



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Producción de enzimas fibrolíticas por *A. niger* GS1 mediante fermentación en estado sólido de rastrojo de maíz y su evaluación en la digestibilidad *in vitro* de un subproducto agroindustrial

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

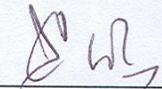
Q.F.B. Immer Jahazel Vázquez Obregón

Dirigido por:

Dr. Carlos Regalado González

SINODALES

Dr. Carlos Regalado González
Presidente



Firma

Dra. Blanca E. García Almendárez
Secretario



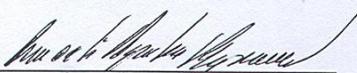
Firma

Dra. Lilia Arely Prado Barragán
Vocal



Firma

M.C. Araceli Aguilera Barreyro
Suplente

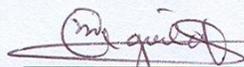


Firma

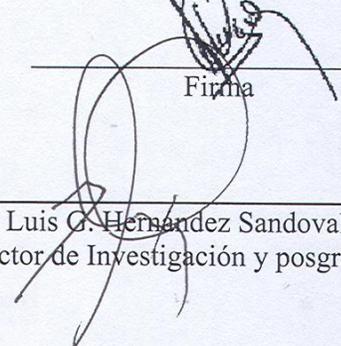
Dr. Jorge Domínguez Domínguez
Suplente



Firma



Q.B. Magali E. Aguilar Ortíz
Director de la Facultad



Dr. Luis G. Hernández Sandoval
Director de Investigación y posgrado

Centro Universitario
Santiago de Querétaro, Qro.
Noviembre de 2008
México

RESUMEN

El rastrojo de maíz como subproducto resultante de la actividad agroindustrial, puede ser incorporado a la dieta de los rumiantes, debido a que presenta gran cantidad de fibra. No obstante, la fibra no se aprovecha al máximo, ya que los microorganismos presentes en el rumen del animal se ven inhibidos por la lignina, resultando en una baja digestibilidad. Este trabajo tiene por objetivo la obtención de enzimas fibrolíticas por *A. niger* GS1 mediante fermentación en estado sólido (FES) usando como sustrato rastrojo de maíz. El tamaño de partícula, humedad y el tiempo de incubación del hongo fueron evaluados durante la FES en columnas empacadas rellenas con rastrojo de maíz suplementado, para inducir enzimas fibrolíticas. La actividad de mananasa, xilanasa y celulasa fueron determinadas midiendo los azúcares reductores liberados durante la reacción enzima sustrato. Una unidad de actividad (U) se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar un μmol de azúcares reductores por mg de proteína, a 50°C . Se determinó el efecto de la adición de nueve nutrientes complementarios al medio base en la producción de enzimas fibrolíticas. La producción de enzimas fibrolíticas en función de los componentes del medio de producción fue optimizada a través de un diseño de composición central. La tasa de crecimiento de *A. niger* GS1 se evaluó indirectamente en función a la producción de CO_2 producido, por cromatografía de gases. El menor tamaño de partícula del rastrojo de maíz tratado con 4% NaOH, acondicionado al 80% (p/v) de humedad, y sometido a 48 h de FES, mostró la mayor producción de mananasa, xilanasa y celulasa. La glucosa, el extracto de levadura, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y CuSO_4 fueron los nutrientes con mayor significancia para la producción de mananasa, xilanasa y celulasa, respectivamente, usando suplementación específica para cada uno. La mayor producción de CO_2 se observó después de las 12 h de FES, lo cual puede indicar un comportamiento diauxico, ya que después de este tiempo el hongo empezó a liberar enzimas fibrolíticas para obtener energía del rastrojo de maíz. La digestibilidad ruminal *in vitro* de materia seca y la digestibilidad verdadera *in vitro* de la materia seca aumentaron cuando el rastrojo de maíz fue tratado con NaOH y al mayor tiempo de exposición a las enzimas fibrolíticas (mananasa, xilanasa y celulasa).

Palabras clave: Fermentación en estado sólido, enzimas fibrolíticas, digestibilidad ruminal *in vitro* de materias seca, digestibilidad verdadera *in vitro* de materia seca.

SUMMARY

Corn stover is a by-product resulting from the agroindustrial activity, it can be used for ruminants feed due to its large amount of fiber content. However, the fiber is not used to its maximum potential, because the microorganisms present in the rumen are inhibited by lignin, resulting in a poor digestibility. The aim of this work was to produce fibrolytic enzymes by *A. niger* GS1 using solid-state fermentation (SSF) and corn stover as substrate. Corn stover was milled to different particle sizes and pretreated with 4% NaOH to partially remove lignin. The particle size, moisture and fungal incubation time were evaluated during SSF in a column reactor fill with supplemented corn stover, to induce fibrolytic enzymes. Xylanase, mannanase and cellulase activities were determined by measuring the release of reducing sugars during the enzymes-substrate reaction. One unit of enzyme activity (U) was defined as the amount of enzyme that releases 1 μmol of reducing sugar per mg of protein, at 50° C. A fractional factorial design was applied to determine the effect of nine supplementing nutrients. A central composite design was then used to optimize the production of fibrolytic enzymes, using the significant nutrients resulting from the previous design. The growth of *A. niger* GS1 was determined indirectly by released CO₂, using gas chromatography. The maximum production of mannanase, xylanase and cellulase was obtained with the smaller particle size of corn stover, pretreated with 4% NaOH at 80% (w/v) moisture content, after 48 h of SSF. Glucose, yeast extract, ammonium sulfate and copper (II) sulfate significantly contributed to an optimum production of mannanase, xylanase and cellulase, respectively, using specific supplementation for each one. The maximum CO₂ production was observed after 12 h of SSF, which may indicate a diauxic behavior, because after this time the fungus probably started to release fibrolytic enzymes to obtain energy from the corn stover. *In vitro* digestibility of dry matter and *in vitro* digestibility true of dry matter were higher when the corn stover was pretreated with NaOH and exposed for long time to fibrolytic enzymes (mannanase, xylanase and cellulase).

Keywords: Solid-state fermentation, fibrolytic enzymes, *in vitro* digestibility of dry matter, *in vitro* digestibility true of dry matter.

DEDICATORIAS

A DIOS por hacer posible mi existencia, haberme dado fortaleza y sabiduría para alcanzar mi meta. Gracias, porque todo lo que soy es por tí.

A mis padres (Alma y Eulalio) con eterno cariño por su apoyo incondicional, confianza y consejos, pero sobre todo por el amor que me brindan día con día.

A mi hermana Karen por ser un soporte en mi vida, por tu ayuda en los malos y buenos momentos. Gracias por ser la mejor de las hermanas.

A toda mi familia (PALAÚ, MONCLOVA, SABINAS, SAN ANTONIO, etc.) y cuando digo a toda, es TODA... por su apoyo y cariño.

A mis amigos Coahuilenses: Edgar (Compirry), Abdíel, Elíta, La Chiva, Carrillo, Amanda, Vansexa, “el inge”, etc. (perdón por no mencionarlos a todos, pero recuerden que forman parte de los mejores momentos de mi vida).

A mis amigos de Laboratorio y del PROPAC-UAQ: Dr. Sergio, Lolis, Alejandra, Miriam, Violeta, Aldo, Elida, Norma, Giovanna, Juan Carlos, Araceli, Lorenzo, Gely, Claudia, Omar, Chucho, Paola, Consuelo, Julián, Marcelo, “El Parejita” y Humberto.

Y a todos aquellos que directa e indirectamente contribuyeron para mi formación como Maestro en Ciencias.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado en estos dos años.

Al Dr. Carlos Regalado y la Dra. Blanca García, por permitirme realizar este proyecto en su laboratorio.

A la Dra. Lilia Arely Prado Barragán, por sus observaciones y comentarios para mejorar el presente trabajo de investigación.

A la M.C. Araceli Aguilera Barreyro, muchas gracias por su apoyo, sus conocimientos y por su disponibilidad.

Al Dr. Jorge Domínguez Domínguez, por ayudarme en los diseños y análisis estadísticos de mis datos.

A las secretarías del posgrado Carmelita, Laurita, Marigel y Vero muchas gracias por todo.

INDICE

	Páginas
RESUMEN	i
SUMMARY	ii
DEDICATORIAS	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE	v
ÍNDICE DE CUADROS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Rastrojo de Maíz.....	3
2.1.1 Componentes de la pared celular	3
2.2 Factores que limitan su uso en la alimentación animal.....	8
2.3 Tratamientos químicos.....	10
2.4 Fermentación en Estado Sólido (FES)	10
2.5 Fases de la FES	11
2.6 Factores que influyen en la FES	11
2.6.1 Humedad y Actividad de Agua (Aw)	12
2.6.2 Transferencia de calor y temperatura.....	13
2.6.3 Tamaño y porosidad de partícula.....	13
2.6.4 pH.....	14
2.6.5 Aireación y difusión de nutrientes.	14
2.7 Fermentación en Estado Sólido (FES) vs Fermentación Sumergida (FS).....	15
2.8 Reactores para la FES.	16
2.9 Sustratos usados en la FES	20
2.10 Microorganismos empleados en la FES.....	20
2.10.1 <i>Aspergillus</i>	21
2.11 Biomasa.....	24

2.12 Obtención de metabolitos mediante la FES	24
2.13 Enzimas.....	24
2.13.1 Mananasas.....	25
2.13.2 Xilanasas.....	26
2.13.3 Celulasas	26
2.14 Aplicación de enzimas fibrolíticas para mejorar la digestibilidad de subproductos agrícolas.....	27
3. JUSTIFICACIÓN	28
4. OBJETIVOS.....	29
4.1 Objetivo general	
4.2 Objetivos específicos	
5. ESTRATEGIA GENERAL	30
6. MATERIALES Y MÉTODOS	31
6.1 Sustrato	31
6.2 Disminución del tamaño de partícula	31
6.3 Análisis proximal del rastrojo de maíz	31
6.4 Microorganismo.....	35
6.4.1 Preparación del inculo.....	36
6.5 Crecimiento de <i>A. niger</i> GS1 sobre rastrojo de maíz.....	36
6.6 Pretratamiento del sustrato.....	36
6.7 Condiciones de fermentación para el rastrojo de maíz	37
6.8 Determinación del tamaño de partícula para la FES.....	37
6.9 Determinación del efecto de la humedad en la FES	37
6.10 Desarrollo de <i>A. niger</i> GS1 durante la fermentación.....	38
6.11 Diseño experimental para determinar la importancia de nutrientes.....	38
6.12 Optimización en la producción de enzimas	38
6.13 Obtención del extracto enzimático crudo	39

6.14 Determinación de la producción enzimática.....	39
6.14.1 Determinación de celulasas y hemicelulasas	39
6.15 Determinación de proteína.....	40
6.16 Cinética de crecimiento microbiano	41
6.17 Preparación de extractos enzimáticos para uso en experimento <i>in vitro</i>	41
6.18 Efecto del extracto enzimático sobre el rastrojo de maíz	41
6.19 Digestibilidad <i>in vitro</i>	41
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
7.1 Análisis químico proximal del rastrojo de maíz	44
7.2 Crecimiento fúngico sobre el rastrojo de maíz	44
7.3 Tratamiento alcalino	46
7.3.1 Observaciones microscópicas antes y después del tratamiento alcalino.....	47
7.4 Determinación del tamaño de partícula para la FES.....	47
7.5 Determinación de humedad para la FES.....	49
7.6 Desarrollo de <i>A. niger</i> GS1 sobre el sustrato de fermentación	50
7.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA SIGNIFICANCIA DE SALES Y OPTIMIZACIÓN PARA LA PRODUCCIÓN ENZIMÁTICA.....	53
7.7.1 Significancia de sales para la producción de enzimas fibrolíticas	52
7.7.2 Optimización para la producción de enzimas fibrolíticas	58
7.8 Cinética de crecimiento microbiano en las mejores condiciones de FES.....	67
7.9 Efecto del extracto enzimático sobre el rastrojo de maíz	69
7.10 Digestibilidad ruminal <i>in vitro</i> de la materia seca (DRIVMS).....	70
7.10 Digestibilidad verdadera <i>in vitro</i> de materia seca (DVIVMS)	71
8. CONCLUSIONES.....	74
9. BIBLIOGRAFÍA.....	75
10. ANEXOS	84

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Superficie cosechada en México (has) de rastrojo de maíz	4
2. Rendimiento de rastrojo de maíz (ton/ha).....	4
3. Principales enzimas producidas por <i>A. niger</i> para uso industrial	23
4. Contenido nutricional del rastrojo de maíz antes y después del tratamiento con NaOH al 4% (p/v)	45
5. Actividad enzimática resultante de la FES del rastrojo de maíz por <i>A. niger</i> GS1 a las 48 h	49
6. Actividad enzimática resultante del diseño factorial fraccionado 2^{9-5}	54
7. Efecto de los factores para la producción enzimática	56
8. Actividad enzimática resultante del diseño de optimización (Draper-Lin)	59
9. Efecto de los factores para la producción enzimática en el diseño de optimización.....	60
10. Coeficiente para las ecuaciones cuadráticas que representan la actividad de mananasa, xilanasa y celulasa	63
11. Niveles óptimos de los factores para la optimización enzimática	66
12. Contenido nutricional del rastrojo de maíz tratado con hidróxido de sodio al 4% a diferente tiempo de exposición al extracto enzimático.....	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Estructura de la celulosa	6
2. Estructura química de glucuronoxilano (A) y galactoglucomanano (B)	6
3. Estructura parcial de la lignina	7
4. Representación esquemática de la pared celular vegetal a cuatro niveles	9
5. Biorreactor de bandeja	18
6. Biorreactor de tambor rotatorio	18
7. Reactor de columna empacada	19
8. Esquema representativo de la morfología de <i>A. niger</i>	22
9. Tratamiento del rastrojo de maíz con NaOH al 4% (p/v) por 12 h.....	48
10. Actividad enzimática durante la FES.....	51
11. Desarrollo microscópico de <i>A. niger</i> GS1 sobre rastrojo de maíz durante la FES.....	52
12. Perfil de predicción de los diferentes factores en la producción enzimática de acuerdo al diseño 2^{9-5}	57
13. Gráficos de efectos principales en la optimización para la producción de enzimas fibrolíticas	62
14. Gráficos de superficie de respuesta estimada en la optimización para la Producción de enzimas fibrolíticas	64
15. Gráficos de probabilidad normal de los efectos, usando el diseño Draper-Lin para la optimización de enzimas fibrolíticas.....	65
16. Producción de CO ₂ y actividad enzimática durante la FES	68
17. Digestibilidad ruminal <i>in vitro</i> de la materia seca	72
18. Digestibilidad verdadera <i>in vitro</i> de la materia seca.....	73

1. INTRODUCCIÓN

Como resultado de la actividad agroindustrial existen diversos subproductos, los cuales pueden ser una fuente importante de energía para la alimentación de los rumiantes, considerando que se encuentran disponibles en cantidades importantes. Se ha intentado mejorar la digestibilidad de la fibra proveniente de los esquilmos agrícolas a través de procesos biológicos, la adición de enzimas fibrolíticas exógenas, puede ser una alternativa para el aprovechamiento de nutrientes contenidos en dichos residuos, ya que como resultado de su acción fibrolítica puede aumentar la digestibilidad de los subproductos (Plata *et al.*, 1994; Roa *et al.*, 1997), como es el caso del rastrojo de maíz.

Después de la cosecha de las mazorcas de maíz, queda un residuo constituido principalmente por partes vegetativas como: tallos y hojas. El rastrojo de maíz puede ser incluido en la dieta del ganado lechero o alternativamente, puede utilizarse directamente para ganado de pastoreo (Orduña *et al.*, 2002), con el fin de aportar fibra necesaria para el funcionamiento del rumen, especialmente cuando las vacas ingieren cantidades altas del rastrojo.

Los componentes más abundantes de las paredes celulares del rastrojo de maíz son la celulosa y la hemicelulosa, ambos polímeros pueden ser digeridos por enzimas celulolíticas y hemicelulolíticas respectivamente, producidas por las bacterias y protozoarios que habitan en el rumen de los rumiantes. Aunque este proceso es eficiente, se han buscado métodos para mejorar la digestión de la fibra suministrada al ganado, como lo es el empleo de enzimas fibrolíticas (hemicelulasas y celulasas) exógenas que complementen la actividad digestiva (Beauchemin *et al.*, 1995; Sutton *et al.*, 2003; Dean *et al.*, 2005). Las enzimas fibrolíticas se han aislado de cultivos de hongos y bacterias, mostrando un efecto positivo al adicionarse durante el proceso de ensilaje de algunos forrajes (Stokes, 1992). Se ha reportado que éstas enzimas aplicadas a los forrajes antes de una incubación *in vitro*, mejoran la digestión de la materia seca y la fibra detergente neutra, sugiriendo que la adición directa de éstas puede mejorar la digestibilidad del forraje (Feng *et al.*, 1996). Además, una mezcla de enzimas puede ser más efectiva que una sola, dado que se puede tener la presencia de hemicelulasas con diferente especificidad, celulasa y en menor cantidad ligninasa (Yang *et al.*, 1999).

Un proceso que es utilizado para la obtención de enzimas fibrolíticas es la fermentación en estado sólido (FES), la cual se ha utilizado en la producción de alimentos fermentados tradicionales y pigmentos (Lee *et al.*, 1995), entre otros. Además, la FES puede aplicarse para la producción de metabolitos microbianos de alto valor agregado, tales como antibióticos, bioplaguicidas, aromas, hormonas y enzimas (Da Silva *et al.*, 2005; Okafor *et al.*, 2007).

La producción de enzimas por FES ha sido un área en el cual varias cepas de hongos filamentosos se han utilizado con éxito, de los cuales uno de los más importantes es el género de *Aspergillus* (Park *et al.*, 2002; Shah y Madamwar, 2005; Botella *et al.*, 2007). La FES es el proceso principal para la producción de enzimas fúngicas (Koutinas *et al.*, 2003), debido a que los hongos filamentosos las producen extracelularmente, haciendo sencillo su proceso de recuperación, teniendo además la ventaja de ser un método simple y que puede usar subproductos agro-industriales como sustrato y fuente de carbono (energía).

Muchas investigaciones se han orientado a la producción de enzimas hidrolíticas del tipo hemicelulasas y celulasas a partir de subproductos agrícolas, que tienen como finalidad las industrias de mayor demanda que son la de alimentos y farmacéutica. Dada la disponibilidad del rastrojo de maíz en México, se plantea la posibilidad de dar un mayor valor agregado a este residuo agroindustrial, utilizándolo en la FES como soporte y fuente de carbono para inducir la producción de enzimas fibrolíticas (hemicelulasas y celulasas). Al adicionar estas enzimas al rastrojo de maíz se espera una significativa degradación de la fibra, que puede aumentar la energía metabolizable al ser usado este residuo agroindustrial como ingrediente en la alimentación de vacas lecheras.

2. ANTECEDENTES

2.1 Rastrojo de Maíz

En México es común la utilización del rastrojo de maíz como alimento para rumiantes, pese a que posee poco valor alimenticio y una baja digestibilidad debido a su estado de lignificación. El interés por la utilización de residuos agrícolas en la alimentación de rumiantes se ha venido incrementando en el ámbito mundial en los últimos años, a medida que la disponibilidad del grano se reduce (Fuentes *et al*, 2001). Este, ha sido una buena alternativa, debido a que existen limitantes para adquirir materias primas necesarias en la elaboración de alimentos balanceados (Espinoza *et al.*, 2004).

El área total cosechada de rastrojo de maíz en México en el 2006 fue de 331,739 hectáreas (ha), teniendo este año el mayor índice (Cuadro 1) en comparación con los 6 años anteriores a este (2000-2005); siendo Jalisco, Chihuahua, Aguascalientes, México, Durango y Coahuila los estados que concentran el 80 por ciento del área total de superficie cosechada de rastrojo de maíz. La producción anual en México de rastrojo de maíz del período 2000-2006 se muestra en el Cuadro 2, teniendo el año 2002 la mayor producción de este subproducto con una cifra de 32.692 toneladas/hectárea (t/ha) (FAO, 2007). La cantidad de subproductos de la cosecha de maíz, incluyendo cañas, hojas, espigas y hojas de mazorcas, varía de 20 a 25 t/ha, los cuales pueden utilizarse para la alimentación de rumiantes.

2.1.1 Componentes de la pared celular

La pared celular de las plantas consiste principalmente en celulosa, hemicelulosa y lignina. Los carbohidratos estructurales, principalmente la celulosa y la hemicelulosa, son degradados por los microorganismos del rumen, lo cual permite a los rumiantes utilizarlos como fuentes de energía que no pueden ser utilizadas por los monogástricos. La distribución de las diferentes moléculas dentro de la planta y las uniones entre ellas son factores que afectan la facilidad con la cual los microorganismos pueden romper las células (Jung y Allen, 1995).

Cuadro 1. Superficie cosechada en México (has) de rastrojo de maíz

Año	Superficie cosechada (has)
2000	190,000
2001	240,000
2002	260,000
2003	326,923
2004	289,461
2005	311,263
2006	331,739

(FAO, 2007)

Cuadro 2. Rendimiento de rastrojo de maíz (t/ha)

Año	Producción (t/ha)
2000	31.578
2001	31.250
2002	32.692
2003	27.933
2004	30.731
2005	24.904
2006	26.944

(FAO, 2007)

El rastrojo de maíz tiene una estructura compuesta principalmente por:

a) Lignocelulosa

La lignocelulosa es normalmente un complejo cristalino compacto de microfibras de polisacáridos cubiertas por capas de lignina. Las microfibras de polisacáridos son formadas comúnmente por los filamentos de la celulosa y de la hemicelulosa, y a veces también por pectina (Leonowicz *et al.*, 1999).

b) Celulosa.

La celulosa es el polisacárido más abundante en la superficie de la tierra formando parte de la pared celular de las plantas. La estructura básica consiste en un polímero lineal unidos por enlaces glucosídicos β -1,4 (Tipson y Horton, 1988). La estructura molecular consiste en unidades del disacárido, celobiosa (Fig. 1), que se repiten formando cadenas macromoleculares compactadas entre sí por fuertes enlaces de hidrógeno inter e intramoleculares, debido a su estructura, la celulosa es insoluble en la mayoría de los solventes (Catalán *et al.*, 2002), a estas estructuras se le denominan microfibrillas. Éstas contienen regiones con moléculas altamente orientadas y con regiones menos orientadas, las cuales reciben el nombre de regiones cristalinas y amorfas, respectivamente. Ambas regiones de la celulosa (cristalina y amorfa) están presentes en las plantas, de las cuales la región amorfa es observada comúnmente (Tipson y Horton, 1988).

c) Hemicelulosa

La hemicelulosa es el segundo polisacárido estructural más abundante de las plantas, está presente en asociación con la celulosa de las paredes celulares en la mayoría de las especies vegetales (Figura 2). Basado en los principales residuos de azúcares presentes en el esqueleto del polímero, las hemicelulosas pueden ser denominadas xilanos, glucomananos, galactanos o arabinanos. Se considera generalmente que los dos tipos principales de hemicelulosas son los xilanos y los glucomananos (González, 2004).

d) Lignina

La lignina es un compuesto orgánico de naturaleza fenólica que es parte integral de la pared celular. La estructura química de la lignina se muestra en la Figura 3. Este biopolímero contiene alrededor de 10-20% de grupos hidroxilos fenólicos que le confieren rigidez a la pared celular de las plantas y además la protegen del ataque de microorganismos patógenos. Biosintéticamente, la lignina está constituida por 3 alcoholes precursores: los alcoholes cumarílico, coniferílico y 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinamílico.

