semilla el proceso de siembra se realizó colocando una capa de sustrato y adicionando un poco de la semillas , este proceso se siguió hasta terminar con la cantidad de sustrato y semilla especificada anteriormente, finalmente se cerraron las bolsa, identificaron y se llevaron a un cuarto donde se podrá controlar las condiciones óptimas para lograr el desarrollo del hongo.

## **5.2 Cinética de producción**

### **5.2.1 Obtención de extracto enzimático**

Para la obtención del extracto enzimático se utilizó buffer de citratos pH 5, 50, se agregaron 50 mL de buffer a cada bolsa para posteriormente agitar para asegurar la extracción total de las enzimas producidas. El contenido de la bolsa fue filtrado en papel filtro con una bomba de vacío, el sobrenadante fue recolectado en un tubo para posteriormente congelarlo hasta su uso.

### **5.2.2 Ensayo enzimático**

#### **5.2.3 Actividad enzimática la de amilasa**

La actividad de la enzima amilasa se midió utilizando el método del reactivo ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) descrito por Miller. Se agregaron diez microlitros de extracto del extracto enzimático crudo a 90  $\mu$ L de almidón al 10% en agua destilada y se incubaron a 50 ° C durante 60 min, posteriormente se adicionaron 100  $\mu$ L de DNS para detener la reacción. La solución se hirvió durante 10 min y luego se colocó en hielo durante 5 min. La cantidad de azúcar reductor se determinó utilizando el método DNS con maltosa como estándar, midiendo la absorbencia a 546 nm en un espectrofotómetro (BIOBASE EL-10A); 1 U de amilasa se definió como la cantidad de enzima requerida para la liberación de 1  $\mu$ mol de azúcar reductor en equivalentes de maltosa por minuto.

#### **5.2.4 Actividad enzimática la de celulasa**

La celulasa se midió utilizando carboximetilcelulosa (CMC) como sustrato. Se agregaron diez microlitros de solución del extracto del extracto enzimático crudo en 90  $\mu$ L de solución de CMC al 1% y se hicieron reaccionar a 50°C durante 60 min, y luego se midieron usando el ensayo de DNS a 546 nm con glucosa como estándar; 1U de CMC se definió como la cantidad de enzima requerida para la liberación de 1  $\mu$ mol de azúcar reductor en equivalentes de glucosa por minuto en las condiciones de ensayo descritas anteriormente.

#### **5.2.5 Actividad enzimática la de xilanasa**

La actividad de la xilanasa se estimó utilizando una suspensión del 1% (p / v) de Xilano de madera de haya como sustrato. Una mezcla compuesta de 90  $\mu$ l de xilano al 3%. Y 10  $\mu$ l de extracto enzimático crudo se hizo reaccionar a 40°C durante 30 min y la cantidad de azúcar reductor se determinó utilizando el método DNS a 546 nm con D-xilosa como estándar. Las actividades enzimáticas se expresan en unidades, donde 1 U se define como la cantidad de enzima requerida para la producción de 1  $\mu$ mol de producto / min, y la productividad se presenta.

### **5.2.6 Determinación de lacasa**

La actividad de lacasa se analizó midiendo la oxidación de 2,2'-azinobis [3-etilbenzotiazolona-6-sulfónico ácido] (ABTS). El extracto de SMC (10  $\mu$ L) se mezcló con 90  $\mu$ L de tampón de acetato de sodio 50 mM (pH 4.5) que contiene ABTS 1 mM y luego reaccionó a temperatura ambiente. La reacción se detuvo mediante la adición de 100  $\mu$ l de 20% (p / v) ácido tricloroacético. La oxidación de ABTS se controló a 420 nm en un espectrofotómetro. Una unidad de actividad enzimática. Se definió como la cantidad de enzima requerida para oxidación de 1  $\mu$ mol / min del sustrato bajo el ensayo condiciones

### **5.3 Determinación de biomasa**

La determinación se llevó a cabo por diferencia de peso en base al peso inicial de la muestra con diferencia del peso de la muestra seca después del crecimiento micelial del hongo *P. ostreatus* considerando el porcentaje de materia seca del sustrato y la materia seca de la semilla del hongo. Cada determinación se realizó por duplicado por muestreo en intervalos de 7 días hasta los 35 días de crecimiento micelial del hongo *P. Ostreatus*.

### **5.4 Determinación de Proteína.**

La determinación de proteínas por el método de Bradford consiste en la cuantificación de la unión de un colorante, el Azul de Coomassie G-250, a la proteína, comparando esta unión con la de diferentes cantidades de una proteína estándar (Albúmina de huevo). 100 $\mu$ l de extracto enzimático más 100  $\mu$ l de colorante diluido 1 a 10 y se realizó por triplicado se leyó a 546 nm.

## **6. RESULTADOS**

El uso y manejo del hongo requiere de condiciones adecuadas para este pueda crecer y desarrollarse en el tiempo correcto, las condiciones cuando son modificadas pueden alterar el crecimiento o el tiempo necesario para obtener el fruto de este hongo. Es por eso que en el inicio de este proyecto se determinaron los espacios dentro del departamento de Ciencia y Tecnología de alimento y en el departamento de Fitomejoramiento; que permitiera tener un mejor control de los hongos y las condiciones.

### **6.1 Condiciones de cultivo**

En la figura1 se observa cómo se realizó el experimento desde la etapa de tratamiento de los sustratos, así como la forma en la cual se preparó la cinética en la cual se determinó la actividad enzimática. Cada tratamiento se realizó en una bolsa cuidando todas las condiciones previamente establecidas para la cinética. En el cultivo de este tipo de hongos es muy importante evitar al máximo los puntos de contaminación por lo que es necesario siempre cuidar las corrientes de aire, así como la restricción de la entrada de personal ajeno al experimento que pueda contaminar.



**Figura 1.** Tratamiento y acondicionamiento para el cultivo del hongo *P. ostreatus*.

- a) Sustratos en mallas identificadas para ser esterilizados.
- b) Esterilización de los sustratos por una hora.
- c) Bolsas con el sustrato inoculado.
- d) Muestras colocadas en el cuarto donde se podrá controlar los parámetros: temperatura y humedad.

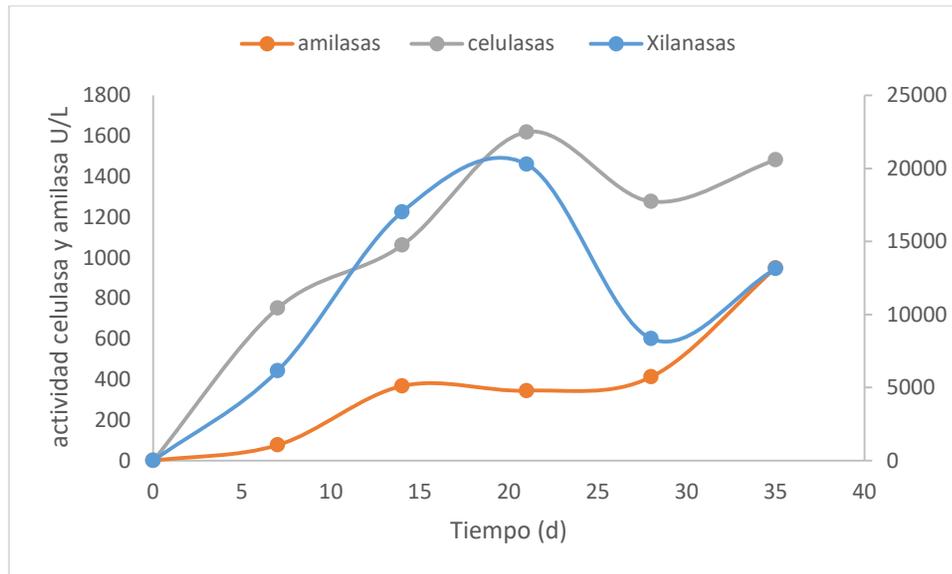
## **6.2 Cinética de producción**

En este estudio se evaluó la producción de enzimas durante los primeros 35 días de fermentación con la finalidad de encontrar diferencias en el modo de metabolizar los sustratos por este hongo. Durante este periodo no fue suficiente para poder observar la producción del cuerpo fructífero del hongo *Pleurotus ostreatus* por lo que se pretende evaluar la mayor producción de enzimas antes de que el hongo empiece la etapa de producción de biomasa.