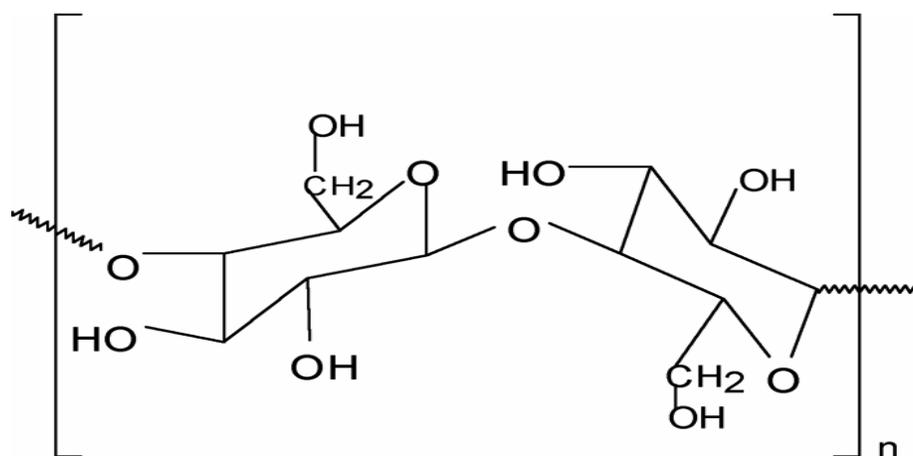


Figura 1. Estructura de la celulosa (Catalán *et al.*, 2002)

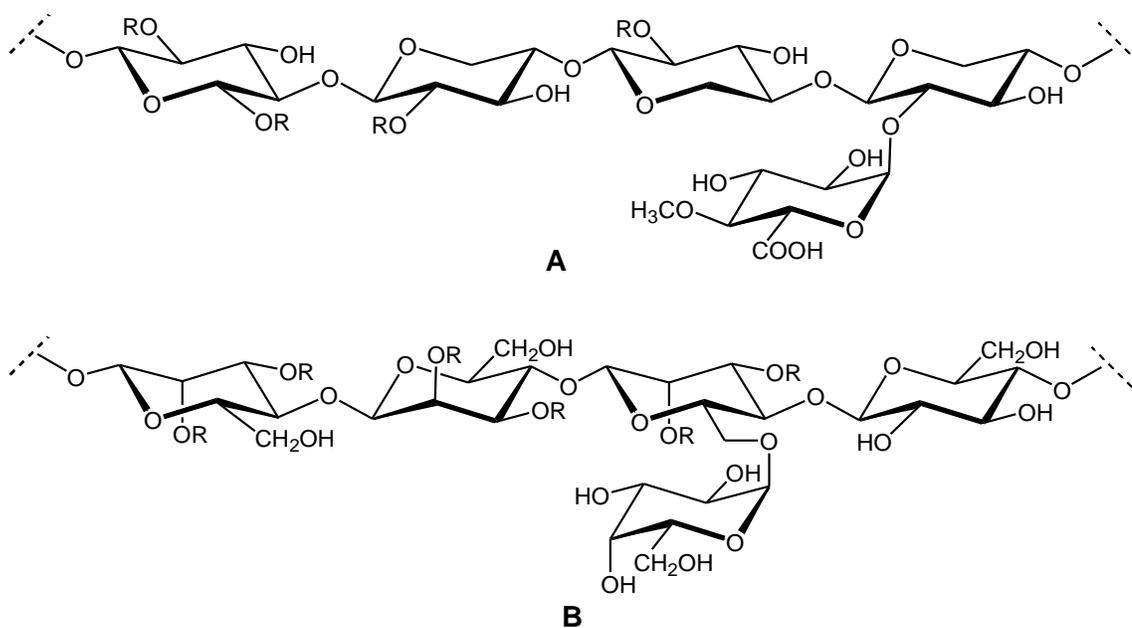


Figura 2. Estructura química de glucuronoxilano (A) y galactoglucomanano (B) (Sjöström, 1993)

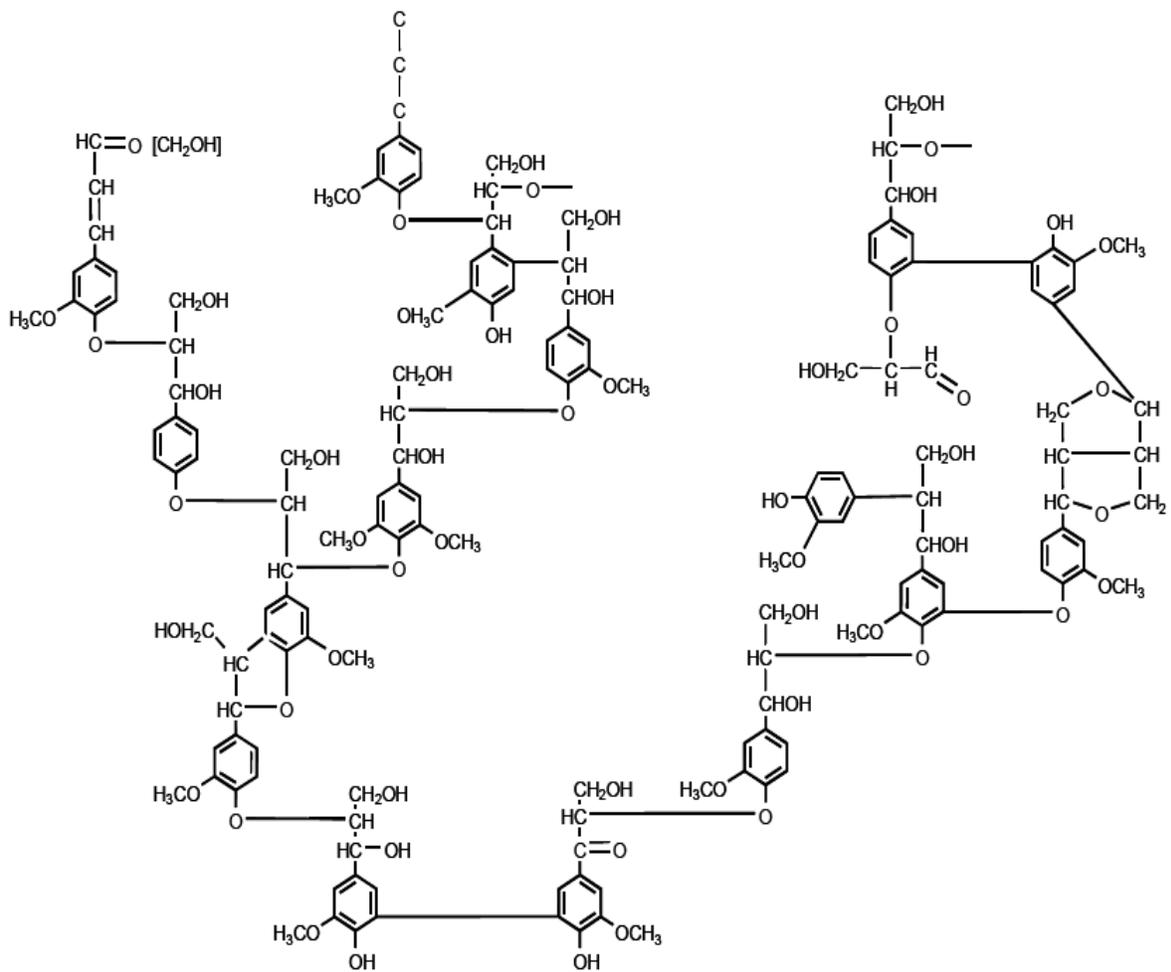


Figura 3. Estructura parcial de la lignina (Dávila y Vázquez-Duhalt, 2006)

Químicamente la lignina es un polímero heterogéneo, amorfo, ópticamente inactivo y altamente ramificado (Dávila y Vázquez Duhalt, 2006). Las características estructurales de este heteropolímero vegetal imponen ciertas restricciones para su biodegradación, como son el tamaño (600-1000 kDa), los enlaces covalentes que presenta (aril-éter, aril-aril y carbono-carbono) y su marcada heterogeneidad (Kirk y Farrell, 1987).

Los polisacáridos de las paredes celulares se consideran inaccesibles para las enzimas microbianas, debido a que la lámina media lignificada de la pared primaria es una barrera no degradable (Gutiérrez, 2004). En la pared secundaria la lignina se encuentra entremezclada con la hemicelulosa formando una matriz que rodea las microfibrillas de celulosa, las cuales se encuentran ordenadas como se muestra en la Figura 4 (Kirk y Farrell, 1987). El grosor de la pared secundaria puede llegar a ocupar el 76% del volumen total de las membranas celulares, lo que hace que esta pared secundaria se relacione con la dureza de la planta (Elizondo, 1998). Las diferentes divisiones en forma de lámina de la pared secundaria fueron denominadas como S1, S2 y S3. La lamina S2 está formada por microfibrillas de celulosa (homopolímero de glucosa) en arreglos helicoidales, mientras que las microfibrillas de S1 y S3 son hélices formadas por heteropolímeros de hemicelulosa (pentosas) y lignina (unidades de fenilpropano) (Elizondo, 1998).

2.2 Factores que limitan su uso en la alimentación animal

El uso de residuos agrícolas como el rastrojo de maíz en la alimentación de rumiantes está limitado por sus altos niveles de fibra (Manyuchi y Smith, 1994), ya que ocasiona una baja digestibilidad debido a los altos niveles de lignina presentes. El valor energético bruto del rastrojo de maíz varía entre 1.69 y 2.1 Kcal/kg de materia seca, lo cual lo hace más digestible que otros subproductos, y se calcula que un aumento de 1% en digestibilidad significa un incremento de 36.7 kcal de energía metabolizable/kg de materia seca (Yescas-Yescas *et al.*, 2004). Una dieta que incluya 20-30% de rastrojo de maíz trozado producirá una ganancia en peso de 800-900 g/día, aunque si se incluye el 60%, la ganancia bajará a 500-650 g/día. Por otro lado, el rastrojo de maíz puede utilizarse en el pastoreo de vacas lecheras secas o con producciones menores a 8 L/día (Mendoza *et al.*, 2001)

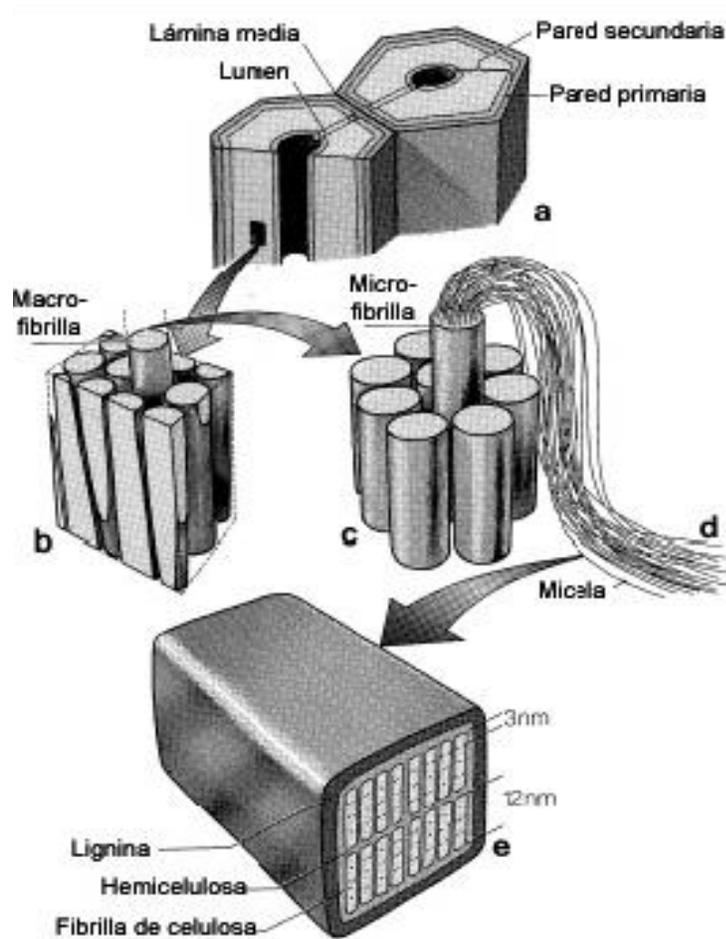


Figura 4. Representación esquemática de la pared celular vegetal a cuatro niveles, aumentando de **a** hacia **c**. **a** Corte transversal de una fibra de madera mostrando la lámina media y la pared celular primaria y secundaria. **b** sección transversal de una porción de la pared secundaria con microfibrillas. **c** Un manojito de microfibrillas. **d** Filamentos micelares. **e** Corte transversal de una micela, mostrando la composición ultraestructural: la lignina, hemicelulosa y celulosa. El espacio entre las fibras vegetales (lámina media), macrofibrillas y los filamentos micelares está ocupado por lignina (Dávila y Vázquez Duhalt, 2006)

La digestibilidad de los tallos disminuye más rápido que la de las hojas conforme aumenta la edad de la planta, efecto que se asocia a la concentración de la lignina, la cual se combina con los carbohidratos de la misma reduciendo la digestibilidad (Hacker y Minson, 1981). Para aumentar el valor nutritivo del rastrojo de maíz, generalmente se requiere de algún proceso físico-mecánico, químico, microbiológico o combinaciones de éstos que mejore la digestibilidad de los nutrimentos conduciendo a un aumento en el consumo diario (Nicholson, 1981).

2.3 Tratamientos químicos

Tratar los residuos con álcali ($\text{Ca}(\text{OH})_2$, NH_3 , KOH , NaOH ó urea) tiene como objetivo el romper los enlaces álcali lábiles de la pared celular (Elizondo, 1998). De entre los tratamientos químicos alcalinos más utilizados a partir de los 70's, y que se considera como hidrolítico, se encuentra el NaOH , el cual está asociado con la solubilización de la hemicelulosa y la lignina (Klopfestein *et al.*, 1972; Rexen y Thomsen, 1976; Jackson, 1977; Chesson *et al.*, 1983). Cuando se considera un ingrediente fibroso como candidato a un tratamiento químico se debe tener en cuenta el estado de madurez y la familia de la planta, ya que el tratamiento químico es más efectivo en vegetales maduros lignificados (Elizondo, 1998).

2.4 Fermentación en Estado Sólido (FES)

La fermentación en estado sólido (FES) ha sido implementada desde la antigüedad y usada ampliamente en la producción de alimentos Orientales tradicionales y de bebidas alcohólicas, por ejemplo: la salsa de soya y el sake de Japón, el tempeh en Indonesia y el licor de kaoliang (sorgo) (Sato y Sudo, 1999).

La FES se define como un proceso en el cual los microorganismos crecen en material sólido sin la presencia de agua libre. La humedad necesaria para el crecimiento microbiano existe en forma absorbida o retenida dentro de la matriz sólida (Krishna, 2005). Aunque la mayoría de los trabajos consideran que la FES y la fermentación en sustrato sólido (FSS) es esencialmente lo mismo, Pandey *et al.* (2001), lo ha diferenciado como procesos separados. Ellos

mencionan que la FSS es aquella que involucra procesos en los cuales el sustrato por si mismo actúa como fuente de carbono, y ocurre en ausencia o casi ausencia de agua libre, mientras que la FES se define como cualquier proceso de fermentación que involucra la ausencia o la mínima presencia de agua libre, empleando un sustrato natural o inerte como soporte sólido. Dos tipos de sistemas de FES se han distinguido dependiendo de la naturaleza de la fase sólida utilizada, el sistema más usado involucra el cultivo en material natural, y el menos utilizado envuelve un soporte inerte impregnado con un medio líquido (Krishna, 2005).

Los procesos de FES han demostrado ser particularmente convenientes para la producción de enzimas por los hongos filamentosos, debido a que ésta reproduce las condiciones naturales de tales hongos (Rodríguez y Sanromán, 2005), y además ofrece la oportunidad de procesar residuos agro-industriales (Pandey, 2003). Esta técnica de cultivo ha sido usada a escala comercial desde hace varias décadas (Mitchell *et al.*, 1999).

2.5 Fases de la FES

De acuerdo con Auria *et al.*, 1993, el proceso de FES se puede definir como un sistema de cuatro fases. La fase continua es aire u otra mezcla de gases que generalmente fluye a través del soporte sólido, el cual está compuesto por un soporte insoluble en agua que contiene una solución acuosa de nutrientes. La solución está fuertemente absorbida dentro de la matriz del soporte insoluble, y la cuarta fase son los microorganismos que crecen dentro del soporte, en su superficie, y/o en el espacio libre entre las partículas. El nivel más bajo de humedad es aproximadamente del 12%, debido a que debajo de este nivel toda actividad biológica cesa. El límite superior está en función de la absorción de agua y por lo tanto, del contenido de humedad, que varía dependiendo de la naturaleza del sustrato.

2.6 Factores que influyen en la FES

Es evidente que el crecimiento del hongo y su morfología, así como la producción de enzimas, varía de acuerdo a las condiciones del cultivo, tales como medio de fermentación,

actividad de agua (A_w), temperatura, pH, oxígeno, tamaño y porosidad de la partícula y sustrato, entre otras.

2.6.1 Humedad y Actividad de Agua (A_w)

El agua es esencial para el metabolismo fúngico debido a que cuando empieza a ser insuficiente y no permite una buena difusión del soluto y el gas, en el metabolismo celular la difusión es lenta. Además, la cantidad de agua intracelular y extracelular en condiciones limitantes no permite que se mantenga la funcionalidad de algunas enzimas. Por otro lado, al estar presente en cantidades limitantes, la transferencia de agua puede influir en una desnaturalización de la estructura mecánica de la membrana plasmática, y por tanto todas las propiedades de permeabilidad y transporte a través de la membrana y la célula se ven afectadas (Gervais y Molin, 2003).

El control de la actividad acuosa (A_w) en procesos de FES para un máximo crecimiento y la formación de producto ha sido difícil. Las condiciones que permiten la acumulación de humedad durante la FES pueden conducir a una contaminación en el proceso por bacterias. Algunos autores sugieren la adición de NaCl al sustrato, de manera que disminuya el crecimiento de contaminantes microbianos (Mitchell *et al.*, 1988).

En el proceso de la FES, el agua se encuentra absorbida en el sustrato, la cual puede incrementarse o disminuirse dependiendo de las condiciones bajo las cuales la FES es conducida, siendo el bajo contenido de humedad la característica más importante. La evolución del calor metabólico puede indicar un decremento en el contenido de humedad debido a la evaporación. Este puede representar un problema particularmente en el caso de las levaduras, ya que éstas no pueden crecer generalmente a bajos valores de A_w (Sato *et al.*, 1983). Sin embargo, esto es apropiado para organismos considerados como halo-tolerantes. Existen ejemplos donde el cultivo fue aireado usando aire saturado con vapor de agua, observándose un incremento en el nivel de humedad (Peña-Lillo *et al.*, 2001). Pueden pasar grandes cambios con el contenido de humedad en el sustrato sólido con respecto a la humedad relativa de la fase de gas en equilibrio con el sólido, dependiendo de las características de sorción-desorción del sustrato (Doelle *et al.*, 1992).

2.6.2 Transferencia de calor y temperatura

La temperatura es una variable importante en el sistema de FES por la dificultad en la remoción del calor metabólico. Usualmente existe un período inicial de crecimiento microbiano en donde la temperatura es óptima, la densidad celular es baja y por lo tanto, el calor metabólico es bajo. Sin embargo, cuando la concentración de biomasa se incrementa, la velocidad de crecimiento se eleva y por lo tanto la producción de calor también se incrementa. Si la velocidad de producción de calor excede la velocidad de remoción de calor en el sistema de FES, la temperatura aumenta. Un enfriamiento pobre en las diversas regiones del sistema también incrementa la temperatura, provocando una disminución en el crecimiento, probablemente debido a los efectos negativos de la alta temperatura (Mitchell *et al.*, 2000).

La falta de agua libre y la baja conductividad térmica de las partículas sólidas, pueden conducir a un incremento en la temperatura durante el proceso de la FES. El mezclado puede mejorar significativamente la remoción de calor, lo cual no es común en los reactores de fermentación sólida, debido a que no todos los hongos y sustratos sólidos pueden tolerar el movimiento y la fricción resultante de las colisiones ocasionadas por la mezcla. En algunos biorreactores, como el de columna empacada, se utiliza aire saturado como aireación, con la finalidad de remover el calor a través de la evaporación (Hamidi-Esfahani *et al.*, 2004). La importancia de la temperatura en los procesos biológicos está en el hecho de que puede tener efectos negativos como desnaturalización de proteínas, inhibición enzimática, aceleración o inhibición de la producción de un metabolito en particular e incluso muerte celular (Pandey *et al.*, 2001).

2.6.3 Tamaño y porosidad de partícula

El tamaño y forma de la partícula son extremadamente importantes, ya que afectan el área de superficie para un volumen determinado de las partículas, esto se debe a que los espacios interparticulares dependen del tamaño y la forma. El tamaño de la partícula afecta la accesibilidad del sustrato, así que, un tamaño de partícula óptimo representa frecuentemente una buena asociación entre la accesibilidad de nutrientes y la disponibilidad de oxígeno. Las partículas pequeñas o las partículas con una superficie plana y larga, tienden a empaquetarse estrechamente, haciendo difícil la aireación del sustrato. La caracterización exacta de una

partícula puede ser difícil, especialmente si la partícula tiene forma irregular. La consistencia y la cohesión o resistencia mecánica de la partícula son también características importantes, ya que la partícula puede deformarse debido a la fuerza de cizalla del agitador o simplemente por las condiciones de presión a la que es sometida (Mitchell *et al.*, 2000).

2.6.4 pH

Cada microorganismo posee un rango de pH para su crecimiento y actividad, con un valor óptimo dentro del rango. Los hongos filamentosos tienen un rango de pH de 3.8 a 6.0 (Krishna, 2005). Controlar el pH utilizando hongos en la FES es prácticamente imposible, debido a la heterogeneidad del sistema y a una falta de equipo adecuado para determinar el pH en materiales sólidos. Para solucionar este problema se puede hacer una formulación del sustrato en la que se considere la capacidad amortiguadora de los diferentes compuestos empleados (Lagunas, 2004).

2.6.5 Aireación y difusión de nutrientes.

En FES, los procesos de transferencia de masa relacionados a los gases y difusión de los nutrientes son influenciados fuertemente por la estructura física de la matriz y por la fase líquida del sistema (Weber *et al.*, 1999). Se describieron dos tipos de fenómenos de transferencia de masa: uno a micro-escala (intracelular) y otros a macro-escalas (extracelular). El primero se relaciona con la transferencia de masa dentro y fuera de las células del microorganismo (p.e. hongos filamentosos). El segundo incluye más factores: el flujo aéreo neto dentro y fuera del bioreactor, convección natural, difusión y conducción a través del sustrato, los materiales de bioreactor, daños superficiales del microorganismo y la integridad de las partículas del sustrato (Lagunas, 2004).

1. Difusión gaseosa. La aireación tiene esencialmente dos funciones: (a) el suministro de oxígeno para el metabolismo aeróbico y (b) remoción de CO₂, calor metabólico, calor metabólico y los componentes volátiles producidos durante el metabolismo (Hardin *et al.*, 2001). El intercambio de O₂ y CO₂ entre la fase gaseosa y sólida tiene nivel intra e inter partícula, dependiendo de dicho cambio el intercambio de factores que aumentan la superficie de contacto entre las fases, espacios vacíos de la matriz, porosidad y diámetro de la partícula, grado de

mezclado y espesor de la matriz, aeración adicional generada por el paso forzado de aire estéril, agitación y nivel de humedad del sustrato. En general, la difusión gaseosa incrementa con el tamaño de poro y disminuye con la reducción del diámetro de partícula, debido al empaque del sustrato en el bioreactor.