Los resultados que se obtiene de la cinética de producción de enzimas permiten establecer el momento en el cual el hongo está más activo metabólicamente, esto permite tener un parámetro importante de cuándo será necesario detener la fermentación para la producción de metabolitos y cuando se puede acelerar el metabolismo para la producción del fruto.

### **6.2.1 Producción de enzimas en paja de sorgo**

En la figura 2 se presentan los resultados obtenidos de la producción de enzimas utilizando sorgo como sustrato. Se observa a partir del día 7 la producción de las 3 enzimas pero se identifica como en el día 21 se presenta una actividad xilanasa muy elevada llegando a detectar 20288 U/L. Este mismo comportamiento se observa con la enzima celulasa llegando a una actividad máxima a los 21 días de 1629 U/L y se puede ver de una manera clara como el comportamiento de las enzimas celulasas seguirá en aumento conforme el tiempo. Este efecto no se presenta en la producción de amilasas ya que se mantiene constante la producción a los 14 y 21 días alrededor de los 350 U/L pero en el día 35 se indica un incremento de hasta 949.99 U/L esto indica que a partir del día 35 la producción de amilasas se incrementara conforme pasen los días.



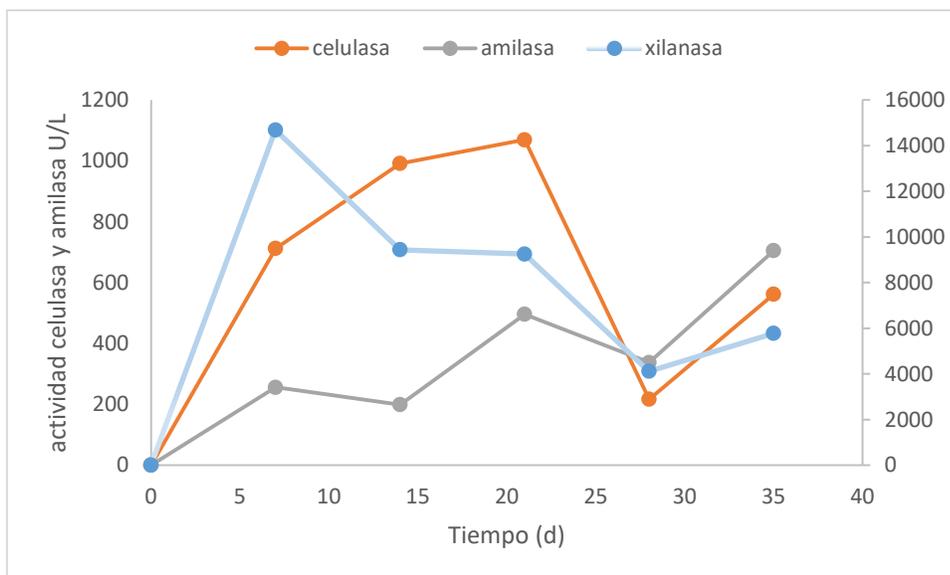
**Figura 2.** Producción de enzimas celulolíticas utilizando como sustrato paja de sorgo.

### 6.2.2 Producción de enzimas en paja de trigo

En la figura 3 se puede observar como la enzima xilanasas va disminuyendo conforme pasa el tiempo, ya que a los 27 días se obtiene el valor menor de actividad con 4113.49 U/L mientras que en las primeras 7 días se obtuvo una actividad de 14691 U/L, lo que marca una tendencia a la disminución conforme pasen los días de fermentación.

La producción de la enzima celulasas muestra su mayor punto de producción en el día 21 con un valor de 1069 U/L mostrando una producción inicial a los 7 días de 712 U/L. el aumento en los días de fermentación mantendría un aumento en la producción de esta enzima hasta el día 27 puesto que después la producción se ve muy disminuida.

Las amilasas tiene una tendencia de producción constante hasta el día 27, a partir de ese día se observa como la producción de enzima amilasa irá en aumento conforme avancen los días.

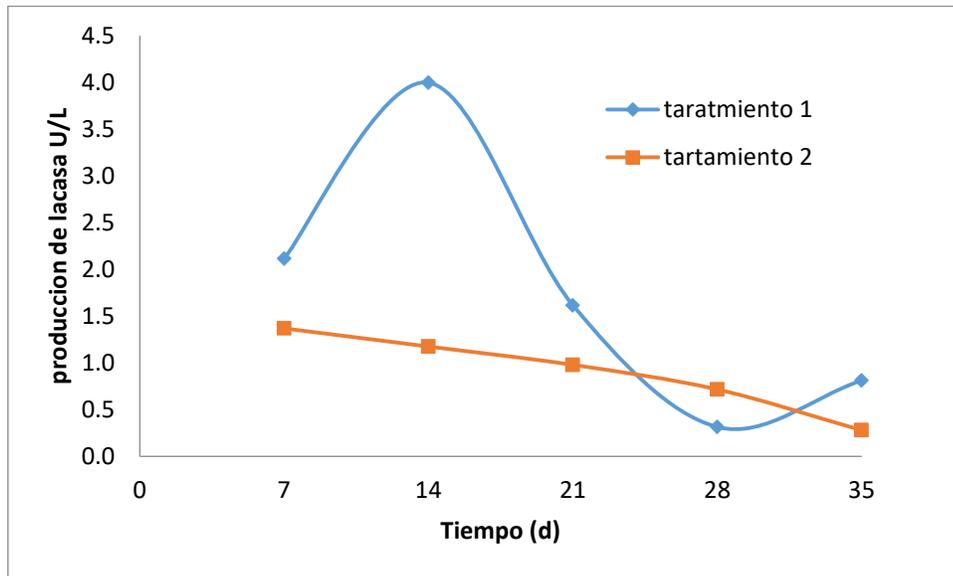


**Figura 3.** Producción de enzimas celulolíticas utilizando como sustrato paja de trigo.

### 6.2.3 Producción de enzima lacasa

La enzima lacasa tiene una gran importancia debido a la capacidad que muestra al catalizar reacciones de óxido reducción utilizando diferentes sustratos en este caso para esta investigación se pretende relacionar con la presencia de lignina.

Como se muestra en la figura 4 la producción de lacasa presenta una alta variabilidad dependiendo del tipo de sustrato que se está utilizando, por ejemplo lo que se observa en el tratamiento 1 utilizando paja de sorgo, la mayor producción enzimática se obtuvo en el día 14 con 3.997 U/L y el tratamiento 2 utilizando paja de trigo fue en el día 7 con 1.367 U/L, la producción enzimática es bastante variada, con base a este comportamiento se determinó que el sustrato de paja de sorgo obtuvo mayor producción de enzimas lacasa.