2. Difusión de nutrientes. Ocurre a nivel intraparticular e incluye la difusión de nutrientes hacia las células y la hidrólisis del sustrato sólido por las enzimas microbianas. Este último punto es un aspecto importante en FES debido a que la mayor parte del sustrato es insoluble (Oostra *et al.*, 2000).

En sustratos con un diámetro de poro pequeño, la resistencia a la transferencia de masa intra partícula aumenta con el diámetro de partícula y la degradación del sustrato ocurre principalmente en la superficie exterior. Los procesos de difusión de nutrientes son especialmente importantes en bacterias y levaduras empleadas en FES. Estos procesos no son tan críticos para las fermentaciones con hongos filamentosos porque los micelios pueden penetrar en la matriz sólida (Ferret *et al.*, 1999).

2.7 Fermentación en Estado Sólido (FES) vs Fermentación Sumergida (FS)

Los procesos de FES se han utilizado extensivamente en países asiáticos y africanos. En occidente y los países europeos, la FES fue descuidada hasta hace poco tiempo, teniendo un desarrollo mayor en la FS. Una evaluación más cercana de estos dos procesos durante los últimos años, ha revelado las enormes ventajas económicas y prácticas de FES sobre FS, de las cuales se tienen las siguientes: no necesita condiciones asépticas ya que la baja disponibilidad de agua no permite el crecimiento de bacterias ni levaduras; uso de una variedad amplia de matrices; bajo costo de capital, ya que los sustratos utilizados son residuos agroindustriales; poco gasto de energía; menor producción de agua residual (lo cual permite tener un mayor control de una posible contaminación bacteriana); alto potencial de productividad volumétrica; poco espacio de fermentación (la carga volumétrica del sustrato es mucho mayor en la FES que en FS, ya que la humedad de la FES es mucho menor, dando como resultado facilidad en la compactación del fermentador o de la fermentación); y una fermentación generalmente más simple. El sustrato

normalmente provee la mayoría de los nutrientes necesarios para el crecimiento microbiano. Sin embargo, lo anterior no significa que la FES deba ser implementada para sustituir la FS, ya que la FES también tiene algunas desventajas, como por ejemplo la dificultad en la agitación, ya que se puede dañar o en su efecto puede producir la ruptura del micelio; dificultad en el control de la fermentación, principalmente en la acumulación de calor; dificultad en el control de la humedad a nivel sustrato, esto se debe al incremento de temperatura debido a las reacciones metabólicas de los microorganismos; dificultad en la determinación de parámetros fermentativos tales como pH, humedad, crecimiento microbiano, aireación y concentración de biomasa; limitado tipo de microorganismos que pueden crecer en bajos niveles de humedad; y poca disponibilidad de conocimientos técnicos y bioquímicos acerca de los cambios ocurridos durante la FES.

El análisis económico ha indicado que la tecnología de la FES puede reducir considerablemente la inversión de capitales y el costo del producto aumentando los beneficios. A partir de las fermentaciones tradicionales, se han originado nuevas versiones de la FES, las cuales han dado lugar a nuevas aplicaciones en la tecnología para la producción de antibióticos y otros metabolitos secundarios, enzimas industriales, biocombustible, ácidos orgánicos y compuestos aromáticos (Doelle *et al.*, 1992, Hölker *et al.*, 2004).

2.8 Reactores para la FES

La elección para diseñar un bioreactor depende de muchos factores, tales como el proceso que se va a desarrollar, la experiencia disponible, la intención de escala y las consideraciones económicas. Las consideraciones importantes en la elección final del bioreactor incluyen (Doelle *et al.*, 1992):

- El grado de aireación necesario.
- La velocidad a la cual el calor se necesita remover.
- La medición y control de los parámetros del proceso.
- El tipo de sustrato, las propiedades y la utilización de sólidos en la preparación del medio e inoculación.
- Esterilización y prevención de la contaminación.
- El capital y los costos de operación.

Desde el punto de vista de escala, existen dos categorías de biorreactores para el proceso de FES: 1) a escala laboratorio, usando medio sólido desde pocos gramos hasta kilogramos, 2) piloto y a escala industrial, que utilizan muchos kilogramos o toneladas. La primera categoría, comprende muchas aplicaciones más o menos sofisticadas, mientras que la segunda categoría, la cual es usada principalmente a nivel industrial, es menos variada (Durand, 2003). Desde el punto de vista práctico a nivel laboratorio, existen tres grupos de biorreactores para FES y estos pueden ser distinguidos dependiendo del tipo de mezcla y aeración usada.

a) Biorreactores de Bandeja

Los biorreactores de bandeja (Figura 5) se utilizan para los procesos en los que el sustrato permanece estático con aireación no forzada ni mezcla del sustrato sólido. Estos reactores restringen la cantidad de sustrato que puede ser fermentado, usando una capa delgada para evitar el sobrecalentamiento y mantener las condiciones aerobias. La parte baja de la bandeja es perforada para permitir la aireación del sustrato sólido (Durand, 2003; Robinson y Nigam, 2003).

b) Biorreactores de tambor rotatorio.

El bioreactor de tambor rotatorio (Figura 6), contiene un tambor perforado y un mezclador de paletas horizontal. Deben estar en continuo movimiento para permitir una adecuada aireación. El daño que se produce al inóculo o al producto lo hace limitado en su uso. El control de temperatura en los biorreactores de tambor es difícil aún con mezclado, ya que el crecimiento de los microorganismos produce altas temperaturas (Durand, 2003; Robinson y Nigam., 2003).

c) Columnas Empacadas

Son hechas de vidrio o plástico con una perforación en la base por la cual se aplica aireación forzada (Figura 7). Estas han sido usadas en los últimos 20 años como una alternativa potencial para llevar a cabo una fermentación, con el propósito de producir enzimas, ácidos orgánicos y metabolitos secundarios.

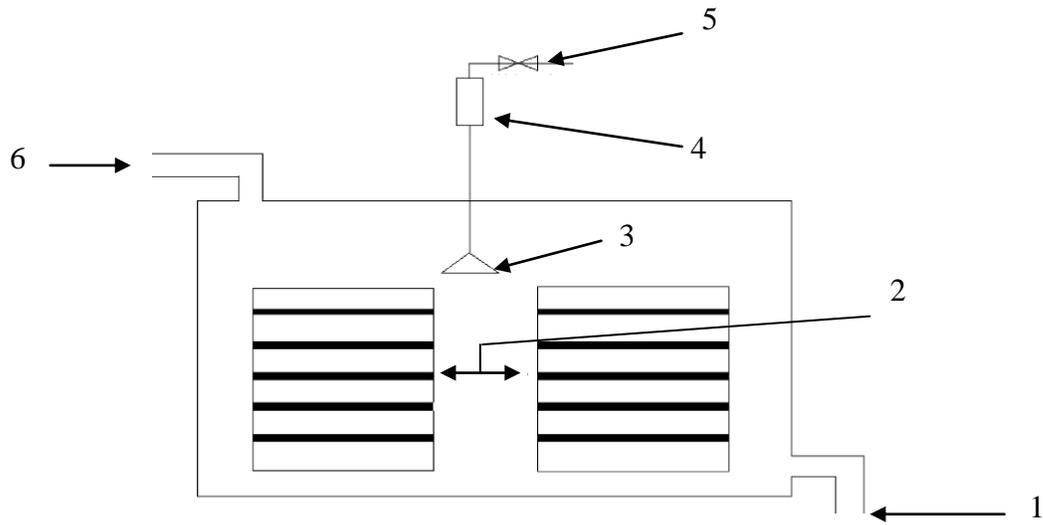


Figura 5. Biorreactor de bandeja. 1) Entrada de aire. 2) Bandejas. 3) Humectador. 4) Lámpara UV. 5) Válvula de agua. 6) Salida de aire (Robinson y Nigam, 2003).

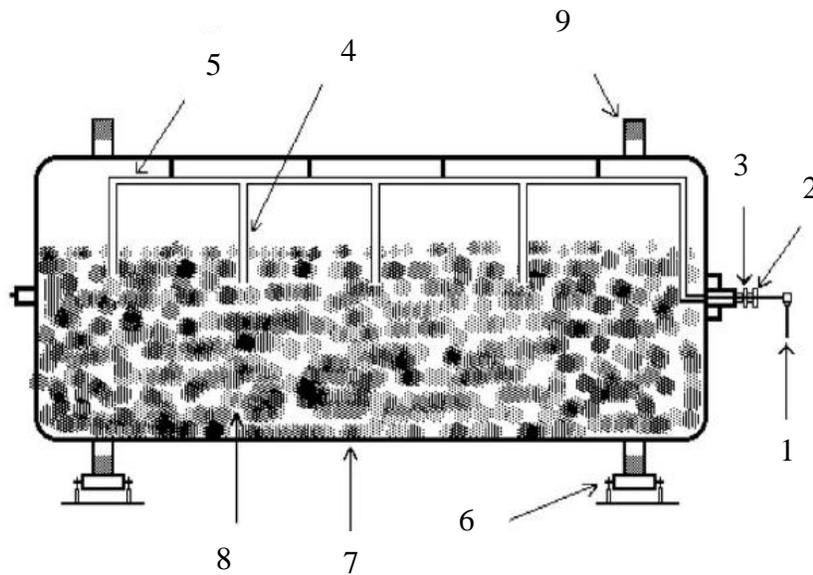


Figura 6. Biorreactor de tambor rotatorio. 1) Entrada de aire. 2) Rotor. 3) Ajuste de rotor. 4) Inyectores de aire. 5) Línea de aire. 6) Rodillos. 7) Tambor rotatorio. 8) Medio sólido. 9) Borde (Durand, 2003).

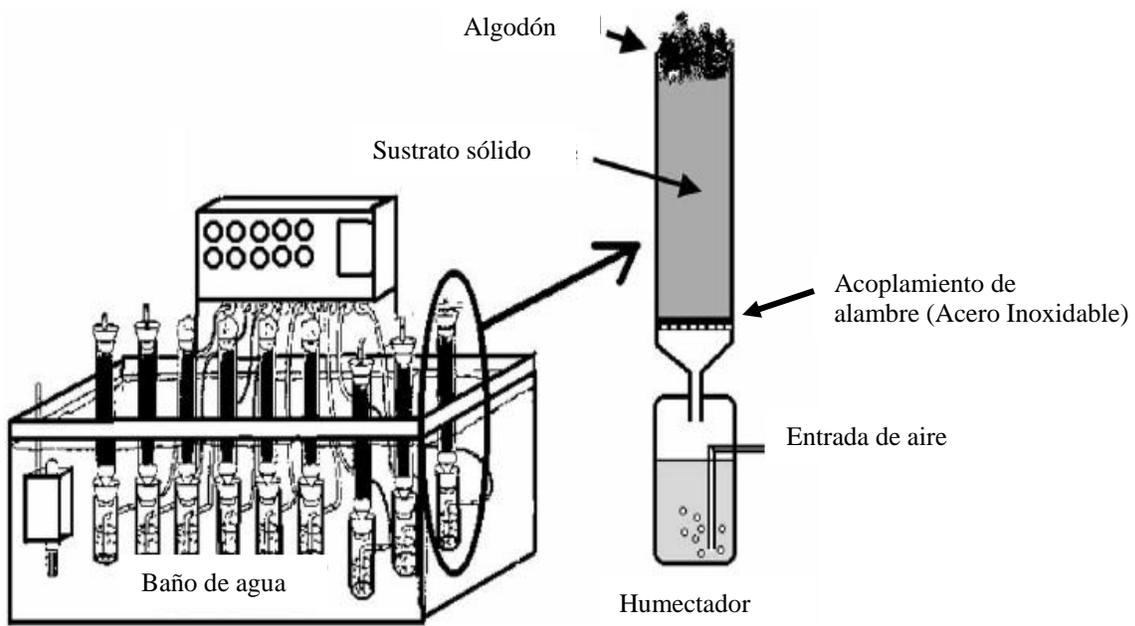


Fig. 7. Reactor de columna empacada (Durand, 2003)

El aire forzado es generalmente aplicado con humedad alta para evitar desecación del sustrato. Las columnas a escala laboratorio son generalmente de 30 cm de altura, las cuales se colocan en baños de agua para mantener una temperatura constante en la fermentación (30° C), mientras que la temperatura en las columnas a gran escala puede ser controlada por el uso de chaqueta (sobrecubierta) de agua. Existen reportes de que el uso de columnas delgadas facilita la transferencia de calor en el sólido, esto se debe a la disminución de temperatura en el área de sección transversal y por lo tanto disminuye la necesidad de enfriamiento (Robinson y Nigam, 2003).

2.9 Sustratos usados en la FES

Todos los sustratos sólidos tienen una característica en común: su estructura es básicamente macromolecular, confiriendo la propiedad de un sólido que puede ser utilizado como sustrato (Raimbault, 1998). Los residuos agroindustriales son considerados como los mejores sustratos para los procesos de fermentación sólida y de producción de enzimas, debido a que provee los nutrientes necesarios para el crecimiento de los organismos (Krishna *et al.*, 1995).

La preparación y el pretratamiento representan un paso necesario para convertir el sustrato a una forma apropiada para su uso. Según Doelle *et al.*, (1992), la preparación del sustrato y el pretratamiento podrían involucrar reducción de tamaño por molienda, suplemento con nutrientes, o bien, tratamiento con vapor.

2.10 Microorganismos empleados en la FES

Existe un gran número de microorganismos que tienen la capacidad de crecer en sustratos sólidos, esto se debe a su capacidad de adhesión, así como su habilidad para crecer en rangos relativamente amplios de A_w y penetración del sustrato, encontrando aplicación en la FES. Las bacterias son principalmente involucradas en composteo, ensilado y algunos procesos de alimentos (Doelle *et al.*, 1992); las levaduras pueden ser usadas para la producción de etanol, alimentos y productos alimenticios; pero los hongos filamentosos son el grupo más importante de microorganismos usados en procesos de la FES debido a su tolerancia relativamente alta a las A_w bajas, su alto potencial de excretar enzimas hidrolíticas y su morfología (Raimbault, 1998).

El modo básico de crecimiento en los hongos filamentosos es una combinación de una extensión apical de hifa punteada, más la generación de nuevas hifas punteadas a través del micelio (Lagunas, 2004). El hongo filamentoso puede también, así colonizar la superficie del sólido rápidamente para la utilización eficiente del sustrato, ya que tiene la capacidad de degradar macromoléculas de sustrato, especialmente carbohidratos.

2.10.1 *Aspergillus*

Una gran variedad de hongos del género de *Aspergillus* esta distribuido en el mundo; son comúnmente saprófitos, crecen en alimentos almacenados, o sobre vegetación en vías de putrefacción, por tanto, son capaces de utilizar una enorme variedad de sustratos orgánicos, debido a que producen una gran variedad de enzimas (Lagunas, 2000).

El género *Aspergillus* se encuentra dentro del grupo de los hongos filamentosos de interés industrial, ya que muestra algunas ventajas para la producción de enzimas; se caracteriza por tener un alto nivel de producción a gran escala y presenta buenas propiedades para su cultivo, lo que posibilita la producción a gran escala. Sus productos son generalmente considerados como seguros (GRAS, por siglas en inglés), lo que permite su aplicación en la industria de alimentos, tanto para consumo humano como animal. Como todo hongo filamentoso, está adaptado para el crecimiento sobre superficies requiriendo un contacto cercano con el sustrato debido a su nutrición heterótrofa, absorción de nutrientes a través de la pared celular y el crecimiento apical de sus hifas (Villena y Gutiérrez, 2003).

El *Aspergillus* contiene micelios, los cuales están formados por hifas ramificadas; la célula basal es una célula especial alargada, de la cual sale una hifa fértil, el talo o conidióforo. Las fiálides producen conidias por un alargamiento y división del fiálide, repitiéndose hasta formar racimos grandes y largos de conidias con diferente maduración, pigmentación y ornamentación según la especie (Samson y Pitt, 1990) (Figura 8). Este hongo filamentoso es considerado el más eficiente productor de hemicelulasas, teniendo una larga historia en la producción de enzimas fibrolíticas (Cuadro 3) (Tian-Hong *et al.*, 2004).

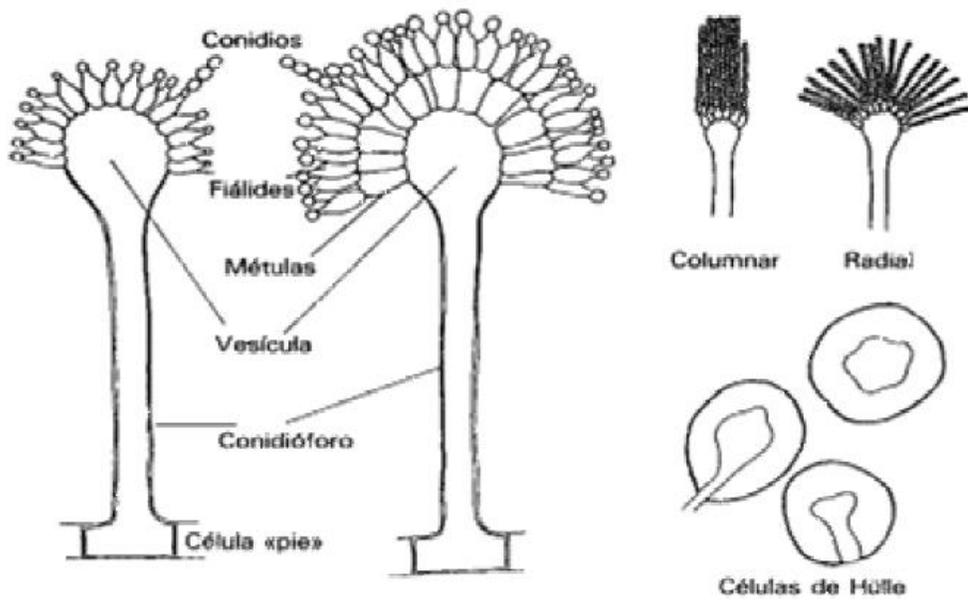


Figura 8. Esquema representativo de la morfología de *A. niger* (Samson y Pit, 1990)

Cuadro 3. Principales enzimas producidas por *A. niger* para uso industrial

Sustrato	Enzimas
Arabinanos	α -L-arabinofuranosidasas
Celulosas	Celulasas tipos C ₁ -C _x -
Dextranos	Dextranasas
B-Glucanos	β -glucanasas
Hemicelulosas	Hemicelulasas
Inulina	Inulinasas
Mananos	β -mananasas
Sustancias pecticas	Pectin metilesterasas, pectato liasas, poligalacturonasas
Proteínas	Proteasas
Almidón	α -amilasas, glucoamilasas

(Whitaker, 1994)

2.11 Biomasa

La biomasa es un parámetro fundamental en la caracterización del crecimiento microbiano y la medición de la biomasa es esencial para dar un seguimiento a los estudios cinéticos de crecimiento en la FES. La estimación directa de la biomasa es un proceso complicado debido a los problemas al separar la biomasa microbiana del sustrato, ya que se encuentra fuertemente unida a la matriz sólida, y por lo tanto, ha tenido que ser indirectamente a partir de mediciones físicas como composición de efluente gaseoso (Auria *et al.*, 1993).

Otros métodos indirectos incluye la determinación de actividades biológicas (ATP), actividades enzimáticas, ensayos de DNA, tasa de respiración (consumo de oxígeno y liberación de dióxido de carbono), también por actividad inmunológica, consumo de nutrientes y consumo de constituyentes de la célula: quitina, glucosamina, ácidos nucleicos, ergosterol y proteína (Scotti *et al.*, 2001).

2.12 Obtención de metabolitos mediante la FES

A fines del siglo XX, creció el interés en la FES para el desarrollo de diversos bioprocesos, en la obtención de metabolitos secundarios biológicamente activos, los productos obtenidos por este desarrollo fermentativo industrial son (Lagunas, 2004):

- a) Antibióticos (penicilina, cefalosporina, tetraciclina, etc.
- b) Bioinsecticidas (endotoxinas bacterianas)
- c) Micotoxinas para investigación (aflotoxinas, ocratoxinas)
- d) Productos bioactivos (alcaloides, giberelinas, fungistatos, etc.)
- e) Ácidos orgánicos (cítrico, málico, láctico)
- f) Enzimas (lipasas, proteasas, oxidasas)
- g) Gomas, pigmentos, etanol, vitaminas, etc.

2.13 Enzimas

El sistema de FES es usado comúnmente para la producción de enzimas, ya que se ha

vuelto muy importante en la actividad industrial (Suryanarayan, 2003). Las enzimas, vuelven los procesos eficientes y menos costosos, ya que tienen un alto grado de especificidad y adaptabilidad, aunado a las suaves condiciones de trabajo. Además, puede lograrse más material procesado con el mismo equipo y menos consumo de energía. Las ventajas de utilizar enzimas en la industria nos ofrece la posibilidad de (Lagunas, 2000): Sustitución de ingredientes y coadyuvantes en procesos; ahorro con procesos más eficientes obteniendo menos subproductos indeseables y mayor capacidad de planta con un incremento de rendimiento de producto; mejora en las propiedades deseables obteniendo un producto único.

La producción de enzimas tiene un rápido crecimiento de producción en la biotecnología. Las enzimas industriales pueden dividirse en 3 aplicaciones: Enzimas de aplicación tecnológica, enzimas en alimentos y enzimas para alimentación animal. Algunas enzimas obtenidas por FES son: amilasas (utilizada en fábrica con cerveza), celulasas (suplementos alimenticios), xilanasas (biopulpeo de pasta para papel y alimento animal), proteasas (industria alimentaria y farmacéutica principalmente), lipasas (productos de limpieza), galactosidasas y pectinasas (principalmente en industria farmacéutica), ligninasas (biocombustibles a partir de forrajes) y mananasas (aditivo en la alimentación animal, entre otras) (Doelle *et al.*, 1992).

2.13.1 Mananasas

La β -mananasa (β -1,-D-manan endo-1,4- β -mananohidrolasas; EC 3.2.1.78), es una glicoproteína que cataliza la hidrólisis alrededor de los enlaces β -D-1,4-manopiranosil en β -mananos produciendo oligosacáridos (McClery *et al.*, 1976). Estas enzimas aparentemente tienen diferentes modos de acción hidrolítica sobre los hetero- β -mananos; los productos más comunes de hidrólisis son manotriosas y manobiosas (Ooi y Kikuchi, 1995). Estos oligosacáridos subsecuentemente pueden ser hidrolizados por β -manosidasas (EC 3.2.1.25) para producir manosa. Algunas β -mananasas presentan actividades de transglucosilación sobre algunos manooligosacáridos (Harjunpää *et al.*, 1995).

Las β -mananasas se aplican a nivel industrial en el bioblanqueo de pulpas crudas de maderas suaves para la fabricación de papel, en combinación con xilanasas, como una alternativa

en la sustitución de agentes químicos clorinados (Gübitz *et al.*, 1997). En la industria de los alimentos favorecen la extracción de aceites vegetales derivados de semillas de leguminosas y en la reducción de la viscosidad de extractos de café durante la manufactura de café soluble (Amorim, 1979; Brand *et al.*, 2001); ayudan en la clarificación de jugos de frutas y vinos (Kamra *et al.*, 2004). Se usó también para la reducción de fibra cruda (altos contenidos de mananos, galactomananos y glucomananos) en harinas con alto valor proteico como soya y copra, empleados en alimentos balanceados para animales y favorecer su digestibilidad (McNaughton *et al.*, 1998). En la industria farmacéutica se utilizan para obtener oligosacáridos de interés a partir de gomas tales como guar, algarrobo y konjac (Gübitz *et al.*, 1996; Stalbrand, 2003).