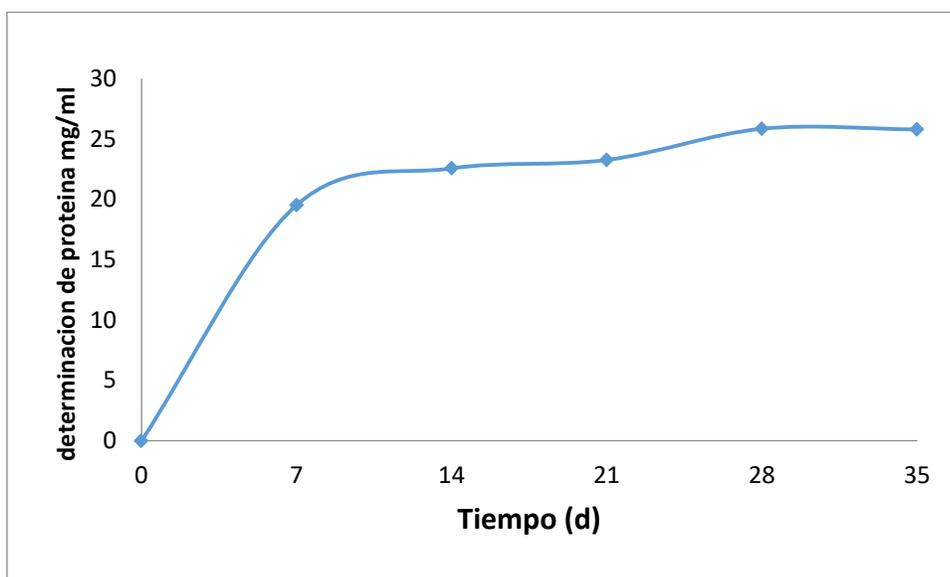


**Figura 4.** Producción de enzima lacasa en ambos tratamientos T1 (paja de sorgo), T2 (paja de trigo).

### 6.3 Determinación de proteína

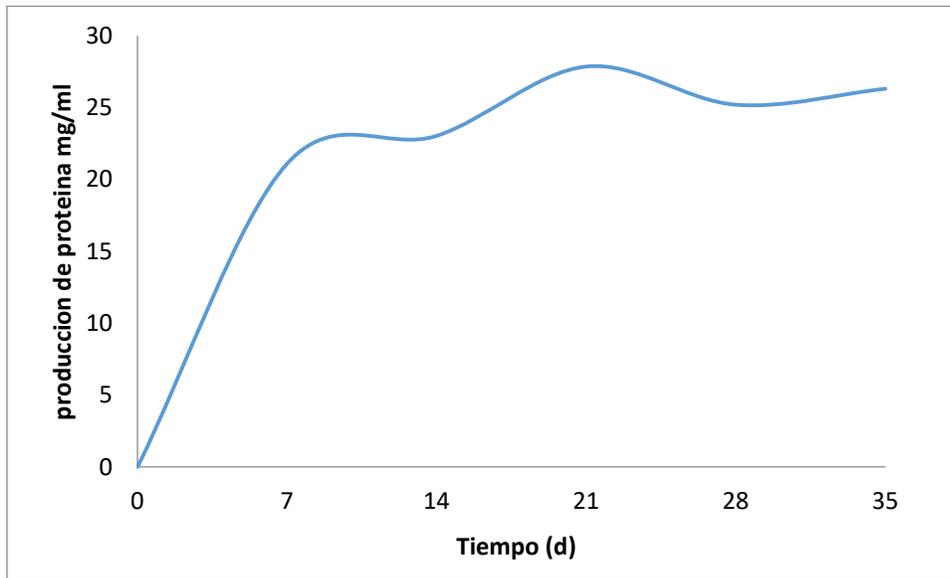
La producción de proteína en cualquier investigación relacionada con enzimas es muy importante ya que por lo general es asociada con la producción de las enzimas de interés. Siendo este valor un referente en la producción de enzimas ya que el comportamiento de la producción de enzimas en una cinética se relaciona a como el metabolismo está trabajando para la producción.

Se observa en la figura 5 que en el día 7 se inicia con un contenido de proteína de 20 mg/ml y conforme pasaron los días la concentración de proteína se mantuvo en aumento, su tendencia fue constante hasta el día 35 y conforme este comportamiento se puede deducir que la proteína se mantendrá con una concentración constante conforme el crecimiento del hongo.



**Figura 5.** Determinación de proteína en tratamiento 2. Paja de trigo.

La concentración de proteína se mantiene constante conforme los días de crecimiento del hongo van teniendo su mayor producción, presentando la mayor concentración en el día 21 con 27.84 mg/ml, mientras que transcurrieron los días la cantidad de proteína se mantuvo constante como se observa en la figura 6. Este efecto se puede atribuir a la forma en la cual el hongo se está adaptando. Conforme el hongo está creciendo es necesario que se desdoble mayor cantidad de fuente de carbono por lo que la producción de las enzimas tiene que presentar un aumento, posterior a esta etapa de producción, el metabolismo vuelve a presentar una estabilidad.