2.13.2 Xilanasas

Como anteriormente se explicó, la mayoría de los residuos agrícolas contienen tres componentes mayores: celulosa, hemicelulosa y lignina. El xilano es el componente principal de la hemicelulosa; debido a la heterogeneidad del xilano, su hidrólisis requiere de la acción de un complejo sistema enzimático. Este complejo está usualmente compuesto por β -1,4 endoxilanasas, β -xilosidasas, α -arabinofuronosidasas, α -glucuronidasas, acetilxilán esterasa ácido fenol esterasa (Sunna *et al.*, 1996; Breccia *et al.*, 1998). Todas estas enzimas actúan cooperativamente para convertir el xilano en azúcares constituyentes. Los sistemas enzimáticos xilanolíticos están ampliamente distribuidos en bacterias y hongos (Wong *et al.*, 1988; Lagunas, 2004). Actualmente se ha reportado un gran interés por la obtención comercial de las enzimas, debido a que se puede emplear como aditivo en la industria alimentaria (p.e. panificación), pretratamiento de pulpa de papel, reducción de fibra no amilácea presente en alimento animal (Lagunas, 2004), y para degradar el xilano a xilosa y xilo-oligosacáridos en la producción de xilitol, este último tiene aplicaciones en la industria alimentaria y farmacéutica (Biely, 2003).

2.13.2 Celulasas

Las celulasas son glicosil hidrolasas o glucohidrolasas, las cuales hidrolizan oligosacáridos y polisacáridos de glucosa unidos por enlaces β -1,4. En general, tres tipos de enzimas forman los sistemas celulolíticos: (1) endocelulasas (endoglucanasas o 1,4- β -D-glucan 4-glucanohidrolasas; E.C. 3.2.1.4), (2) exocelulasas (celulosa 1,4- β -D-celobiosidasas o 1,4- β -D-

glucan celobiohidrolasas; E.C. 3.2.1.91) y (3) β -D-glucosidasas (β -D-glucosido glucohidrolasas; E.C. 3.2.1.21) (Hernández-Santoyo *et al.*, 1999).

2.14 Aplicación de enzimas fibrolíticas para mejorar la digestibilidad de subproductos agrícolas

Desde el punto de vista de la anatomofisiología de los rumiantes, es conocido que estas especies presentan un ecosistema microbiano muy diverso adaptado para la digestión de alimentos fibrosos. Se considera que la pared celular de las plantas presenta estructuras complejas no entendidas completamente, y que las propiedades de algunos compuestos de la pared vegetal y la matriz tridimensional entrelazada de los polisacáridos, la lignina y los compuestos fenólicos, limitan la digestión de la pared celular por parte de los microorganismos ruminales (González, 2004).

Las enzimas fibrolíticas exógenas han sido ampliamente usadas para mejorar el valor nutritivo de alimento para rumiantes y complementar la actividad de las enzimas endógenas en los animales (González, 2004). Hace más de 40 años se hicieron los primeros intentos sobre el estudio de su efectividad en la suplementación (Burroughs *et al.*, 1960; Rovics y Elly, 1962; Rust *et al.*, 1965), pero no es hasta la última década (Beauchemin *et al.*, 1995, 1999, 2000; Yang *et al.*, 2000) que se comienza a investigar con más intensidad en estas tecnologías, fundamentalmente en investigaciones desarrolladas con ganado vacuno de leche y de carne.

En los últimos años, se han alcanzado mejoras significativas en la digestibilidad de la pared celular de los forrajes destinados para la alimentación de rumiantes. El uso de enzimas fibrolíticas exógenas promete un incremento en la utilización de los forrajes y mejoras en la eficacia productiva de los rumiantes (Beauchemin *et al.*, 2003). De acuerdo a los resultados de digestibilidad obtenidos por Yescas-Yescas *et al.* (2004), la celulosa del rastrojo de maíz se digiere en mayor grado que otras fuentes de hemicelulosa, sugiriendo éstos autores estudiar con mayor detalle el tipo de enlazamiento entre la celulosa y la lignina.

3. JUSTIFICACIÓN

Con el incremento en la demanda directa de granos para consumo humano, así como para su uso en los llamados bio-combustibles, se tendrá una mayor producción de éstos, incrementando el volumen de material vegetativo residual en los campos de cultivo resultantes de la actividad agrícola. Algunos de estos residuos de la actividad agroindustrial pueden ser utilizados para la alimentación animal, como en el caso del rastrojo de maíz.

La producción en México de este subproducto es cercana a las 9 millones de toneladas por año, de los cuales solo una parte son destinados al sector ganadero. Los rumiantes tienen la capacidad de utilizar material vegetativo con el fin de aprovechar la fibra, ya que contienen bacterias y protozoarios que se encargan de actuar sobre la pared celular del forraje para su digestibilidad. Aunque este proceso es eficiente, se ha visto que no digieren una gran parte de dicho material. Con el fin de mejorar la digestibilidad del rastrojo de maíz puede emplearse una mezcla de enzimas fibrolíticas exógenas que complementen la actividad digestiva de la flora anteriormente señalada. Dicha mezcla enzimática puede ser más efectiva que un solo tipo de enzima y puede adicionarse directamente al forraje antes de su consumo, o bien incorporarse al alimento balanceado.

La utilización de enzimas fibrolíticas exógenas provenientes de hongos filamentosos representa una alternativa importante para mejorar la digestibilidad del rastrojo de maíz. Un proceso mediante el cual se obtienen dichas enzimas es la FES, que tiene como ventaja una alta productividad y una mejora en la recuperación del producto, ya que los hongos filamentosos usados en la FES producen las enzimas extracelularmente, reduciendo las necesidades de energía para producir éstos metabolitos microbianos que representan un alto valor agregado.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Producir enzimas fibrolíticas por fermentación en estado sólido mediante *Aspergillus niger* GS1 usando como sustrato y soporte rastrojo de maíz, así como evaluar el efecto de dichas enzimas sobre la digestibilidad *in vitro* del rastrojo de maíz, como modelo de un subproducto agroindustrial.

4.2 Objetivos específicos

4.2.1 Evaluar la importancia del pretratamiento alcalino.

4.2.2 Determinar el tamaño de partícula del rastrojo de maíz, que sea el más apropiado para la producción de enzimas fibrolíticas en la FES.

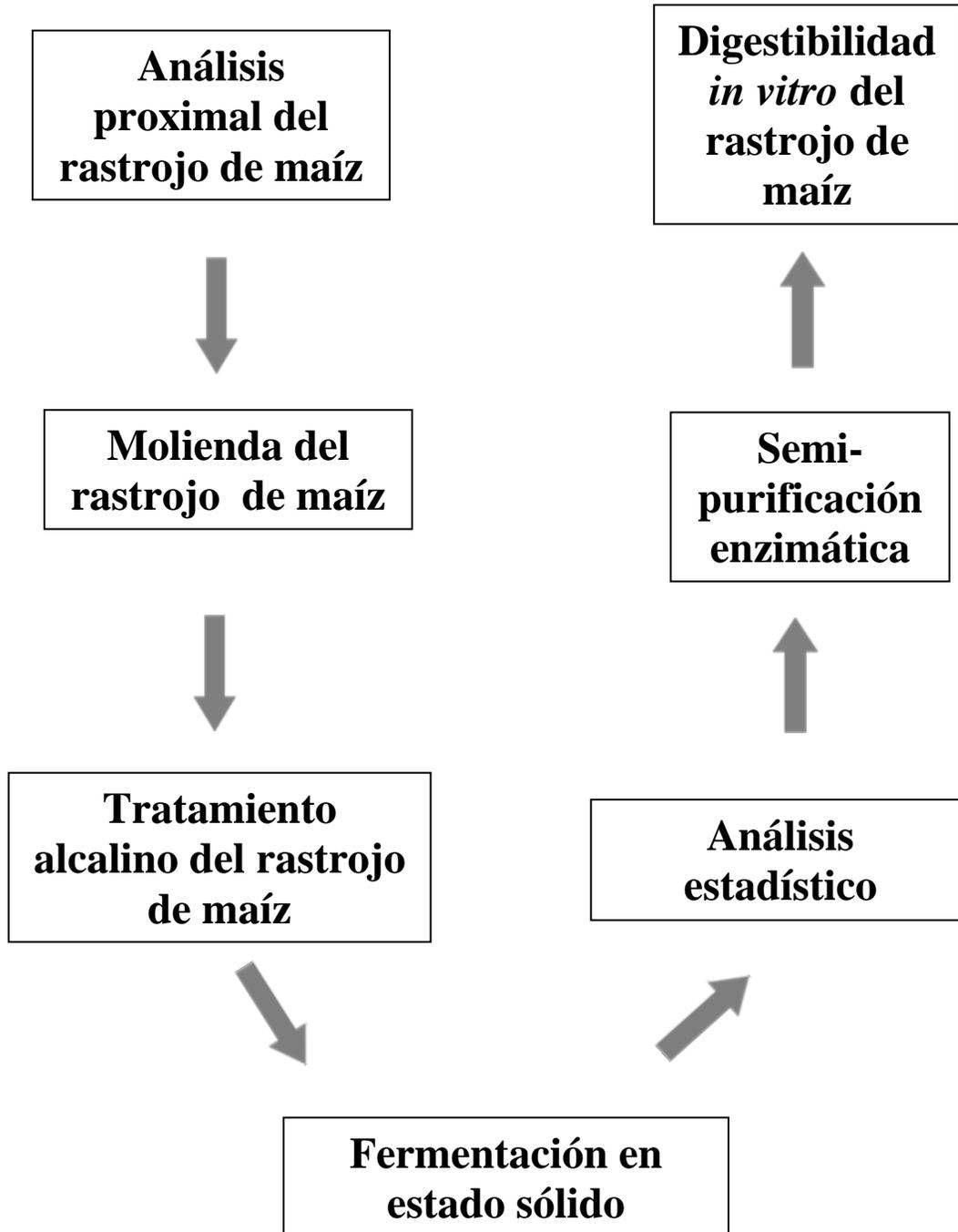
4.2.3 Evaluar el efecto de la suplementación de minerales y nitrógeno que sustenten el crecimiento de *A. niger* GS1 usando rastrojo de maíz como fuente de carbono y soporte.

4.2.4 Evaluar las condiciones para optimizar la producción de enzimas fibrolíticas mediante un diseño experimental estadístico.

4.2.5 Purificar parcialmente la mezcla enzimática obtenida de la FES.

4.2.6 Evaluar la digestibilidad *in vitro* de las hemicelulasas obtenidas, usando rastrojo de maíz como un subproducto agroindustrial.

5. ESTRATEGIA GENERAL



6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Sustrato

Se empleó rastrojo de maíz de la cosecha de Marzo del 2007 obtenido de la compañía Nu-3, situada en el Municipio de Corregidora, Querétaro.

6.2 Disminución de tamaño de partícula

Tiene la finalidad de separar los diferentes tamaños de partícula. Se emplearon charolas con mallas de número 10, 20, 30, 40, 60, 80 y 100 (tamaño de apertura de 0.2 mm, 0.085 mm, 0.059 mm, 0.042 mm, 0.025 mm, 0.0177 mm y 0.0149 mm, respectivamente). Posteriormente, se apilaron las mallas y se colocaron en un equipo Rotap, RX29.

6.3 Análisis proximal del rastrojo de maíz

Determinación de Humedad

Se tomaron 4 g de muestra y se depositaron en una cápsula de porcelana puesta previamente a peso constante. Se colocó en una estufa a 80° C por 12 h y posteriormente se enfrió en un desecador y se pesó. El porcentaje de humedad se obtuvo de la diferencia en peso de la cápsula al final y al inicio del proceso, dividida entre el peso de la muestra, multiplicado por 100 (AOAC, 1990).

Determinación de cenizas

Se pesó 1 g de muestra y se colocó en una capsula de porcelana puesta a peso constante. Posteriormente la muestra se carbonizó en una estufa a mecha directa. Una vez carbonizada la muestra se pasó a una mufla a 550° C por 5 h. La cápsula de porcelana se pasó a una estufa a 110° C para su enfriamiento, y luego se colocó en un desecador hasta enfriarse a temperatura ambiente. Finalmente, se pesó y se obtuvo el porcentaje de cenizas dividiendo el peso de éstas entre el peso de la muestra inicial, multiplicado por 100 (AOAC, 1990).

Determinación del extracto etéreo por el método de Soxhlet

Se pesaron 2 g de muestra deshidratada en tubos de celulosa, los cuales se depositaron en el equipo de extracción. Se utilizó éter de petróleo (Aldrich), 50 ml de éter para 2 g de muestra, para la extracción de lípidos por reflujo durante 5 h, los matraces se llevaron a peso constante en una estufa a 40° C durante 12 h. El porcentaje de grasa se obtuvo por la diferencia en peso del matraz antes y después de la extracción dividido entre la cantidad de muestra por 100 (AOAC, 1990).

Determinación de Nitrógeno total por el método de Kjeldahl

Se pesaron 0.5 g de muestra y se colocaron en tubos de digestión, posteriormente se agregaron 4 mL de ácido sulfúrico concentrado (SIGMA) y 1.1 g de mezcla catalizadora (sulfato de potasio y sulfato de cobre 10:1). Enseguida se colocaron en la placa de digestión marca Tecator modelo System 6 1007 a una temperatura aproximada de 300° C, por espacio de 6 a 8 h, hasta que la muestra tomara un color verde claro.

El tubo con la muestra digerida se colocó en la unidad de destilación marca Tecator Kjeltex system 1026, enseguida se agregó agua destilada y NaOH (J.T. Baker) al 10, se activó el flujo de vapor y se inició la destilación. Por el tubo de salida del aparato de digestión se colocó un matraz Erlenmeyer de 125 mL con 20 mL de ácido bórico al 3% (p/v). Se destilaron aproximadamente 150 mL, se agregó a la muestra 5 gotas de solución indicadora (rojo de metilo al 1% en etanol) y se tituló con HCl (SIGMA) 0.1 N (6.6077 g L^{-1}) hasta que la solución tome un color amarillo (AOAC, 1990). La concentración de Nitrógeno total de la muestra se determinó según la siguiente fórmula (1):

$$\text{Proteína (\%)} = \frac{(V_{\text{muestra}} - V_{\text{blanco}})N_{\text{ácido}} * 14}{\text{Peso muestra (g)}} \quad (1)$$

Donde:

V muestra = volumen de HCl para titular la muestra (mL)

V blanco = volumen de HCl para titular el blanco (mL)

N = Normalidad del HCl o H₂SO₄

14 = peso equivalente del N

g = Peso de la muestra en gramos

Fibra Detergente Neutra (FDN)

La técnica utilizando bolsas filtrantes, es un medio sencillo para obtener un estimado del potencial para la degradabilidad de suplementos y nutrientes para rumiantes. Se pesaron bolsas filtrantes marca ANKOM y se registró el peso tarando la balanza, posteriormente se pesaron 0.5 g de muestra. Se sellaron las bolsas usando un equipo SALCO E150458, y se rotularon las bolsas e inmediatamente después se colocaron en la canastilla del digestor de fibra (ANKOM 200, ANKOM Technology), agregando 2 L de solución FDN (Anexo I) y 4 ml de α -amilasa. Se dejó digerir las muestras por 1 hora, y después se hicieron 3 enjuagues de la muestra por 5 min con agua destilada caliente (cada enjuague con 2 L). Después de escurridas se les agregó aproximadamente 15 mL de acetona y se dejó por un tiempo de 3 min. Por último, se dejaron secar en la campana y se colocaron en la estufa a 105° C durante toda la noche, pesándose al siguiente día (Van Soest *et al.*, 1991). El % de FDN se determinó con la ecuación (2):

$$(\%) FDN = \frac{W_3 - (W_1 * C_1)}{W_2} * 100 \quad (2)$$

Donde:

W_1 = Peso de la bolsa (g)

W_2 = Peso de la muestra (g)

W_3 = Peso de la bolsa + muestra después de los procesos de extracción (g)

C_1 = Corrección de la bolsa blanco (peso después del secado/ peso inicial)

Fibra Detergente Ácida (FDA)

En este proceso se extrae la hemicelulosa, de tal forma que la fibra remanente estará constituida por celulosa y lignina. El procedimiento es el mismo que se indicó en la FDN a excepción de la adición de la α -amilasa, y sustituyéndose la solución FDN por la solución de FDA (Anexo II) (Van Soest *et al.*, 1991).

El % FDA se determina por la ecuación (3):

$$(\%) FDA = \frac{W_3 - (W_1 * C_1)}{W_2} * 100 \quad (3)$$

Donde:

W_1 = Peso de la bolsa

W_2 = Peso de la muestra

W_3 = Peso de la bolsa + muestra después de los procesos de extracción

C_1 = Corrección de la bolsa blanco (peso después del secado/ peso inicial)

Hemicelulosa

El % de Hemicelulosa se determinó mediante la ecuación (4):

$$(\%) Hemicelulosa = (\%) FDN - (\%) FDA \quad (4)$$

Lignina

Después de realizar la determinación de FDA, se colocaron las bolsas secas con la muestras en un vaso de precipitado de 3 L y se agregó la cantidad suficiente de ácido sulfúrico al 72% (p/p), para cubrir las bolsas, colocando un vaso de precipitados de 2 L dentro del vaso de precipitados de 3 L, para mantener las bolsas sumergidas. Se agitaron las bolsas al principio y en intervalos de 30 min empujando y moviendo el vaso de precipitados de 2 L hacia arriba y hacia abajo, aproximadamente 30 veces. Después de 3 h, se retiró el ácido sulfúrico y se enjuagó con agua destilada caliente (90–94° C) para remover todo el ácido. Se repitió el enjuague hasta que el pH fue neutro. Se enjuagó con acetona por 3 min para remover el agua, y se secaron completamente las bolsas en una estufa a 105° C por al menos 4 h. Se sacaron de la estufa las bolsas y fueron colocadas en una bolsa desecante ó en un desecador hasta que se enfriaron y luego fueron pesadas (Van Soest *et al.*, 1991). La lignina se calculó usando la ecuación (5):

$$(\%) \text{ Lignina} = \frac{W_3 - (W_1 - C_1)}{W_2} * 100 \quad (5)$$

Donde:

W_1 = Peso de la bolsa (g)

W_2 = Peso de la muestra (g)

W_3 = Peso después de los procesos de extracción (g)

C_1 = Corrección de la bolsa (g)

Celulosa

La muestra obtenida después de la oxidación con H_2SO_4 , se calentó a $550^\circ C$ en crisoles de porcelana, previamente puestas a peso constante, durante 3 h, se enfriaron y se pesaron (Van Soest *et al.*, 1991); para calcular su contenido se usó la ecuación (6):

$$(\%) \text{ Celulosa} = \frac{(A - B)}{M} * 100 \quad (6)$$

Donde:

A = Peso del crisol + residual con H_2SO_4

B = Peso del crisol + residuo de la oxidación

M = Peso de la muestra sometida a FDA.

6.4 Microorganismo

Se empleó la cepa *Aspergillus niger* GS1 aislado de copra de la colección de cultivos del Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa, el cual fue propagado en matraces de agar papa dextrosa (Bioxon), incubando a $30^\circ C$ por 7 días, y luego mantenida en refrigeración a $4^\circ C$.

6.4.1 Preparación del inóculo

Se efectuó de la siguiente manera:

a) Se propagó el microorganismo en agar papa dextrosa solidificado en tubos inclinados, y se incubó a 30° C durante 4 días.

b) Se agregaron 5 ml de una solución acuosa de Tween 80 (Sigma) al 0.1% v/v para realizar la extracción de esporas.

c) Se realizó un recuento de esporas utilizando una cámara de Neubauer (Bright-Line – Hausser) y un microscopio (Wesco). De los 25 cuadros de la cámara se tomaron al azar 10, contando las esporas presentes en éstos; posteriormente se obtuvo el valor promedio para cada cuadro. El número de esporas por mL se calculó usando la ecuación (7):

$$\frac{No.esporas}{mL} = (promedio)(25)(10^2)(1 * 10^4) \quad (7)$$

6.5 Crecimiento de *A. niger* GS1 sobre rastrojo de maíz

Se tomaron 4 g de rastrojo de maíz de diferentes tamaños de partícula (malla 10, 20 y 30), previamente humedecidos con un suplemento de nutrientes (anexo III), y se colocaron en cajas petri. Posteriormente se tomó una asada de las esporas del microorganismo propagadas en agar papa dextrosa (Bioxon) y se inoculó en el rastrojo de maíz suplementado contenido en la caja petri.

6.6 Pretratamiento del sustrato

Con la finalidad de romper los enlaces éter de la lignina, se añadió NaOH al 4% (p/v) al rastrojo de maíz y se dejó reposar por 12 h a temperatura ambiente. Después de transcurrido este tiempo se lavó con agua destilada caliente para remover el exceso de NaOH y bajar el pH a 7. Una vez lavado se secó en la estufa a 105° C por 12 h.

6.7 Condiciones de fermentación para el rastrojo de maíz

a) Medio nutritivo suplementario al sustrato (4 g rastrojo con 80% de humedad):

Extracto de levadura 10 g L⁻¹, (NH₄)₂SO₄ 1.5 g L⁻¹, glucosa 6 g L⁻¹, Na₂HPO₄ 3.4 g L⁻¹, MgSO₄·0.3 g L⁻¹, FeSO₄·7H₂O 0.1 g L⁻¹, KH₂PO₄ 2.4 g L⁻¹, ZnSO₄·7H₂O 0.1 g L⁻¹, CuSO₄·5H₂O 0.08 g L⁻¹. Este suplemento fue utilizado como una solución para ajustar la humedad del sustrato seco a la requerida en las condiciones experimentales por evaluar.

b) Condiciones ambientales:

Inóculo 1x10⁷ esporas/g sustrato seco, flujo de aire 60 cm³/min, temperatura 30° C, variando el tiempo de fermentación y el porcentaje de humedad del sustrato.

6.8 Determinación del tamaño de partícula para la FES

Se utilizaron 3 tamaños de partícula de rastrojo de maíz de las mallas 10 (0.2mm), 20 (0.85 mm) y 30 (0.59 mm) con y sin pretratamiento alcalino. Se les añadió el medio nutritivo suplementario, con inóculo de *A. niger* GS1 de 1 x 10⁷ esporas/g materia seca (anexo III), y humedad del 80%. Se interrumpió la fermentación a las 48 h, y se determinó la producción de xilanas, mananas y celulasas, utilizando como sustratos xilano de avena (Sigma), harina de algarrobo (Sigma) y carboximetil celulosa (Sigma) al 1% (p/v), respectivamente, y se evaluaron los azúcares reductores liberados por el método reportado por Sinner y Puls (1978).

6.9 Determinación del efecto de la humedad en la FES

Al tamaño de partícula que después de la FES resultó con mejor producción enzimática (mananasa, xilanas y celulasas), se le agregó el medio suplementario con inóculo de *A. niger* GS1 de 1 x 10⁷ esporas/g materia seca (anexo III) variando la humedad a 76 y 80%, ya que en experimentos preliminares se observó una mejor producción de enzimas fibrolíticas usando estos contenidos de humedad. Posteriormente, se llevó a cabo la fermentación en columnas empacadas de vidrio con una altura de 15 cm y 2.5 cm de diámetro, con una densidad de empaque de 60

g/mL a diferentes tiempos (0, 24, 48, 54 y 60 h), y se determinó la producción de mananasas, xilanasas y celulasas, por el método de azúcares reductores reportado por Sinner y Puls (1978).

6.10 Desarrollo de *A. niger* GS1 durante la fermentación

Se realizaron observaciones al microscopio, con la finalidad de evaluar el desarrollo del microorganismo durante la fermentación del rastrojo de maíz. De los fermentadores de columna se tomaron muestras por triplicado a diferentes tiempos de la fermentación (0, 12, 24, 36 y 48 h), las cuales se colocaron sobre un portaobjeto para posteriormente teñirlas con fucsina ácida al 0.1% (Merck). Se observaron en un microscopio Wesco con una magnificación de 40x.

6.11 Diseño experimental para determinar la importancia de nutrientes

Se realizó un diseño experimental fraccionado 2^{9-5} , con 9 factores y 2 niveles para cada factor (anexo IV), efectuando diferentes formulaciones con los diferentes niveles de los ingredientes del medio suplementario. La variable de respuesta fue actividad enzimática (mananasa, xilanasa y celulasa), determinadas por el método de azúcares reductores (Sinner y Puls, 1978). La unidad experimental fue una columna de vidrio de 15 cm de altura y 2.5 cm de diámetro. Se efectuaron un total de 16 tratamientos, con dos réplicas. Los datos se analizaron usando el programa JMP 5.0.1, con la finalidad de obtener las sales que significativamente impactaran en la producción de dichas enzimas.

6.12 Optimización en la producción de enzimas

La optimización para la actividad de enzimas fibrolíticas se realizó por medio de un diseño de composición central pequeño propuesto por Draper y Lin en 1990 (anexo V), utilizando 4 factores: extracto de levadura, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, glucosa y CuSO_4 , que fueron los nutrientes suplementarios significativos en el anterior diseño, con una réplica. Los resultados fueron analizados usando el programa STATGRAPHICS plus versión 4.0.

6.13 Obtención del extracto enzimático crudo

Al material fermentado del rastrojo de maíz se le adicionó una solución amortiguadora de acetatos 50 mM, pH 5.5, en relación 1:1.5 (v/v), se mezcló y se prensó manualmente. El filtrado se centrifugó a 15,000g en una centrífuga Eppendorf, por 10 min a 4° C para separar los sólidos del fermento, el sobrenadante se almacenó en recipientes de plástico a 4° C.

6.14 Determinación de la producción enzimática

6.14.1 Determinación de celulasas y hemicelulasas

Se empleó el método modificado de cuantificación de azúcares reductores de Sinner y Puls (1978), el cual se fundamenta en que a elevados valores de pH y temperatura, los azúcares pueden reducir al Cu^{++} , pasando a Cu^+ y éste reacciona con la 4-4' dicarboxi 2-2'-biquinolina, produciendo una coloración violeta medible a 560 nm, el procedimiento fue el siguiente:

Como control de reacción se prepararon las siguientes soluciones:

- 1.- Blanco de calibración.- 50 μl de agua desionizada.
- 2.- Blanco de sustrato.- 25 μl de solución de sustrato y 25 μl de amortiguador de acetatos 50 mM, pH 5.
- 3.- Blanco de reacción.- 25 μl de amortiguador de acetatos 50 mM, pH 5.0 y 25 μl de extracto enzimático

El tubo de reacción se preparó adicionando 25 μl de solución de sustrato y 25 μl de extracto enzimático. Tanto los tubos control como el de reacción, se incubaron durante 10 min a 50° C, y al finalizar la reacción se detuvo en baño hielo-agua por 10 min; posteriormente se adicionaron a cada tubo de prueba 1 mL de reactivo de Sinner y Puls (Anexo VI). Los tubos se incubaron a 80° C por 10 min, deteniéndose la reacción en baño de hielo-agua por 10 min.

Las muestras se equilibraron a temperatura ambiente y se leyeron a una longitud de onda de 560 nm en un espectrofotómetro (UNICAM, Helios λ). La absorbancia resultante se interpoló usando una curva de calibración, con un monosacárido reductor, como se describe a continuación.

Mananasa. Para medir la actividad de la mananasa, se realizó una curva de calibración con D- manosa (Merck) a concentración de 0.25 a 5 mM. Una unidad de actividad de mananasa se define como la cantidad de enzima que libera un μmol de manosa a partir del sustrato galactomanano (harina de algarrobo) por min a 50 °C. La concentración empleada de sustrato fue de 0.5% (p/v), que se preparó pesando 0.5 g de sustrato y adicionando 100 mL de amortiguador de acetatos 50 mM a pH 5.5.

Xilanasa. Para medir la actividad de xilanasa, se realizó una curva de calibración con D-xilosa (Merck) en un rango de concentraciones de 0.25 a 4.5 mM. Una unidad de actividad de xilanasa se define como la cantidad de enzima que libera un μmol de xilosa a partir del sustrato xilano de avena por min a 50 °C. La concentración empleada de sustrato fue de 0.5% (p/v), que se preparó pesando 0.5 g sustrato y adicionando 100 mL de amortiguador de acetatos 50 mM, a pH 5.5.

Celulasa. Para medir la actividad de celulasa, se realizó una curva de calibración con carboximetilcelulosa (SIGMA) en un rango de concentraciones de 0.25 a 4.5 mM. Una unidad de actividad de celulasa se define como la cantidad de enzima que libera un μmol de glucosa a partir del sustrato carboximetilcelulosa, por min a 50 °C. La concentración empleada de sustrato fue de 0.5% (p/v), que se preparó pesando 0.5 g de sustrato y adicionando 100 mL de amortiguador de acetatos 50 mM, a pH 5.5.

6.15 Determinación de proteína

Disolver 10 μL de albúmina sérica em 9.99 mL de água destilada, esto con la finalidad de disminuir la concentración de la proteína. Preparar una curva de calibración de albúmina sérica en un rango desde 0 hasta 10 $\mu\text{g/mL}$. Colocar 800 μL de la muestra en un tubo Eppendorf limpio y seco, añadir 200 μL del reactivo de Bradford a la muestra. Dejar a temperatura ambiente por 5 min y leer a 595 nm (Bradford, 1976).

6.16 Cinética de crecimiento microbiano

Para observar el desarrollo del *A. niger* GS1 durante la FES se monitoreo la producción de CO₂ a diferentes tiempos (0, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30, 36, 42 y 48 h) como forma indirecta de crecimiento microbiano. Se utilizó un equipo Perkin Elmer Auto System, equipado con una columna capilar Poraplot Q, utilizando helio como gas acarreador, un detector de conductividad térmica (TCD) y un software de análisis de datos Chem Lab. Las condiciones para llevar a cabo la separación de los componentes fueron las siguientes:

Temperatura del inyector 75°C

Temperatura del horno 80°C

Temperatura del detector 180°C

Flujo de helio de 2 mL/min

Una muestra de 10 µL del fermentador fue inyectada en el cromatografo de gases.

6.17 Preparación de extractos enzimáticos para uso en experimento *in vitro*

La extracción se realizó conforme al procedimiento descrito en la sección 6.13. Las hemicelulasas y celulasas se purifican parcialmente mediante precipitación con acetona (relación 1:3, extracto:acetona, v/v) a 4° C por 3 h. Después de transcurrido el tiempo de precipitación, la mezcla se centrifugó a 15,000 g por 15 min a 4° C. El precipitado se resuspendió en una solución amortiguadora de acetatos 20 mM, pH 5.5. Finalmente, el extracto semipurificado se filtró a través de una membrana de celulosa regenerada de 10,000 Da de punto de corte (NMWL; Millipore) y se liofilizó.

6.18 Efecto del extracto enzimático sobre el rastrojo de maíz

Una vez teniendo el extracto enzimático semipurificado con la mayor actividad de hemicelulasas y celulasas, se añadió al rastrojo de maíz antes y después del tratamiento alcalino hasta que este quedara empapado. Posteriormente se hicieron las determinaciones de FDN, FDA, celulosa, hemicelulosa y lignina para observar el efecto del extracto enzimático.

6.19 Digestibilidad *in vitro*

La digestibilidad *in vitro* se hizo según la técnica propuesta por Ankom Technology (1994). Se pesaron 0.25 g de rastrojo de maíz, colocándolos en bolsas filtrantes Ankom previamente enjuagadas con acetona y se introducen en una jarra digestora (Daisy, volumen aproximado de 700 mL). En contenedores separados se prepara una solución amortiguadora de A y B (Anexo VIII) precalentando a 39° C, posteriormente se hace una mezcla de estas soluciones en relación de 1:5 (v/v) añadiendo 266 ml de la solución B y 1330 ml de la solución A.

Separadamente, se recolectaron 2000 mL de contenido ruminal (de vaca), colocándolo en un termo con agua caliente a 39° C. Se vació en una licuadora y se purgó con CO₂, licuando por 30 s. Se filtraron 400 ml del inóculo mediante una malla de cielo y se adicionaron a la jarra digestora con la solución amortiguadora (mezcla de la solución A y B) y las muestras de rastrojo de maíz, dentro de una incubadora (Daysi), purgando con CO₂ (70% O₂/30% CO₂, Infra) durante 30 min, y se incubó por 48 h y 72 h. Después de cada tiempo se enjuagaron las bolsas, se pesaron a peso constante (DRIVMS) y posteriormente se determinó la FDN (DVIVMS), según la ecuación (8) y (9), respectivamente:

$$(\%) DVIVMS = \frac{(W_3 - (W_1 * c_1)) * 100}{W_2} \quad (8)$$

$$(\%) DVIVMS = \frac{(FDN_V - (W_1 * c_1)) * 100}{W_2} \quad (9)$$

Donde:

DVIVMS = Digestibilidad verdadera *in vitro* de la materia seca

W₁ = Peso de la bolsa tarada (g)

W₂ = Peso de la muestra (g)

W_3 = Peso de la bolsa a peso constante + residuo de la digestión con contenido ruminal

FDN_v = Peso final de la bolsa + muestra después de determinación de FDN (g)

W_4 = Peso de materia orgánica (pérdida de peso de la ignición de la bolsa y la muestra) (g)

C_1 = Peso de la bolsa blanco (peso final – seco / peso de la bolsa blanco original) (g)

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Análisis químico proximal del rastrojo de maíz

El análisis químico del rastrojo de maíz antes del tratamiento alcalino se muestra en el Cuadro 4, en el cual se observa que la celulosa (38%) y la hemicelulosa (30.3%) son los constituyentes mayoritarios de este subproducto, estando en menor proporción la proteína (5.5%) y extracto etéreo (1.5%). Estos valores coinciden con los reportados por Fuentes *et al.* (2001) y Yescas-Yescas *et al.* (2004); aunque en ambos trabajos se reportan valores menores de FDN (72.45% y 69.22%, respectivamente).

Las variaciones observadas con otros autores en el análisis proximal de los residuos agrícolas, pueden provenir del grado de madurez, manejo, composición del suelo, época de siembra, ocurrencia de heladas, etc. que influyen en el desarrollo de las plantas. Además, para un mismo esquilmo el valor nutritivo cambia al analizar el rastrojo completo o bien, separadamente hojas y tallos (González, 2008).

7.2 Crecimiento fúngico sobre el rastrojo de maíz

Los resultados obtenidos durante el cultivo de *A. niger* GS1 sobre rastrojo de maíz a diferentes tiempos, indican que éste incluso al ser suplementado con nutrientes (anexo III) no es capaz de sostener su crecimiento, ya que a los 45 días de la inoculación el hongo no presentó un aumento en la expansión radial. Este efecto se puede asociar a la alta concentración de lignina presente en la planta (Elizondo, 1998), ya que dicho compuesto impide el acceso del hongo a los carbohidratos de fácil degradación presentes en el esquilmo (Dávila y Vázquez-Duhalt, 2006).

Elizondo en 1998, afirmó que el tratamiento de los residuos agrícolas con álcali permite al menos parcialmente romper los enlaces de lignina con los carbohidratos (celulosa y hemicelulosa), resultando en una deslignificación parcial de la pared celular beneficiando el crecimiento de microorganismos capaces de fermentar la celulosa y la hemicelulosa (Tanaka *et al.*, 1985).

Cuadro 4. Contenido nutricional del rastrojo de maíz antes y después del tratamiento con NaOH al 4% (p/v)

Composición química del rastrojo de maíz	Sin tratamiento alcalino (%)*	Con tratamiento alcalino (%)*
Sólidos Totales	95.0 ±0.1	95.0 ±0.1
Proteína cruda	5.0 ±0.1	5.4 ±0.1
Extracto etéreo	1.48 ±0.1	1.40 ±0.1
Cenizas	5.5 ±0.1	5.8 ±0.1
FDN	77.0±0.1	70.6 ±0.1
FDA	46.5 ±0.1	45.8 ±0.1
Hemicelulosa	30.4 ±0.1	21.2 ±0.1
Celulosa	38.0±0.1	37.2±0.1
Lignina	7.85±0.03	5.56±0.04

*Los valores representan el promedio de tres determinaciones en base a materia seca ± desviación estándar.

Los resultados están reportados en base a materia seca, excepto los sólidos totales. FDN: Fibra detergente neutra; FDA: Fibra detergente ácido.

7.3 Tratamiento alcalino

Desde la década de los 70's, el NaOH se ha usado en la solubilización parcial de la hemicelulosa y lignina, por lo que el rastrojo de maíz se sometió a tratamiento alcalino, con el objetivo de romper los enlaces lábiles de la pared celular y dar acceso a las enzimas para degradar los carbohidratos (Rexen y Thomsen, 1976; Jackson, 1977; Klopffestein, 1972; Chesson *et al.*, 1983).

Después del tratamiento alcalino se observa una disminución en el contenido de lignina de 7.85 ± 0.03 a $5.56\% \pm 0.04$ y de hemicelulosa, siendo 30.4 ± 0.1 antes y $21.2\% \pm 0.1$ después del tratamiento alcalino (Cuadro 4). Esta hidrólisis parcial de la lignina es similar a la reportada por Sewalt *et al* (1995), quienes demostraron una disminución en el contenido de éstos compuestos fenólicos al tratar el rastrojo de maíz con NH_3 (27.3% para el testigo y 18.1% para el material tratado con NH_3). La FDN determina el total de los componentes de la pared celular (celulosa, hemicelulosa y lignina) del rastrojo de maíz, así que una modificación en el contenido de FDN está directamente relacionada con la variación de la hemicelulosa, celulosa y lignina.

El tratamiento de paja de trigo con NaOH al 4% modificó el contenido de hemicelulosa de 27.9% para la no tratada a 18% para la tratada con NaOH (El-Yassin *et al.*, 1991). Por otro lado, Zaman y Owen (1995), obtuvieron 27.3% de hemicelulosa para paja de cebada sin tratamiento alcalino y 18.7% para la tratada con NaOH al 3% a los 60 días de ensilaje. Los valores reportados para el contenido de hemicelulosa en ambos trabajos, antes y después del tratamiento alcalino, son similares a los obtenidos en este trabajo ($30.4 \pm 0.1\%$ y $21.2 \pm 0.1\%$, antes y después del tratamiento, respectivamente). Resultados similares a los mostrados en el Cuadro 4, en relación a la disminución de FDN de rastrojo de maíz tratado con NaOH al 4% (p/v), fueron reportados por Adebawale y Nakashima (1992), quienes obtuvieron un contenido promedio de FDN de 77.6 % antes y 69.3% después de dicho tratamiento. Haddad *et al.* (1994), reportaron una disminución de FDN en paja de trigo de 76% a 71.7% para la paja tratada con NaOH al 3% (p/v).

7.3.1 Observaciones microscópicas antes y después del tratamiento alcalino

En la Figura 9 se muestra una comparación del rastrojo de maíz antes y después de ser tratado con NaOH al 4% (p/v) por 12 h. Se puede observar que después del tratamiento alcalino el rastrojo de maíz se vuelve más traslúcido (Fig. 9b). Esto se puede deber a que las paredes celulares de este subproducto sufren una semi-digestión a causa del tratamiento alcalino.

7.4 Determinación del tamaño de partícula para la FES

En el Cuadro 5 se muestran los resultados obtenidos para la actividad enzimática a las 48 h de la FES usando el rastrojo de maíz como sustrato y fuente de carbono, por *A. niger* GS1 con diferentes tamaños de partícula.

Se observa que el rastrojo no sometido a tratamiento alcalino previo a la FES, no funcionó como inductor de actividad hemicelulolítica y/o celulolítica. Orduña *et al.* 2002, mencionaron tres mecanismos mediante los cuales la lignificación puede limitar el crecimiento microbiano, impidiendo su acceso hacia los polisacáridos de la pared celular: 1) un efecto tóxico de la lignina sobre los microorganismos del rumen, 2) impedimento estérico causado por los enlaces lignina-polisacáridos que limita el acceso de enzimas a carbohidratos específicos, y 3) un medio ambiente hidrofóbico creado por la lignina que impiden la acción de la enzimas, las cuales requieren un medio acuoso.

Jung y Deetz (1993), efectuaron una revisión de los mecanismos que limitan el crecimiento microbiano cuando usan como sustrato material lignocelulósico, y concluyen que la hidrofobicidad y la toxicidad de la lignina son factores con poca probabilidad de afectar cuantitativamente la degradación de la pared celular en el rumen en un grado significativo, y que el impedimento estérico parece ser el mecanismo principal que limita la degradación de la pared celular.

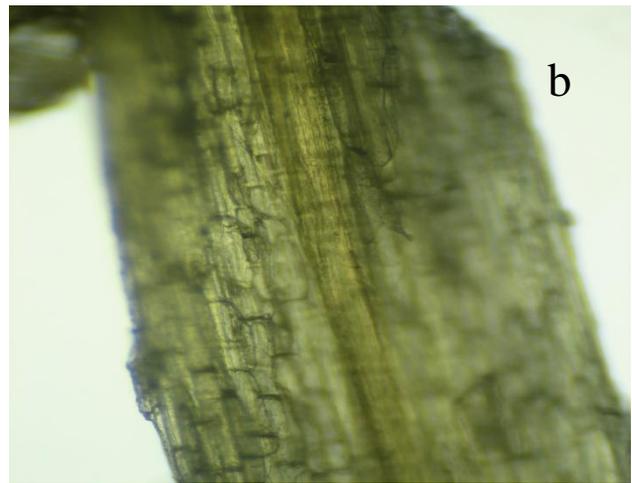
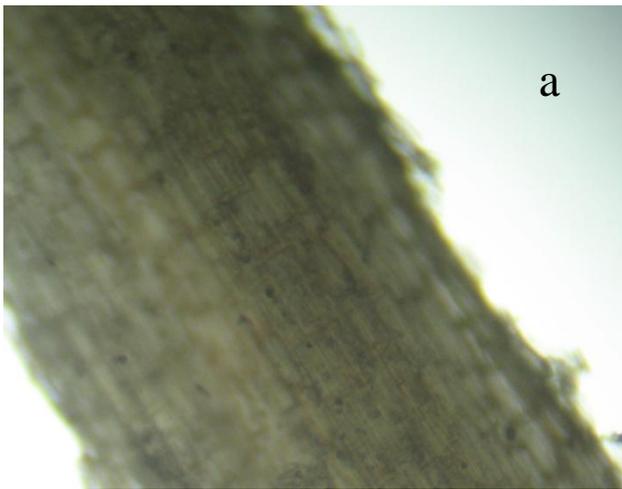


Figura 9. Tratamiento del rastrojo de maíz con NaOH al 4% (p/v) por 12 h. **a)** rastrojo de maíz sin tratamiento alcalino observado por el microscopio a 40x. **b)** rastrojo de maíz con tratamiento alcalino observado por el microscopio a 40x.

Por otro lado, el rastrojo con el menor tamaño de partícula (malla 30) sometido a tratamiento alcalino previo a la FES, fue capaz de inducir actividad tanto para mananasa (0.8 ± 0.01 U mg^{-1} de proteína), xilanasas (0.9 ± 0.01 U mg^{-1} de proteína) y celulasa (1 ± 0.01 U mg^{-1} de proteína).

Una baja producción enzimática en un residuo lignocelulítico puede asociarse al tamaño de partícula, por lo que una disminución en las dimensiones del esquileo producirá un aumento en el área de la superficie disponible para el crecimiento microbiano (Sangsurasak y Mitchell, 1998; Battan *et al.*, 2006). Considerando que el tratamiento alcalino ocasionó una degradación parcial de la lignina (sección 7.3), esto representa una oportunidad para la mayor accesibilidad del hongo hacia el sustrato, conduciendo a una mayor producción de enzimas.

Cuadro 5. Actividad enzimática resultante de la FES del rastrojo de maíz por *A. niger* GS1 a las 48 h

Muestra retenida en malla 10 (tamaño >0.2 mm)			Muestra retenida en malla 20 (tamaño >0.085 mm)			Muestra retenida en malla 30 (tamaño >0.059 mm)									
s/t		c/t	s/t		c/t	s/t			c/t						
M	X	C	M	X	C	M	X	C	M	X	C	M	X	C	
NPA			NPA			NPA		NPA		NPA			0.8 ±0.01	0.9 ±0.01	1 ±0.01

s/t = sin tratamiento alcalino; c/t = con tratamiento alcalino; M = Mananasa; X = Xilanasas;

NPA = No presentó actividad enzimática. * U mg^{-1} de proteína = μmoles de azúcar liberado/ mg de proteína

7.5 Determinación de humedad para la FES

La influencia del contenido de humedad en el crecimiento microbiano y la biosíntesis de productos, se pueden atribuir al impacto que tenga el agua sobre las propiedades físicas del sustrato sólido, como lo es la solubilización de nutrientes, entre otros (Shah y Madamwar, 2005; Botella *et al.*, 2007).

Como se puede observar en la Figura 10A, con 76% de humedad en el sustrato, la máxima producción de enzimas fibrolíticas fue a las 60 h de fermentación del rastrojo de maíz tratado con NaOH, obteniéndose una actividad enzimática de 1.8 ± 0.03 , 2.4 ± 0.07 y 2.7 ± 0.1 U mg^{-1} de proteína para mananasa, xilanasa y celulasa, respectivamente. Por otra parte, con 80% de humedad en el sustrato (Figura 10B), la máxima producción de enzimas fibrolíticas a las 48 h de fermentación del rastrojo de maíz tratado con NaOH, arrojó una actividad de 1.8 ± 0.04 , 2.6 ± 0.03 y 3.1 ± 0.09 U mg^{-1} de proteína para mananasa, xilanasa y celulasa, respectivamente. Posteriormente se observa un decremento de las actividades a las 54 h y 60 h de fermentación.

7.6 Desarrollo de *A. niger* GS1 sobre el sustrato de fermentación

Mediante un muestreo de pequeñas cantidades de rastrojo de maíz tratado con 4% NaOH inoculado y empacado en la columna, se observó el desarrollo y crecimiento de *A. niger* GS1 durante las primeras 48 h de fermentación. En la Figura 11-B se observa el inicio del crecimiento micelial sobre una partícula de sustrato. A las 36 h se apreció un abundante desarrollo micelial que rodea a las partículas de sustrato, observándose un micelio no septado (Figura 11-C). A las 48 h (Figura 11-D), se observó la formación de hifas aéreas y conidióforos, lo cual supone que la esporulación del hongo inicia entre las 40 h y las 48 h de fermentación.

Cabe mencionar que la pronta esporulación no es muy conveniente para la producción de enzimas exógenas, ya que *A. niger* GS1 manifestó su máxima actividad enzimática a las 48 h, cuando la FES se efectuó con 80% de humedad en el rastrojo de maíz previamente tratado con NaOH al 4% (p/v).