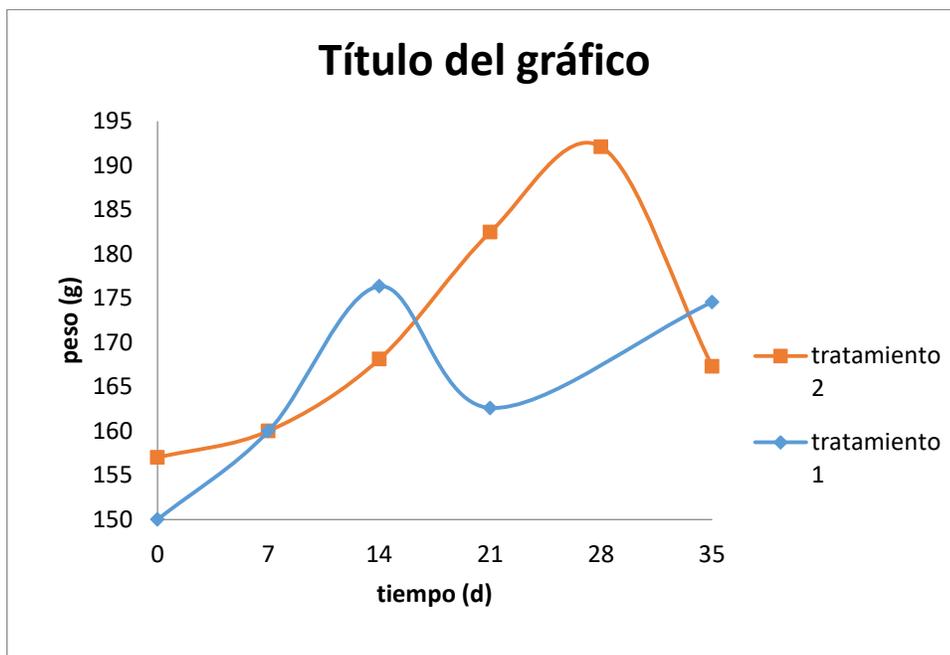


**Figura 6.** Determinación de proteína en el tratamiento 1, paja de sorgo.

#### 6.4 Biomasa

Se observa en la figura 7 el aumento de biomasa en el tratamiento 2 (paja de trigo) el comportamiento es el esperado puesto que la biomasa va en creciendo conforme van pasando los días, teniendo mayo aumento en el día 28 de 192.08 g.

El comportamiento de biomasa en el tratamiento 1 (paja de sorgo) es bastante irregular conforme pasan los días de crecimiento del hongo.



**Figura 7.** Determinación de biomasa en los sustratos paja de sorgo (T1) y paja de trigo (T2)

### **Comparación de producción enzimática**

Con la comparación de tratamientos se determinó que el mejor tratamiento para producción celulolíticas fue el tratamiento 1 donde se utilizó paja de sorgo como sustrato ya que fue donde se encontró mayor producción de las cuatro enzimas evaluadas, ya que el comportamiento de la actividad enzimática tobo diferencias tanto en la cantidad de enzimas producidas como en el día de máxima producción como se muestra en la tabla 4.

**Tabla 4.** Comparación de la producción de enzimas celulolíticas.

Tratamiento 1		
Enzima	Día máximo de producción	Cantidad U/L
Xilanasa	21	20288.30
Amilasa	35	949.99
Celulasa	21	1619.82
Lacasa	14	3.997
Tratamiento 2		
Enzima	Día máximo de producción	Cantidad U/L
Xilanasa	7	14691.30
Amilasa	35	704.96
Celulasa	21	1069.15
Lacasa	7	1.367