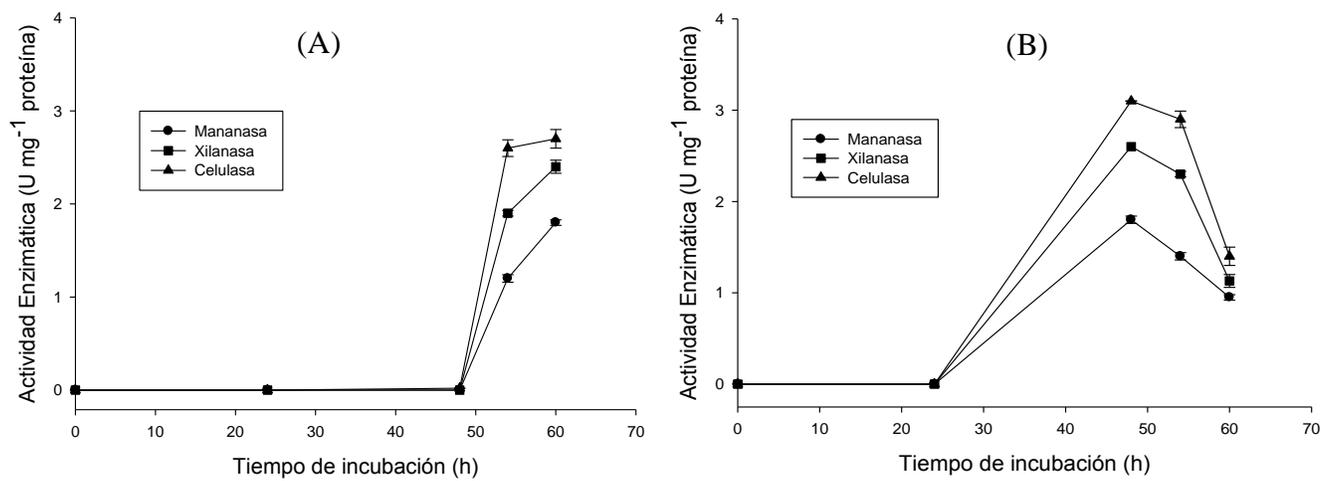


Figura 10. Actividad enzimática durante la FES A) 76% de humedad. B) 80% de humedad

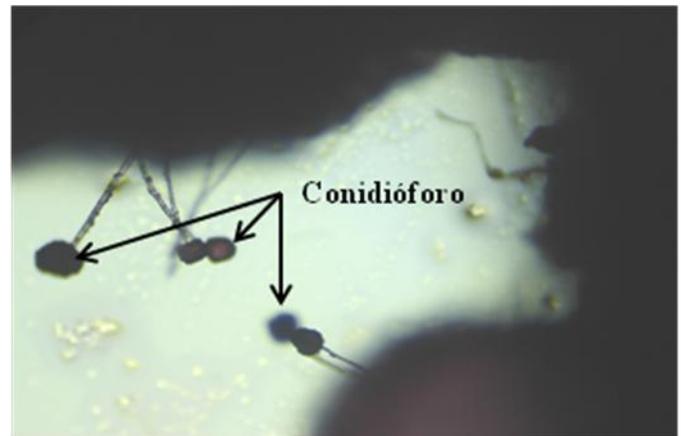
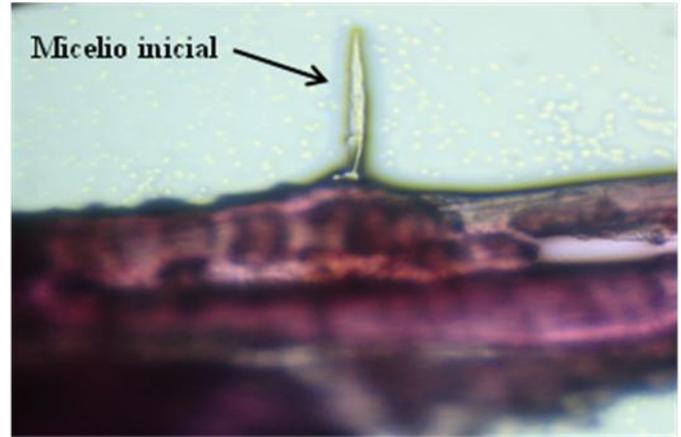
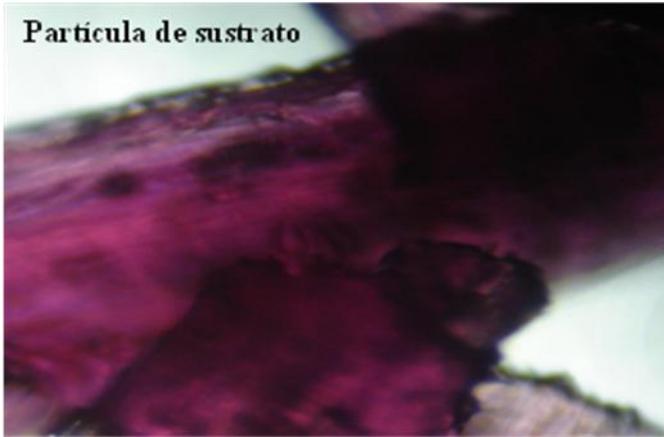


Figura 11. Desarrollo microscópico de *A. niger* GS1 sobre rastrojo de maíz durante la FES

7.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA SIGNIFICANCIA DE SALES Y OPTIMIZACIÓN PARA LA PRODUCCIÓN ENZIMÁTICA

7.7.1 Significancia de sales para la producción de enzimas fibrolíticas

Se realizó un diseño factorial fraccionado 2^{9-5} para determinar la significancia de sales con el fin de estudiar simultáneamente los factores principales y algunas de las interacciones dobles de los factores para la producción enzimática.

Los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro 6, en el cual se observa que la actividad varió en un intervalo desde no detectado (ND) hasta la máxima actividad observada que fue de 9 ± 0.6 , 12 ± 0.5 y 36 ± 4 U mg^{-1} de proteína, para mananasa, xilanasa y celulasa, respectivamente. Los valores máximos de actividad se obtuvieron a través del tratamiento 6, con las siguientes concentraciones del medio suplementario (g L^{-1}): extracto de levadura (16), glucosa (9), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.3), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.016), las cuales correspondieron al mayor nivel estudiado, mientras que $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ (2.5), Na_2HPO_4 (3), $\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.3), KH_2PO_4 (2) y $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.1), se encontraban en el menor nivel evaluado.

Los resultados obtenidos para la producción de mananasa, son más de cuatro veces mayores a los reportados por Mabrouk y Ahwany (2005), quienes obtuvieron una producción de 2 U mg^{-1} de proteína mediante *Bacillus amylolequifaciens* utilizando paja de trigo como fuente de carbono, pero menores cuando sustituyeron la paja de trigo por goma de haba, compuesta principalmente por galactomanano como fuente de carbono, en donde se observó un incremento en la producción de mananasa (16 U mg^{-1} de proteína). Por otra parte, para la producción de xilanasa, Okafor *et al.* (2007) reportaron 5.69 U mg^{-1} de proteína a las 100 h de incubación mediante *A. niger* ANL 301, usando salvado de trigo como soporte y fuente de carbono, siendo aproximadamente la mitad de la actividad obtenida en este trabajo (12 ± 0.5 U mg^{-1} de proteína). La relativamente alta producción de mananasa y xilanasa puede estar asociada a que el rastrojo de maíz utilizado como fuente de carbono y soporte fue previamente tratado con NaOH al 4% (p/v), previo a la FES (Sección 6.6). Estos resultados resaltan la importancia de dicha producción enzimática al utilizar un subproducto agroindustrial conteniendo una mezcla heterogénea de celulosa y hemicelulosa.

Cuadro 6. Actividad enzimática resultante del diseño factorial fraccionado 2^{9-5}

Tratamiento	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	Mananasa*	Xilanasa*	Celulasa*
1	-1	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1.6±0.05	7.4±2	9.0±2.0
2	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	ND	ND	ND
3	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	ND	0.7 ± 0.5	3.4 ± 1.0
4	1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	1	ND	0.3 ± 0.01	5.3 ± 2.0
5	-1	-1	1	1	1	-1	-1	1	1	7.5±0.8	11±1.0	27±3.0
6	1	-1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	9.0±0.6	12±0.6	36±4.0
7	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	ND	ND	ND
8	1	-1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	0.1±0.01	1.2±0.5	4.0±0.6
9	1	-1	1	1	1	-1	1	-1	-1	6.0±1.2	11.7±0.1	17.5±3.0
10	-1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	5.0±0.8	6.5±1	13±0.5
11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	4.3±0.3	6.5±0.5	3.1±0.1
12	-1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	ND	ND	ND
13	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1	1	ND	1.3±0.03	ND
14	-1	-1	1	-1	-1	1	1	1	-1	3.0±0.1	6.0±0.6	14±3.0
15	1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	1	ND	2.0±0.7	4±1.0
16	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	2.0±1.0	4±1.4	7.8±2.2

* Los resultados mostrados son el promedio de tres experimentos reportados en U mg⁻¹ de proteína ± desviación estándar. ND no detectada.

El análisis de varianza para la producción de actividad de mananasa, xilanasas y celulasa, muestra que los datos experimentales se ajustan al modelo estadístico (anexo IX). Los modelos ajustados de dichas actividades enzimáticas, arrojan un coeficiente de determinación (R^2) de 0.97 para mananasa, 0.91 para xilanasas y 0.94 para celulasa.

En el Cuadro 7 se muestra el efecto de los factores para la producción enzimática. Para la producción de mananasa, se observa que los factores principales de extracto de levadura, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Glucosa, KH_2PO_4 y CuSO_4 resultaron significativos, y extracto de levadura* $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, extracto de levadura*Glucosa, extracto de levadura*MgSO₄, extracto de levadura*FeSO₄ y extracto de levadura*ZnSO₄ fueron los factores de interacción doble significativos. En la producción de xilanasas, el extracto de levadura, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Glucosa, MgSO₄, ZnSO₄ y CuSO_4 fueron los factores principales estadísticamente significativos, mientras que el extracto de levadura* $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, extracto de levadura*ZnSO₄ resultaron ser los factores de interacción significativos, mientras que el extracto de levadura, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Glucosa, KH_2PO_4 , CuSO_4 y extracto de levadura* $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ extracto de levadura*MgSO₄, extracto de levadura*FeSO₄ y extracto de levadura*ZnSO₄ resultaron los factores principales y de interacción doble significativos para la producción de celulasa, respectivamente.

Los valores sombreados en el Cuadro 7 se refieren a factores que aunque son estadísticamente significativos para alguna variable (actividad enzimática), no lo son para las tres estudiadas, esto quiere decir que dichos factores se podrían dejar a una concentración constante sin que por ello se afecte sustancialmente el valor máximo de la producción enzimática. En la Figura 12 se observa de manera gráfica el efecto en la producción enzimática de los diversos nutrientes que conforman el suplemento nutritivo, mostrando que al aumentar la concentración (g L^{-1}) del extracto de levadura, glucosa, ZnSO₄ y CuSO_4 , se presentan líneas de tendencia favorables para la producción tanto de mananasa, xilanasas y celulasa. Por el contrario, se puede apreciar que al aumentar la concentración (g L^{-1}) de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y FeSO₄, disminuye la producción de dichas enzimas. Se observa que las concentraciones (g L^{-1}) de Na_2HPO_4 (4.0), MgSO₄ (0.5) y KH_2PO_4 (2), pueden dejarse como constantes sin que se tenga un efecto significativo en la producción de actividad enzimática.

Cuadro 7. Efecto de los factores para la producción enzimática

Factor	Prob > F mananasa	Prob > F Xilanasa	Prob > F Celulasa
Extracto de levadura	0.0008**	0.0079**	0.0004**
(NH ₄) ₂ SO ₄	<.0001***	<.0001***	<.0001***
Glucosa	<.0001***	<.0001***	<.0001***
Na ₂ HPO ₄	0.7023	0.0595	0.8378
MgSO ₄	0.5524	0.0227*	0.1209
FeSO ₄	0.0697	0.9239	0.3297
KH ₂ PO ₄	0.0295*	0.0679	<.0001***
ZnSO ₄	0.0010**	<.0001***	0.1115
CuSO ₄	<.0001***	0.0106*	<.0001***
Extracto de levadura*(NH ₄) ₂ SO ₄	0.0006**	<.0001***	0.0017**
Extracto de levadura*Glucosa	0.0014**	0.1988	0.4556
Extracto de levadura*MgSO ₄	0.0472*	0.9236	0.0003**
Extracto de levadura*FeSO ₄	<.0001***	0.0827	<.0001***
Extracto de levadura*ZnSO ₄	<.0001***	<.0001***	<.0001***
Extracto de levadura*Cuso ₄	0.0445*	0.4765	0.5973

*, **, *** significativo con $P \leq 0.05$, 0.01 y 0.001, respectivamente.

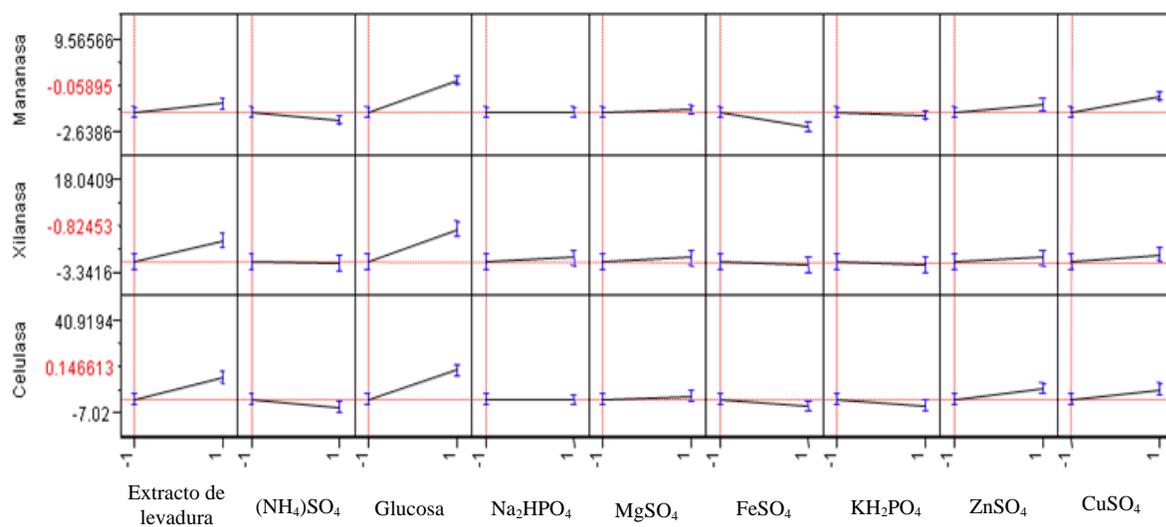


Figura 12. Perfil de predicción de los diferentes factores en la producción enzimática, de acuerdo al diseño 2^{9-5}

7.7.2 Optimización para la producción de enzimas fibrolíticas

Los resultados obtenidos del diseño de optimización (Draper-lin) para la producción enzimática se presentan en el Cuadro 8.

Los valores máximos de actividad de mananasa (18 ± 1.3 U mg^{-1} de proteína), xilanasa (24 ± 2 U mg^{-1} de proteína) y celulasa (44 ± 2 U mg^{-1} de proteína) se obtuvieron a través del tratamiento 17, cuando el extracto de levadura, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y la glucosa se encuentran en el nivel medio (15, 2.5 y 9.06 g L^{-1} , respectivamente) y el CuSO_4 se encuentra en el nivel menor (0.0138 g L^{-1}).

Mabrouk y Ahwany (2005) obtuvieron una producción de mananasa de 34 U mg^{-1} de proteína mediante *Bacillus amylolequifaciens* utilizando paja de trigo como fuente de carbono, y Jeya *et al.*, (2005), por su parte, reportaron una actividad de xilanasa optimizada de 49.3 ± 2 U mg^{-1} de proteína por *A. versicolor* MKU3 a las 72 h de FES utilizando salvado de trigo como soporte.

Cabe mencionar, que los resultados diferentes en condiciones aparentemente similares de experimentación evidencian la complejidad del tema en la suplementación de nutrientes para la producción de enzimas por FES, sobre todo al momento de interpretar los resultados que deben analizarse como producto de la interacción de más de un factor. Dichos resultados deben analizarse con cautela, ya que pueden derivarse de varios factores que incluyen el tipo de sustrato utilizado, las sales nutritivas empleadas y la cantidad usada para suplementar el medio de cultivo, el microorganismo inoculado y el tiempo de fermentación.

Cuadro 8. Actividad enzimática resultante del diseño de optimización (Draper-Lin).

Tratamiento	Extracto levadura	(NH ₄) ₂ SO ₄	Glucosa	CuSO ₄	Mananasa*	Xilanasa*	Celulasa*
1	0	0	0	0	11±0.7	14±0.03	20±1.4
2	1	1	-1	-1	3.5±0.2	7.5±0.7	21±0.6
3	1	-1	1	1	7.0±0.03	9.0±0.02	23±0.03
4	-1.68	0	0	0	1.3±0.5	4±0.04	11±2.0
5	1	-1	-1	1	14±0.03	19±0.7	43±0.7
6	0	0	1.68	0	12±0.07	15±2.0	32±0.01
7	0	1.68	0	0	3.5±0.7	6±1.3	11±2.0
8	-1	1	1	1	3.0±0.02	4.5±1.0	14±1.5
9	0	0	-1.68	0	9.0±1.4	16±0.6	17±3.0
10	0	-1.68	0	0	11±1.5	13±1.0	31±0.8
11	-1	1	-1	1	17±0.7	23±1.3	43±0.17
12	0	0	0	1.68	4.5±0.7	12±0.05	17±1.4
13	1	1	1	-1	17±1.4	23±3	43±0.7
14	0	0	0	0	1.0±0.04	1.7±0.4	3±0.04
15	1.68	0	0	0	5.0±0.018	9.5±0.6	13±1.3
16	-1	-1	1	-1	9.2±0.01	12±1.5	29±0.7
17	0	0	0	-1.68	18±1.3	24±2.0	44±2.0
18	-1	-1	-1	-1	7±0.5	17±0.7	20±1.5

* Los resultados mostrados son el promedio de dos experimentos reportados en U mg⁻¹ de proteína ± desviación estándar.

En el Cuadro 9 se muestra el efecto de los factores para la producción enzimática optimizada. Se observa que todos los factores son significativos para la actividad de mananasa, xilanasa y celulasa.

Esto es de esperarse, ya que los factores (nutrientes) utilizados para la optimización de la producción enzimática son los que resultaron significativos para la producción de mananasa, xilanasa y celulasa, usando el diseño factorial fraccionado 2^{9-5} .

Cuadro 9. Efecto de los factores para la producción enzimática en el diseño de optimización

Factor	Valor P	Valor P	Valor P
	Mananasa	Xilanasa	Celulasa
A:Extracto de levadura	0.000***	0.000***	0.000***
B: (NH ₄) ₂ SO ₄	0.104	0.048*	0.334
C:Glucosa	0.000***	0.000***	0.000***
D: CuSO ₄	0.000***	0.000***	0.000***
AA	0.002**	0.000***	0.000**
AB	0.000***	0.023	0.000***
AC	0.267	0.927	0.000**
AD	0.000**	0.004**	0.003**
BB	0.000***	0.000***	0.000***
BC	0.689	0.067	0.003**
BD	0.000***	0.000***	0.000***
CC	0.000***	0.000***	0.000***
CD	0.000***	0.000**	0.000***
DD	0.000**	0.141	0.000***

*, **, ***: significativo con $P \leq 0.05$, 0.01 y 0.001 , respectivamente.

Los factores que influyen sobre la producción de mananasa, xilanasa y celulasa, presentan un comportamiento parecido (Figura 13 A, B y C, respectivamente). Para el extracto de levadura (EL) al pasar del nivel más bajo (12.5 g L^{-1}) al nivel más alto (17.5 g L^{-1}) la producción de todas las enzimas evaluadas aumenta. Para el caso del $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (SA) y glucosa (G) el aumento en la producción de las enzimas ocurre usando los niveles intermedios de SA (1.75 , 2.5 y 3.25 g L^{-1}), y G (8.125 , 9.0625 y 9.375 g L^{-1}). Por otro lado, cuando la concentración del CuSO_4 (SC) pasa del nivel más bajo (0.0138 g L^{-1}) al nivel más alto (0.02 g L^{-1}) la producción enzimática disminuye. De acuerdo a lo anterior, para obtener una elevada actividad de las tres enzimas estudiadas, se recomienda utilizar niveles altos de EL, bajos de SC e intermedios de G y SA.

Diversos autores reportan el empleo de nutrientes complementarios tales como extracto de levadura, sulfato de amonio, glucosa y sulfato de cobre en un medio de cultivo para la producción de enzimas (mananasa, xilanasa y celulasa, entre otras) en fermentación sólida (Gutiérrez-Correa y Tengerdy, 1998; Zakari *et al.*, 1998; Park *et al.*, 2002; Thangamani *et al.*, 2003). Sin embargo, no hay una cantidad puntual de cada nutriente, ya que las condiciones varían según la necesidad del microorganismo, biorreactor utilizado y sustrato utilizado.

En el Cuadro 10 se presentan los coeficientes de las ecuaciones cuadráticas que representan el modelamiento de la actividad de mananasa, xilanasa y celulasa. El cálculo de la actividad utilizando dichos coeficientes se muestra en el anexo XI.

La superficie de respuesta para la producción de actividad de mananasa, xilanasa y celulasa, muestra que a condiciones relativamente altas de EL y niveles medios de G, la actividad enzimática es mayor teniendo como factores fijos el SA (1.25 g L^{-1}) y SC (0.0138 g L^{-1}) (Figura 14).

En la Figura 15 se muestran los gráficos de probabilidad normal de los efectos, observándose similitud del comportamiento entre los resultados obtenidos y los predichos por el programa estadístico utilizado.