## 7. DISCUSIÓN

### 7.1 Activación enzimática

El comportamiento de la producción enzimática es muy diferente cuando se emplean distintos sustratos como paja de trigo y paja de sorgo a pesar de que se trabajó con el mismo hongo en ambos sustratos. La celulasa en el T1 tiene una tendencia de aumento constante conforme transcurren los días de crecimiento del hongo, el punto máximo de producción se presentó en el día 21 con 1619.82 U/L, y su tendencia de producción es constante conforme transcurren los días. El comportamiento de la celulasa en el T2 se puede observar en la figura 6 donde también su mayor punto de producción fue en el día 21 con 1069.16 U/L, pero a diferencia que el tratamiento 1 a partir de este día la producción enzimática tuvo una disminución notoria ya para el día 35 contaba con tan solo 561.54U/L. En trabajos similares como el de Reddy et al (2003) encontró la máxima actividad enzimática para la celulasa en el día 20 de fermentación en medio sólido al utilizar sustrato de hojas de plátano, la máxima actividad en los tratamientos trabajados se presentó en el día 21 siendo así solo un día de diferencia en base al trabajo mencionado anteriormente.

El punto máximo de producción de xilanasa en el T1 se presentó en el día 21 con 20288.30U/L, durante los días de desarrollo del hongo se presentó una tendencia de producción enzimática constante como se puede observar en la figura 2. A diferencia del tratamiento 1 la xilanasas tiene su mayor producción en el día 7 con 14691.30 U/L, conforme continuaron los días la producción descendió ya que en el día 35 se obtuvo una producción de 5773.76U/L como se observa en la figura 3.

Las amilasas en el T1 presento tendencia de producción constante hasta el día 27 412.57U/L ya que después comenzó con un aumento en la producción y para el día 35 con 948.99U/L, como se puede observar en la figura 2 a partir del día 35 aumentara la producción. En la figura 3 se puede observar un comportamiento similar de la amilasa en el T2 ya que a partir del día 35 también comenzará el aumento de la producción.

La producción de enzima lacasa como se muestra en la figura 3 es muy diferente en cada tratamiento ya que su punto máximo de producción se presenta en diferentes días en el caso de T1 la mayor producción es de 3.99 U/L el día 14, y a diferencia del T2 en los primeros 7 días de crecimiento del hongo se presenta su punto máximo con 1.367 U/L. comparando estos resultados con el estudio realizado por Ghosh et al (1988) que utilizó biomasa lignocelulotica como sustrato para la fomentación en medio sólido reporta la máxima actividad enzimática de lacasa entre los días 16 y 24 de incubación con 3.0 U/L, así que el T1 se encuentra dentro de los estándares de producción.

## **7.2 determinación de proteína.**

La producción de proteína en ambos tratamientos no se encontró diferencias significativas ya que su comportamiento fue similar como se puede observar en las figuras 5 y 6.

## **7.3 producción de biomasa**

Al comparar los dos tratamientos trabajados presentan diferentes tendencias de producción, como se puede observar en la figura 7, a pesar que los dos tratamientos se sometieron a las mismas condiciones de incubación el sustrato fue distinto y por ello el crecimiento de la biomasa se presentó en diferentes días.

## **8. CONCLUSIONES**

- Se establecieron las condiciones para la producción de la cepa del hongo *P. ostreatus* en cultivo sólido las cuales fueron: temperatura óptima de 23°C, humedad relativa de 80 a 90%, humedad del sustrato que debe estar entre 50-80%.
- La cinética de producción cada 7 días durante periodo de 35 días, mostro una invasión inicial del micelio al sustrato, en el día 4 presentando una invasión total a partir del día 28.
- El tratamiento que presento mayor actividad enzimática de las 4 enzimas evaluadas fue tratamiento 1 con xilanas 20288.30 U/L, celulasa 1619.82 U/L, amilasa 949.99 U/L y lacasa 3.997 U/L.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Betini J.H.A., Michelin M., Peixoto S.C., Terenzi H.F., Polizeli M. 2009. Xilanases from *Aspergillus niger*, *Aspergillus niveus* and *Aspergillus ochraceus* produced under solid-state fermentation and their application in cellulose pulp bleaching. *Bioprocess Biosyst Eng.* 32, 819-824.
2. Arrúa, M., y Quintanilla, J. 2007. Producción del hongo ostra (*Pleurotus ostreatus*) a partir de las malezas *Paspalum fasciculatum* y *Rottboellia cochinchinensis*. Costa Rica.
3. Garzón, J. y Cuervo, J., 2008, "Producción de *Pleurotus ostreatus* sobre residuos sólidos lignocelulósicos de diferente procedencia", NOVA – Publicación Científica en Ciencias Biomédicas, 6 : 10,101.
4. Ghosh, M. y Mukherjee, R. y Nandi, B., 1998, "Production of extracellular enzymes by two *Pleurotus* species using banana pseudostem biomass", *Acta Biotechnologica*, 18,243-254.
5. Howard, R., Abotsi E., Jansen van Rensburg E. y Howard S., 2003, "Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production", *African Journal of Biotechnology*, 2 12,602. [4]
6. Mieres, J; Banchemo, G; Tieri, M; La Mana, A. 2011. En tiempos de la agricultura: ¿Cómo mejorar la utilización del rastrojo de sorgo para la alimentación de ganado bovino? Disponible en [http://www.produccion-animal.com.ar/produccion\\_y\\_manejo\\_pasturas/pastoreo%20sistemas/55es\\_conviente\\_el\\_encierre\\_nocturno.pdf](http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_y_manejo_pasturas/pastoreo%20sistemas/55es_conviente_el_encierre_nocturno.pdf) [15]