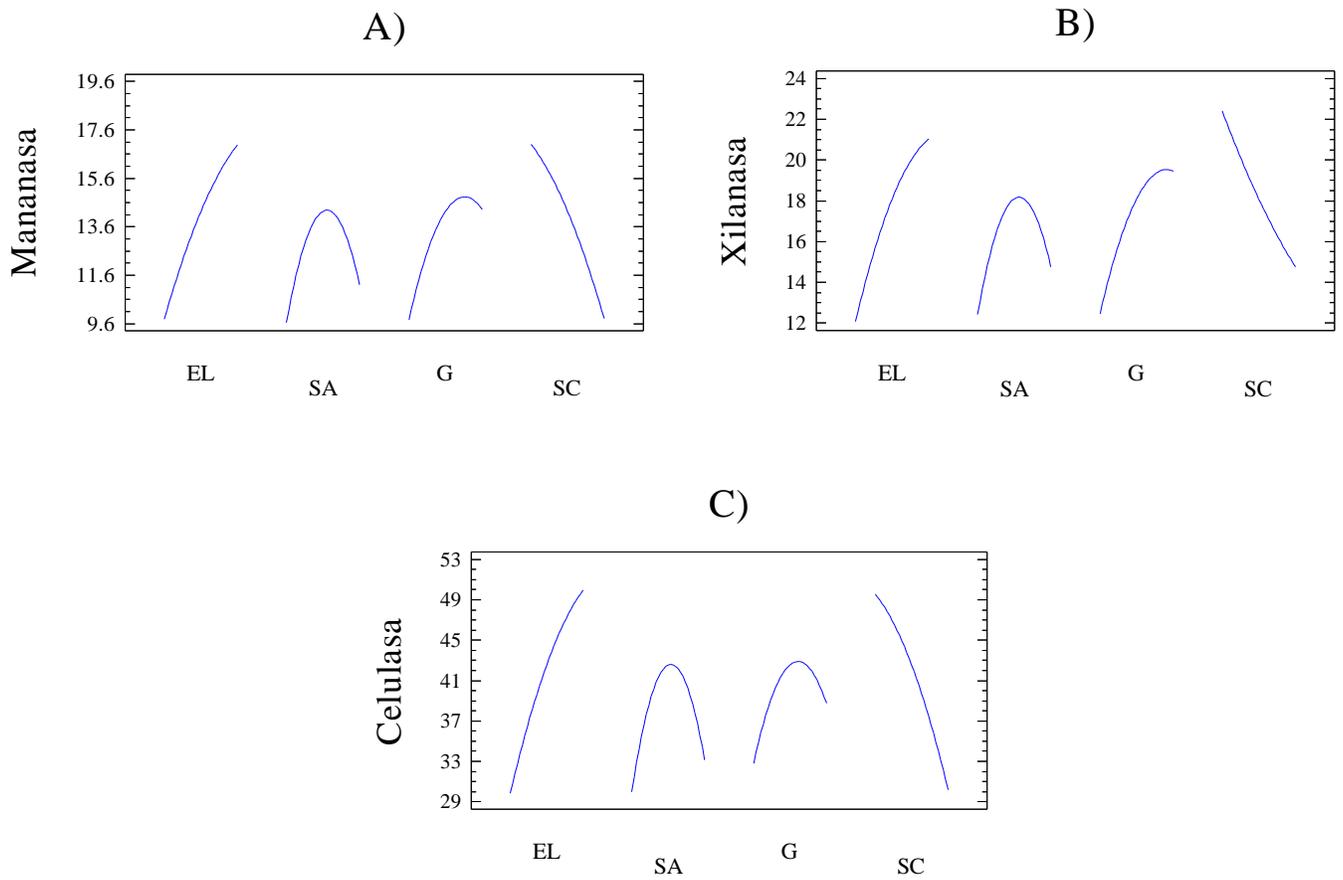


Figura 13. Gráficos de efectos principales en la optimización para la producción de enzimas fibrolíticas. A) Mananasa. B) Xilanasa. C) Celulasa

Cuadro 10. Coeficiente para las ecuaciones cuadráticas que representan la actividad de mananasa, xilanas y celulasa

	Mananasa	Xilanas	Celulasa
Int	- 115.87	94.7536	-946.56
EL	8.04	13.55	62.95
SA	3.61	- 10.77	- 31.31
G	6.78	61.97	281.73
SC	- 33337.90	- 54066.5	- 81227.3
EL*SA	- 3.11	- 2.31	- 6.31
EL*G	- 0.46	- 0.11	- 5.00
EL*SC	1021.62	976.71	2262.43
SA*G	0.15	1.54	2.26
SA*SC	4474.61	4296.57	12034.7
G*SC	1876.4	2188.9	5627.32
EL ²	- 0.38	- 0.68	- 1.18
SA ²	6.79	- 8.03	- 19.61
G ²	- 5.64	- 5.49	- 17.38
SC ²	- 347418	205534	- 1.11 x 10 ⁶

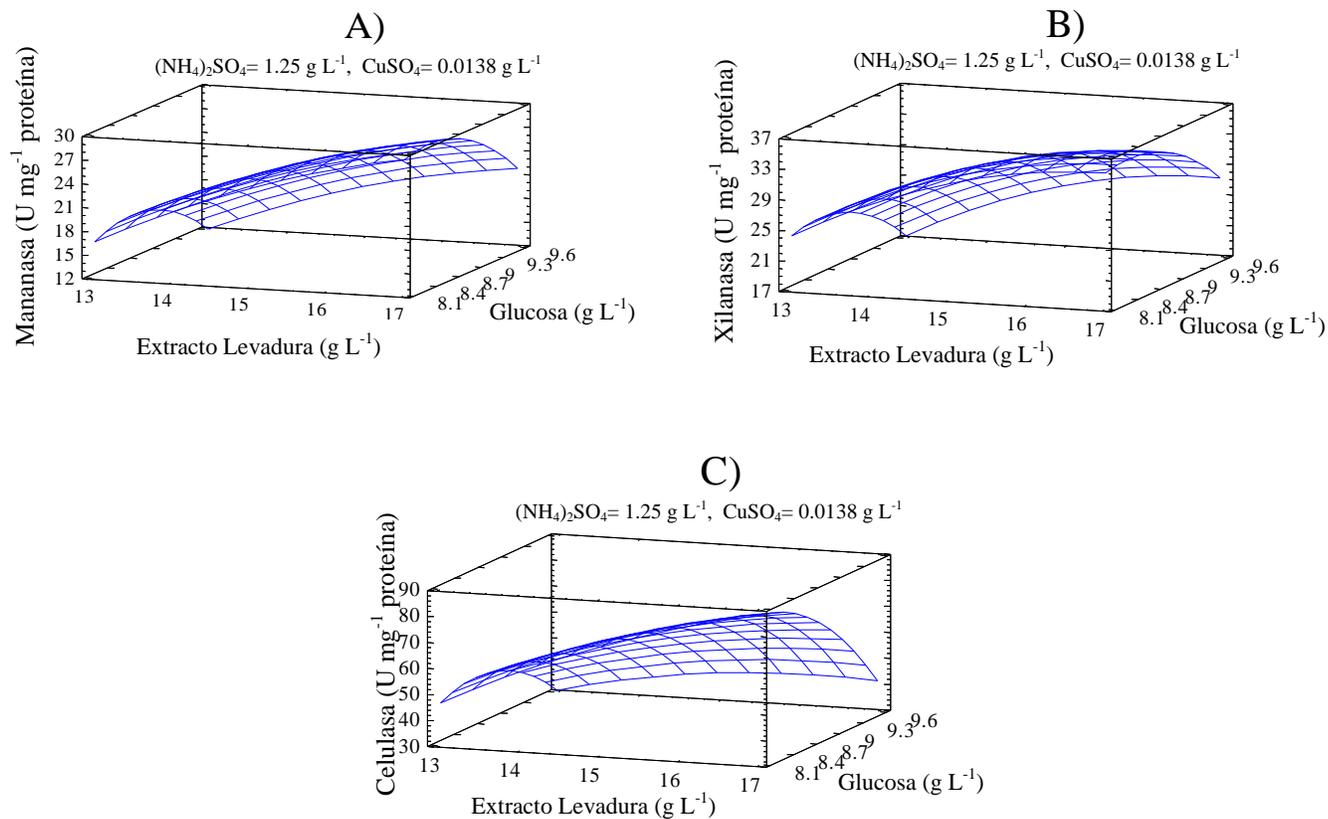


Figura 14. Superficie de respuesta estimada en la optimización para la producción de enzimas fibrolíticas. A) Mananasa. B) Xilanasa. C) Celulasa.

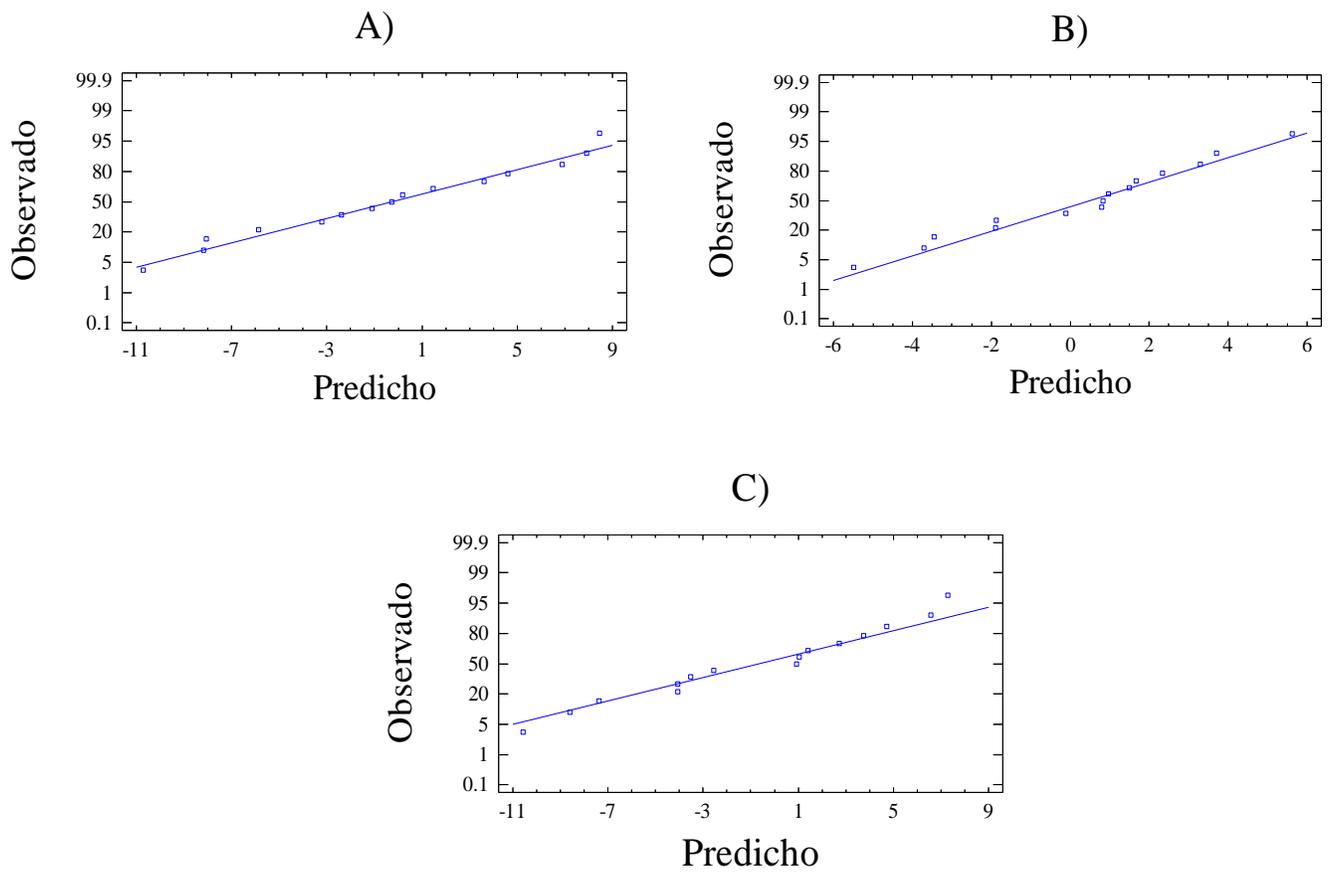


Figura 15. Gráficos de probabilidad normal de los efectos, usando el diseño Draper-Lin para la optimización de enzimas fibrolíticas. A) Mananasa. B) Xilanasa. C) Celulasa.

En el Cuadro 11 se muestran los niveles de los diferentes factores evaluados para la optimización de la actividad enzimática, según el programa estadístico utilizado. Se observa que los valores de los factores que conducen a la actividad enzimática optimizada, son similares para las tres enzimas evaluadas.

Al realizar la comprobación de los resultados arrojados por el modelo estadístico (efectuado por triplicado), se observó que utilizando los niveles predichos de los factores optimizados producen una actividad muy similar a la que predice el modelo.

Cuadro 11. Niveles óptimos de los factores para la optimización enzimática.

	Extracto levadura (g L⁻¹)	(NH₄)₂SO₄ (g L⁻¹)	Glucosa (g L⁻¹)	CuSO₄ (g L⁻¹)	Producción (U mg⁻¹ proteína)	Producción experimental (U mg⁻¹ proteína)
Mananasa	17.35	1.25	8.42	1.38x10 ⁻²	30.27	30.91 ± 1.0
Xilanasa	16.60	1.44	8.43	1.38x10 ⁻²	35.54	35.30 ± 1.6
Celulasa	17.35	1.25	7.96	1.38x10 ⁻²	89.82	89.40 ± 1.0

7.8 Cinética de crecimiento microbiano en las mejores condiciones de FES

En la Figura 16 se observan los resultados obtenidos para la prueba producción de CO₂ y actividad enzimática durante la FES.

De acuerdo a las condiciones con las que se obtuvo la mayor actividad de mananasa, xilanasa y celulasa, se procedió a realizar cinéticas de crecimiento, midiendo la producción de CO₂ desprendido por la actividad metabólica del hongo, para cada columna de fermentación a diferentes tiempos (0, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30, 36, 42 y 48 h). Esta medición se utilizó como un método indirecto para la estimación de la biomasa, empleando un sistema de FES y una medición de alta precisión utilizando un cromatógrafo de gases.

Analizando la cinética del CO₂ desprendido (Figura 16), no se detectó o fue casi nula la producción de CO₂ en las primeras nueve horas de la FES, debido probablemente adaptación del hongo en el sustrato; a este período se le conoce como fase lag o de adaptación.

Posteriormente el hongo creció aceleradamente, a las 12 h se observó la máxima producción de CO₂ siendo de 0.71±0.09% para mananasa, 0.80±0.05% para xilanasa y 0.86±0.06% para celulasa; esta fase es conocida como fase de crecimiento exponencial, asociado al consumo de la glucosa. Después se observó un descenso en la producción de CO₂ hasta 0.36±0.05%, 0.22±0.05% y 0.25±0.05%, para mananasa, xilanasa y celulasa, respectivamente a las 48 h, asociándose estos resultados a la utilización del rastrojo de maíz como fuente de carbono a través de la producción de enzimas fibrolíticas, debido a la probable ausencia de glucosa. Dada la más rápida asimilación de glucosa, la liberación de CO₂ es ahora más lenta, entrando en fase estacionaria alrededor de las 40 h de incubación.

En el trabajo realizado por Ponce (2002) donde *A. niger* GS1 se empleó para la fermentación de olote de maíz, el hongo mostró un desarrollo a las 22 h. Aquí no se adicionó glucosa, atribuyendo a esto que el hongo tardó más tiempo en desarrollar, ya que primero tuvo que sintetizar las enzimas necesarias para poder degradar al sustrato y así aprovechar la hemicelulosa del olote como fuente de energía para su metabolismo.

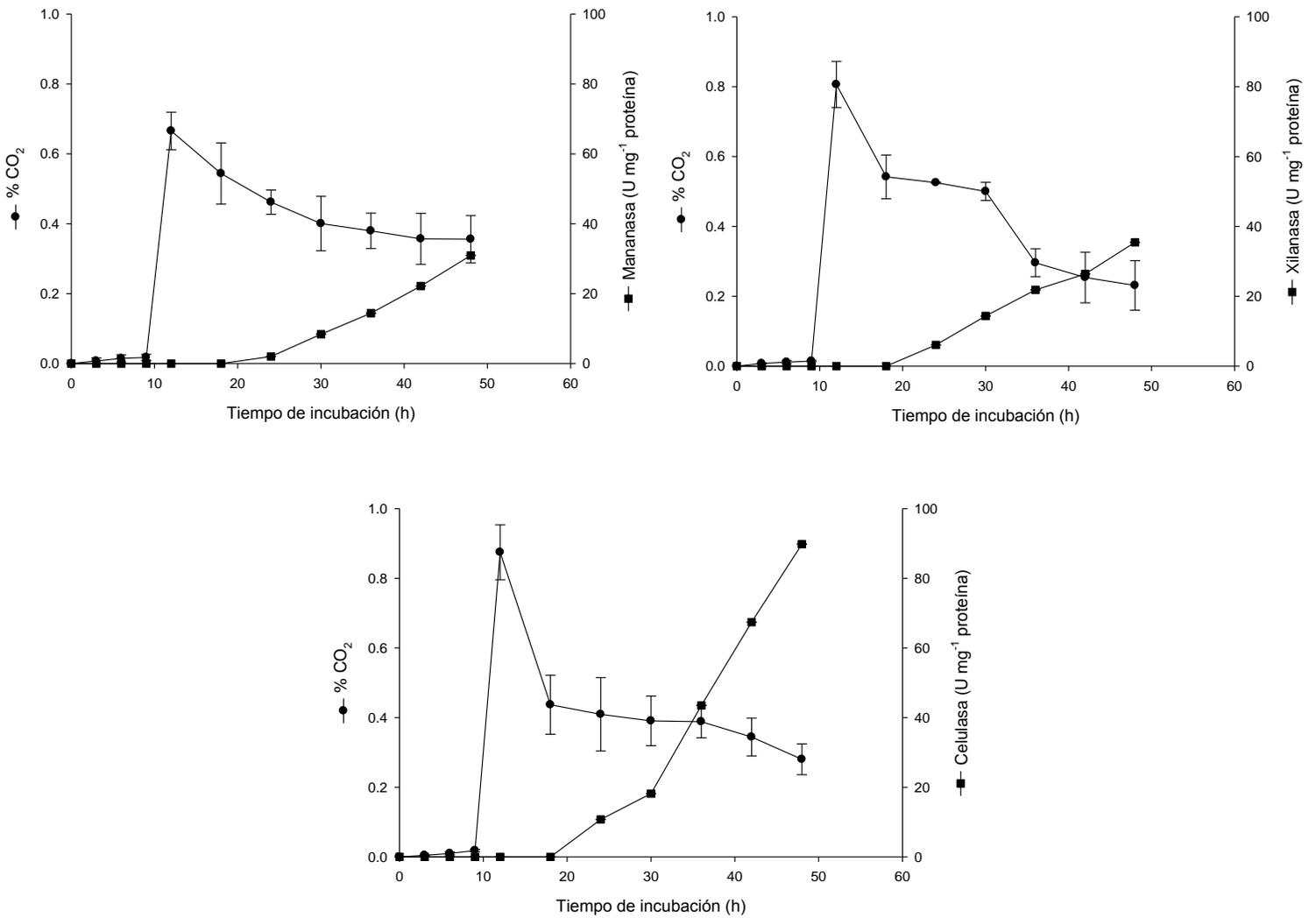


Figura 16. Producción de CO₂ y actividad enzimática durante la FES

7.9 Efecto del extracto enzimático sobre el rastrojo de maíz

En el Cuadro 12 se muestra el contenido nutricional del rastrojo previamente tratado con hidróxido de sodio al 4% (p/v) a diferentes tiempos de exposición (0, 4, 8 y 12 h) al extracto enzimático

Se observa que la composición química del rastrojo de maíz antes del tratamiento alcalino expuesto al extracto enzimático semipurificado, no presentó cambios significativos durante el tiempo de exposición (resultados no mostrados).

La composición química del rastrojo de maíz después del tratamiento alcalino, presentó una ligera disminución de FDN ($70\pm 0.05\%$ a $67\pm 0.03\%$), de celulosa ($36.5\pm 0.05\%$ a $32.8\pm 0.05\%$) y de lignina ($5.5\pm 0.04\%$ a $4.7\pm 0.05\%$), a las 8 h de exposición del rastrojo de maíz con el extracto enzimático, sin sufrir ningún cambio significativo después de este tiempo.

La falta de información sobre los productos enzimáticos usados y los métodos de aplicación del producto enzimático, hacen más difícil la comparación entre los estudios. Los resultados inconsistentes al parecer son causados por un número de factores que incluyen la composición del esquilmo, el nivel de enzima suministrada, la estabilidad de la enzima y el método de aplicación (Yang *et al.*, 1999).

Sin embargo, a pesar de la complejidad del tema diversos autores coinciden en que las enzimas exógenas podrían afectar a los alimentos antes de ser consumidos. Los efectos pudieran ser tan simples como la liberación de carbohidratos solubles, o tan complejos como la ruptura de barreras que limitan la digestibilidad microbiana del alimento en el rumen (González, 2004).

Cuadro 12. Contenido nutricional del rastrojo de maíz tratado con hidróxido de sodio al 4% (p/v) a diferente tiempo de exposición al extracto enzimático

H	Rastrojo de maíz con tratamiento alcalino				
	FDN (%)	FDA (%)	H (%)	C (%)	L (%)
0	70±0.05 ^a	47±0.03 ^a	21.8±0.05 ^a	36.5±0.05 ^a	5.5±0.04 ^a
4	69±0.06 ^a	47±0.02 ^a	21.6±0.08 ^b	35.4±0.05 ^b	5.5±0.04 ^a
8	67±0.05 ^b	46±0.02 ^{a,b}	19.2±0.01 ^c	33±0.02 ^c	4.7±0.05 ^b
12	67±0.03 ^b	47±0.03 ^b	19.8±0.05 ^d	32.8±0.05 ^c	4.7±0.05 ^b
16	67±0.06 ^c	46±0.06 ^c	21.1±0.02 ^e	33±0.03 ^d	4.7±0.05 ^b

FDN. Fibra detergente neutra; FDA. Fibra detergente ácido; H. Hemicelulosa; C. Celulosa; L. Lignina. Letras indican diferencia significativa estadística. $\alpha < 0.05$ (Turkey)

7.10 Digestibilidad ruminal *in vitro* de la materia seca (DRIVMS)

En la figura 17 se muestran los resultados obtenidos en la DRIVMS del rastrojo de maíz antes y después del tratamiento alcalino a diferentes tiempos de exposición al extracto enzimático.

Se observa que los valores de la DRIVMS del rastrojo de maíz antes del tratamiento alcalino sin agregar extracto enzimático (control), y aquellos con exposición al tratamiento enzimático durante 48 y 72 h de incubación, no presentaron diferencia significativa, ya que se obtuvieron valores de 33±1.24% para el control y 32.4±1.6%, para el máximo tiempo de exposición enzimática (12 h), después de 48 h de incubación en el líquido ruminal. Por otro lado, se obtuvieron valores de 37.7±1% para el blanco y 37.4±1.33%, para el mayor tiempo de exposición al extracto enzimático (12 h), después de 72 h de incubación (Figura 17A).

Por su parte, la DRIVMS del rastrojo de maíz después del tratamiento alcalino sin adición de extracto enzimático aumentó de 34.5±1.1% para el blanco, hasta 37.5±0.8% a las 12 h de exposición al extracto enzimático, después de 48 h de incubación en el líquido ruminal. Por otro lado, la DRIVMS del rastrojo de maíz después del tratamiento alcalino incubado por 72 h en

el líquido ruminal se incrementó de $37\pm 1.6\%$ para el control, hasta $42.3\pm 1.7\%$, a las 12 h de exposición al extracto enzimático (Figura 17B).

Cabe mencionar que no se observó una diferencia significativa en la DRIVMS cuando el rastrojo de maíz fue tratado alcalinamente y expuesto al extracto enzimático por 8 y 12 h, a las 48 y a las 72 h de incubación en el líquido ruminal.

Cabe aclarar que la DRIVMS es un indicador de la digestión global de nutrientes del rastrojo de maíz a nivel ruminal.

7.11 Digestibilidad verdadera *in vitro* de materia seca (DVIVMS)

En la Figura 18 se muestra la DVIVMS del rastrojo de maíz antes y después del tratamiento alcalino (4% NaOH) a diferentes tiempos de exposición al extracto enzimático. Este parámetro mide con mayor precisión los cambios en el contenido de carbohidratos y en general de toda la MS, derivado de la digestión ruminal y de todo el tracto digestivo.

No se observaron cambios significativos en la DVIVMS sin agregar (control) y agregando enzima al rastrojo de maíz antes del tratamiento alcalino. La DVIVMS después de 48 h de incubación ruminal fue de $28.2\pm 1.5\%$ para el control y $30.7\pm 1.8\%$ cuando se sometió a 12 h de exposición enzimática. Por otro lado, la DVIVMS después de 72 h de incubación ruminal fue de $35.3\pm 1.2\%$, para el blanco y $35.3\pm 1.4\%$ a las 12 h de exposición al extracto enzimático.