7. Magdaleno, C. 2013. Efecto de dos sustratos en la productividad y calidad nutricional del hongo *Pleurotus Ostreatus*. 2. Saltillo-Mexico.[17]
8. María T. Varnero<sup>1</sup>, Madelaine S. Quiroz<sup>1</sup> y Cristian H. Álvarez<sup>2</sup>.(2010). Utilización de Residuos Forestales Lignocelulósicos para Producción del Hongo Ostr(*Pleurotus ostreatus*) Vol. 21(2),1320.
9. Paredes Medina D., Álvarez Núñez M., Silva Ordoñez M. (2010). Obtención de Enzimas Celulasas por Fermentación Sólida de Hongos para ser Utilizadas en el Proceso de Obtención de Bioalcohol de Residuos del Cultivo de Banano, Tecnológica ESPOL – RTE, 1:23.
10. Paja de cereales (trigo y cebada) | FEDNA. (2019). Retrieved 28 November 2019, from [http://www.fundacionfedna.org/ingredientes\\_para\\_piensos/paja-de-cereales-trigo-y-cebada](http://www.fundacionfedna.org/ingredientes_para_piensos/paja-de-cereales-trigo-y-cebada).
11. Pineda, J., Ramos, L., y Claudia, S. 2014. Producción de *Pleurotus ostreatus* por fermentación en estado sólido. ICIDCA. 48(2). [19]
12. Rodríguez, Rosales, M. (2014). Enzimas aplicadas en procesos industriales. *revista digital universitaria Universidad Autonoma de Mexico*, [online] 12, .1.
13. Rodríguez S., Sanromán M.A., 2006. Application of solid-state fermentation to food industry – A review. *J Food Eng.* 76, 291 – 302.
14. Raimbault M. 1998. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electronic journal of Biotechnology.* 1, 1 – 15

15. Saha B. 2003. hemicellulose converssion. J Ind Microbiol Biotechnol. 30, 279 – 291.
16. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural | Gobierno | gob.mx-Sorgo forrajero. (2019). Retrieved 28 November 2019, from <https://www.gob.mx/agricultura>
17. Vries R.P., Battaglia E., Coutinho P.M., Henrissat B., Visser J. 2010. Hemicellulose degrading enzymes and their encoding genes from *Aspergillus* y *Trichoderma*. The Mycota. 14, 341- 350.
18. Vargas, P., José, H., y Mosquera, S. 2012. Uso de hoja rasca de roble y bagazo de caña en la producción de *Pleurotus ostreatus*. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial. 10 1.
19. Varnero1,. Quiroz y . Álvarez, M. (2010). Utilización de Residuos Forestales Lignocelulósicos para Producción del Hongo Ostra (*Pleurotus ostreatus*). In *Información Tecnológica*. 2:12, 1320 (2nd ed., p. 14). Santiago-Chile: Dr. José Omar Valderrama Méndez.