La DVIVMS del rastrojo de maíz después del tratamiento alcalino sin extracto enzimático aumentó de $35.7\pm 2.7\%$ (blanco) hasta $44.4\pm 1.5\%$, a las 12 h de exposición al extracto enzimático, después de 48 h de incubación ruminal. Mientras que la DVIVMS a las 72 h de incubación ruminal del rastrojo de maíz tratado con álcali, se incrementó de $42.3\pm 1.7\%$, para el control hasta $52.8\pm 1.8\%$, a las 12 h de exposición al extracto enzimático.

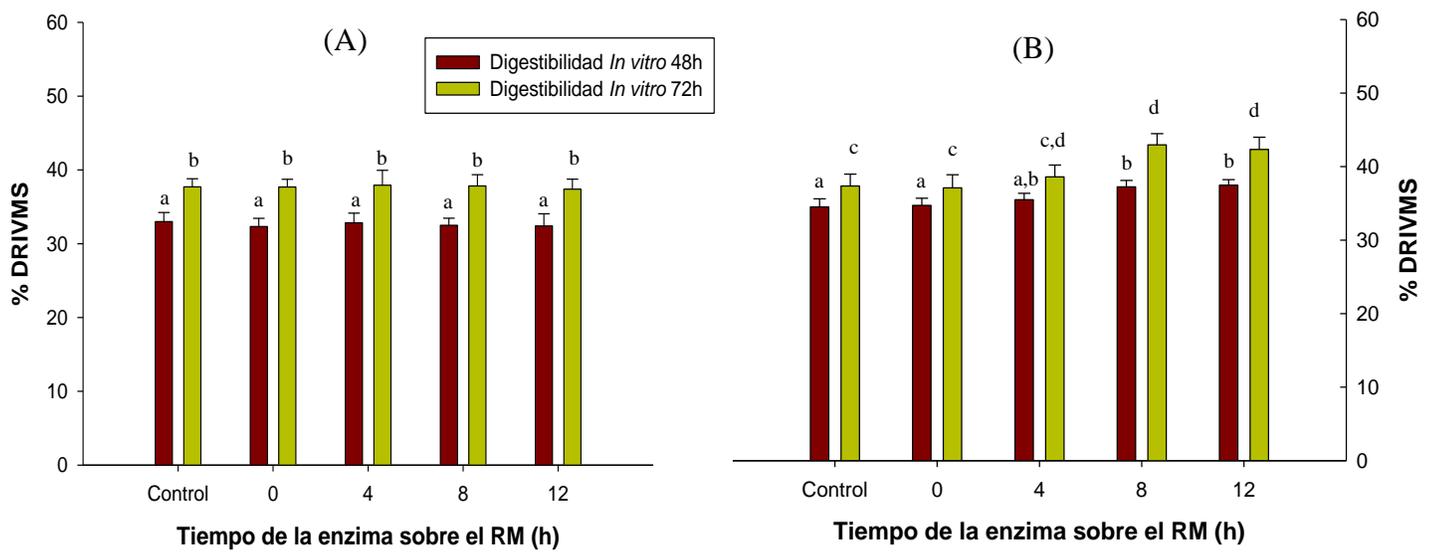


Figura 17. Digestibilidad ruminal *in vitro* de la materia seca. A) Rastrojo de maíz sin tratamiento alcalino expuesto a extracto enzimático. B) Rastrojo de maíz con tratamiento alcalino expuesto a extracto enzimático.

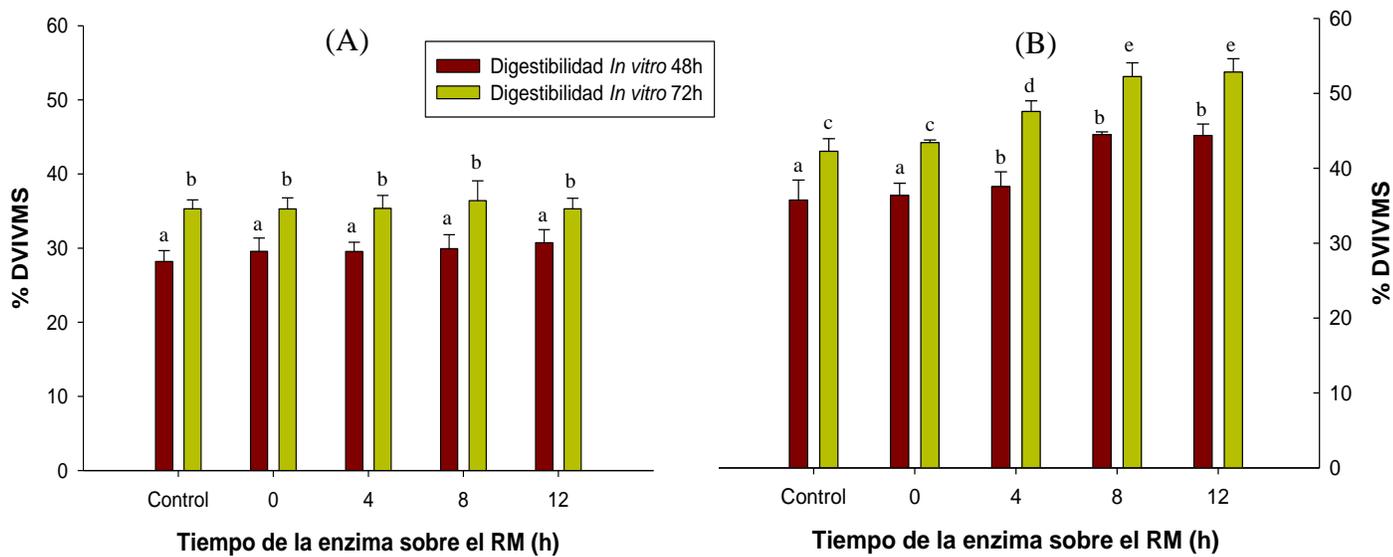


Figura 18. Digestibilidad verdadera *in vitro* de la materia seca. A) Rastrojo de maíz sin tratamiento alcalino expuesto a extracto enzimático. B) Rastrojo de maíz con tratamiento alcalino expuesto a extracto enzimático.

8. CONCLUSIONES

La composición química del rastrojo de maíz fue afectada por el tratamiento con NaOH (4% p/v) ya que disminuyó el contenido de lignina y de hemicelulosa.

El menor tamaño de partícula del rastrojo de maíz (>0.059 mm, $0.042 <$ mm) tratado con NaOH al 4% (p/v) a las 48 h de FES con 80% de humedad, mostró la mayor producción de enzimas fibrolíticas.

De acuerdo a la producción de CO_2 , la fase de crecimiento exponencial del microorganismo es durante las primeras 12 h de fermentación, probablemente asociado al consumo de la glucosa usada en el suplemento nutritivo.

La glucosa, el extracto de levadura, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y CuSO_4 son factores que influyen significativamente para la producción de enzimas fibrolíticas.

La máxima producción de xilanasa se obtuvo con pretratamiento alcalino del rastrojo de maíz, y agregando un suplemento nutritivo optimizado de (g L^{-1}): Extracto de levadura (16.6), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1.44), Glucosa (8.43), Na_2HPO_4 (4.0), MgSO_4 (0.5), FeSO_4 (0.31), KH_2PO_4 (2), ZnSO_4 (0.1) y CuSO_4 (0.0138).

De las enzimas fibrolíticas obtenidas, los valores optimizados de actividad producida fueron $30.91 \pm 1.0 \text{ U mg}^{-1}$ de proteína de mananasa, $35.3 \pm 1.6 \text{ U mg}^{-1}$ de proteína de xilanasa, $89.82 \pm 1.0 \text{ U mg}^{-1}$ de proteína de celulasa.

El modelo obtenido a través de los diseños experimentales utilizados, predijo con buena precisión los valores óptimos de actividad fibrolítica.

Pueden obtenerse mayores valores de DRIVMS y DVIVMS al someter a tratamiento alcalino y posteriormente a tratamiento con enzimas fibrolíticas al rastrojo de maíz, debido a una solubilización parcial de la lignina y de los carbohidratos susceptibles al ataque enzimático.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Adebowale, E., Nakashima, Y. (1992). Rumen degradation of some Leguminosae Graminae roughages: effect of chemical pre-treatment with or without cellulase preparation on dry matter and cell wall disappearance. *Anim. Feed Sci. Technol.* 38: 219-235.
- AOAC (1990). Official Methods of Analysis of AOAC International. 16a Ed. Vol. 1. Cunniff, P. (ed). AOAC International. Gaithersburg, MD. 4-1-4-12.
- Amorim, H. (1979). Coffee enzymes and coffee quality. *Enz. Food. Beverage Process.* 5: 27-52.
- Auria, R., Morales, M., Villegas, E., Revah, S, (1993). Influence of mold growth on the pressure drop in aerated solid state fermentators. *Biotechnol. Bioeng.* 41: 1007-1013.
- Battan, B., Sharma, J., Kuhad, R. (1996). High-level xylanase production by alkaliphilic *Bacillus pumilus* ASH under solid-state fermentation. *World Journal of Microbiology and biotechnology.* 22: 1281-1287.
- Beauchemin, K., Rode, L., Sewalt, V. (1995). Fibrolytic enzymes increase fiber digestibility and growth rate of steers fed dry forages. *J. Anim. Sci.* 75: 641-644.
- Beauchemin, K., Yang, W., Rode, L. (1999). Effects of grain source and enzyme additive on site and extent of nutrient digestion in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82: 378-390.
- Beauchemin, K., Colombatto, D., Morgavi, D., Yang, W. (2003). Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. *J. Anim. Sci.* 81: 37-47.
- Beauchemin, K., Rode, L., Maekawa, M., Morgavi, D. and Kampen, R. (2000). Evaluation of a nonstarch polysaccharidase feed enzyme in dairy cow diets. *J. Dairy Sci.* 83: 543-553.
- Beauchemin, K., Colombatto, D. Morgavi, D. Yang, W. (2003). Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. *J. Anim. Sci.* 81: 37-47.
- Biely, P. (2003). Xylanolytic enzymes. En: *Handbook of food enzymes*. Editado por J.R. Whitaker, A.G.J. Voragen y D.W.S. Wong. Marcel Dekker, New York, US. 879-961.
- Botella, C., Diaz, A., Ory, I., Webb, W., Blandino, A. (2007). Xylanase and pectinase production by *Aspergillus awamori* on grape pomace in solid state fermentation. *Process Biochem.* 42: 98-101.
- Burroughs, W., Woods, W., Ewing, S., Greig, J., Theurer, B. (1960). Enzyme additions to fattening cattle rations. *Journal Animal Science.* 19: 458-464
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

- Brand, D., Pandey, A., Rodríguez-Leon, J., Roussos, S., Brand, I. (2001). Packed bed column fermenter and kinetic modeling for upgrading the nutritional quality of coffee husk in solid-state fermentation. <http://pubs.acs.org.isuscribejournals.html>
- Breccia, J., Morán, A., Castro, G., Siñeriz, F. (1998). Thermal sterilization by polyols of β -xylanase from *Bacillus amyliquesfaciens*. J. Chem. Technol. Biotech. 71: 241-245.
- Catalán, R., Neira, A., Rivas, B. (2002). Estudio de la co-polimerización por injerto de acrilonitrilo en fibra celulósica secundaria. Bol. Soc. Chilena. Quím. 47: 39-47.
- Chesson, A., Gordon, A., Lomax, J. (1983). Substituent groups linked by alkali labile bonds to arabinose and xylose residues of legume, grass, and cereal straw cell walls and their fate during digestion by rumen microorganisms. J. Sci. Food Agric. 34: 1330-1340.
- Da Silva, R., Lago, E., Merheb, C., Macchione, M., Park, K., Gomes, E. (2005). Production of xylanase and cmcase on solid state fermentation in different residues by *thermoascus aurantiacus* miehei. Brazil. J. Microbiol. 36: 235-241
- Dávila, G. y Vázquez-Duhalt, R (2006). Enzimas lignolíticas fúngicas para fines Ambientales. Mensaje Bioquímico. 30: 29-55.
- Dean, D., Adesogan, A., Kruger, N., Littell, R. (2005). Effect of fibrolytic enzymes on the fermentation characteristics, aerobic stability, and digestibility of bermudagrass silage. J. Dairy Sci. 88: 994–1003.
- Doelle, H., Mitchell, D., Rolz, C. (1992). Solid substrate cultivation. Elsevier Applied Science. London.
- Draper, N., Lin, D. (1990). “Small Response-Surface Designs.” *Technometrics*, 32: 187-194.
- Durand, A. (2003) Bioreactor designs for solid state fermentation. Biochem. Eng. J. 13: 113–12.
- Elizondo, I., (1998). Evaluación de los tratamientos alcalinos sobre la calidad nutricional de subproductos lignocelulósicos. Tesis de Doctorado. PICP. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad de Colima. México.
- El-Yassin, F., Fontenot, J., Chester-Jones, H. (1991). Fermentation characteristics and nutritional value of ruminal contents and blood ensiled with untreated or sodium hydroxide-treated wheat straw. Journal Animal Science. 69:1751-1759
- Espinoza, F., Argenti, P., Urdaneta, G., Araque, C., Fuentes, Palma, J., Bello, C. (2004) Uso del forraje de maíz (*Zea mays*) hidropónico en la alimentación de toretes mestizos. Zootecnia Tropical. 22: 303-315.

FAO 2007 www.faostat.fao.org 12/05/2007

- Feng, P., Hunt, P., Pritchard, G., Julien, W. (1996). Effect of enzyme preparations on *in situ* and *in vitro* degradation and *in vivo* digestive characteristics of mature cool-season grass forage in beef steers. *J. Anim. Sci.* 74: 1349-1357.
- Ferret, E., Simeon, J., Molin, P., Jorquera, H., Acuña, G., Giral, R. (1999). Macroscopic growth of filamentous fungi on solid substrate explained by a microscopic approach. *Biotech. Bioeng.* 65: 512-522.
- Fuentes, J., Magaña, C., Suárez, L., Peña, R., Rodríguez, S., Ortiz, B. (2001). Análisis químico y digestibilidad *in vitro* de rastrojo de maíz (*Zea Mays* L.). *Agronomía Mesoamericana.* 12: 189-192.
- Gervais, P., Molin, P. (2003). The role of water in solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.* 13: 85–101.
- González, E. (2004). Utilización de enzimas fibrolíticas en cabras lecheras. Evaluación de su actividad y características fermentativas *in vitro*. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. España.
- González, S. (2008). Aprovechamiento de esquilmos y subproducto en la alimentación del ganado. Ficha Técnica 3. SAGARPA. www.sagarpa.gob.mx/desarrollorural/publicaciones/fichas/listafichas/P-03--1.pdf. 29 de abril de 2008.
- Gutiérrez, L. (2004). Efecto del azufre sobre la digestibilidad *in situ* de un alimento en base fibra y su relación sobre los microorganismos del rumen en ovinos. Tesis de doctorado. Universidad de Colima. México.
- Gutierrez-Correa, M., Tengerdý, R. (1998). Xylanase production by fungal mixed culture solid substrate fermentation on sugar cane bagasse. *Biotechnol. Lett.* 20: 45–47
- Gübitz, G., Hayn, M., Sommerauer, W. (1996). Mannan-degrading enzymes from *Sclerotium rolsfsii* characterization and synergism of two endo β -mannanases and β -mannosidase. *Bioresource Technol.* 58: 127-135.
- Gübitz, G., Haltrich, D., Latal, B., Steiner, W. (1997). Mode of depolymerassation of hemicellulose by various mannanase and xylanases in relation to their ability to bleach softwood pulp. *Appl. Microbiol. Biotech.* 47: 658-662.
- Haddad, S., Grant, R., Klopfenstein, T. (1994). Digestibility of alkali-treated wheat straw measured *in vitro* or *in vivo* using Holstein heifers. *J. Animal Sci.* 72:3258-3265.

- Hacker, J.B., Minson, D.J. (1981). The digestibility of plant parts. *Common. Bureau Past. Field Crops*. 51: 459-482.
- Hamidi-Esfahani, Z, Shojaosadati, S.A., Rinzema, A. (2004). Modelling of simultaneous effect of moisture and temperature on *A. niger* growth in solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.* 21: 265–272.
- Hardin, M., Mitchell, D., Howes, T. (2001). Residence time distributions of gas flowing through rotating drum bioreactors, *Biotechnol. Bioeng.* 74: 145–153.
- Harjunpää, V., Teleman, A., Siika-Aho, M., Drakenberg, M. (1995). Kinetic and stereochemical studies of mannooglycosaccharide hydrolysis catalysed by β -mannanase from *Trichoderma reesei*. *Eur. J. Biochem.* 234: 278-283.
- Hernández-Santoyo, A., García-Hernández, E., Rodríguez-Romero, A. (1999). Celulosomas: sistema multienzimáticos. *Rev. Soc. Química Mex.* 43: 137-142.
- Hölker, U., Höfer, M., Lenz, J. (2004). Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64: 175-186.
- Jackson, M.G. (1977). The alkali treatment of straw. *Anim. Feed Sc. Technol.* 2: 105-130.
- Jeya, M., Thiagarajan, S., Gunasekaran, P. (2005). Improvement of xylanase production in solid-state fermentation by alkali tolerant *Aspergillus versicolor* MKU3. *Letters in Applied Microbiology* 41: 175–178.
- Jung, H., Deetz, A. (1993). Cell wall lignifications and degradability. En: H.G. Jung, D.R. Buxton, R.D. Hatfield and J. Ralph (Ed.) *Forage Cell Wall Structure and Digestibility*. 315-339. ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI.
- Jung, H., Allen, M. (1995). Characteristics of plant cell walls affecting intake and digestibility of forages by ruminants. *J. Anim. Sci.* 73: 2774-2790.
- Kamra, P., Satyanarayana, T. (2004). Xylanase production by the thermophilic mold *Humicola lanuginosa* in solid-state fermentation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 119: 145-157
- Kirk, T.K., Farrell, R.L. (1987). Enzymatic “combustion”: the microbial degradation of lignin. *Ann. Rev. Microbiol.* 41: 465-505.
- Klopfenstein, T.G., Krause, V., Jonnes, M.G., Woods, W. (1972). Chemical treatment of low quality roughages. *J. Anim. Sci.* 35: 418-422.
- Koutinas, A., Wang, R., Webb, C. (2003). Estimation of fungal growth in complex, heterogeneous culture. *Biochem. Eng. J.* 14: 93–100.

- Krishna, C., Chandrasekaran, M. (1995). Economic utilization of cabbage wastes through solid state fermentation by native microflora. *J. Food. Sci. Technol.* 32: 199-201.
- Krishna, C. (2005) Solid-state fermentation systems—An overview. *Crit. Rev. Biotechnol.* 25: 1–30.
- Lagunas, I. (2000). Optimización de la producción de β -mananasas por fermentación sólida del bagacillo del café, usando *Aspergillus niger* UAM-I, y su utilización como aditivo en alimentos balanceado. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Querétaro. México.
- Lagunas, I. (2004). Producción de extractos enzimáticos por fermentación sólida y su aplicación en alimentos balanceados para pollos de engorda. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Querétaro. México.
- Lee, Y., Chen, D., Chauvatcharin, S., Seki, S., Yoshida, T. (1995). Production of *Monascus* pigments by a solid-liquid state culture method. *J. Ferm. Bioeng.* 79: 516–518.
- Leonowicz, A., Matuszewska, A., Luterek, J., Ziegenhagen, D., Wojtaś-Wasilewska, M., Cho, N.S., Hofrichter, M. and Rogalski, J. (1999). Biodegradation of lignin by white rot fungi. *Fungal Genet. Biol.* 27: 175-185.
- Mabrouk, M., Ahwany, A. (2005). Production of β -mannanase by *Bacillus amylolequifaciens* 10A1 cultured on potato peles. *Afr. J. Biotechnol.* 7: 1123-1128.
- Manyuchi, M., Smith, T. (1994). Effect of treating or supplementing maize stover with urea on its utilization as feed for sheep and cattle. *Anim. Feed Sci. Technol.* 49(1): 1-23.
- McClery, B., Matheson, N., Small, D., (1976). Galactomannans and a galactoglucomannan in legume seed endosperms; structural requirements for β -mannanase hydrolysis. *Phytochem.* 15: 1111-1117.
- McNaughton, J., Hsiao, H., Anderson, D., Fodge, D. (1998). Corn/Soy/Fat diets for broilers, beta-mannanase, and improved feed conversion. *Poult. Sci.* 78: 119-121.
- Mendoza, M.G., Ricalde, V., Plata, P., León, V., Macías F. 2001. Utilización de subproductos agroindustriales en la alimentación de rumiantes. Universidad Autónoma de Chiapas. ISBN 968-7495-45-6. 205 p.
- Mitchell, D.A., Doelle, H.W., Greenfield, P.F. (1988). Agar plate growth studies of *Rhizopus oligosporus* and *Aspergillus oryzae* to determine their suitability for solid-state fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28: 598-602.

- Mitchell, D., Pandey, A., Sangurasak, P. and Krieger, N. (1999). Scale-up strategies for packed-bed bioreactors for solid-state fermentation. *Proc. Biochem.* 35: 167-178.
- Mitchell, D., Berovic, M., Krieger, N. (2000). *Biochemical Engineering Aspects of Solid State Bioprocessing.* *Adv. Biochem. Eng.* 68: 61-138.
- Nicholson, J. (1981). Nutrition and feeding aspects of the utilization of processed lignocellulosic waste materials by animals. *Agric. Environ.* 6: 205-228.
- Okafor, U., Okochi, V., Onyegeme, B., Nwodo, S. (2007). Xylanase production by *Aspergillus niger* ANL 301 using agro-wastes. *African J. Biotechnol.* 6: 1710-1714.
- Orduña, R., Lozano, R., Gutiérrez, F. (2002). Factores estructurales de la pared celular del forraje que afectan su digestibilidad. *Ciencia UANL, Universidad Autónoma de Nuevo León.* 5: 180-189.
- Ooi, T., Kikuchi, D. (1995). Purification and some properties of beta mannanase from *Bacillus sp.* *World J. Microbiol. Biotech.* 11: 310-314.
- Oostra, J., Tramper, J., Rinzema, A. (2000). Model based bioreactor selection for large-scale solid-state cultivation of *Coniothyrium minitans* spores on oats. *Enz. Microbiol. Technol.* 27: 652-663.
- Pandey, A., Soccol, C., Rodríguez-León, J., Nigam, P. (2001). *Solid-State Fermentation in Biotechnology. Fundamentals and Applications. History and development of solid-state fermentation.* Asiatech Publishers, New Delhi, 100-221.
- Pandey, A. (2003). Solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.* 13: 81-84.
- Park, Y., Kang, S., Lee, J., Hong, S., Kim, S. (2002). Xylanase production in solid state fermentation by *Aspergillus niger* mutant using statistical experimental designs. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58: 761-766
- Peña-Lillo, M., Pérez-Correa, R., Agosin, E., Latrille, E. (2001). Indirect measurement of water content in a aseptic solid substrate cultivation pilot-scale bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 72: 44-55.
- Plata, P., Mendoza, G., Bárcena-Gama, J., González, S. (1994). Effect of a yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on neutral detergent fiber digestion in steers fed oat straw based diets. *Anim. Feed Sci. Technol.* 49: 203-210.

- Ponce, M. (2002). Optimización de la producción de xilanasas por fermentación sólida del olote de maíz usando *Aspergillus niger* GS2. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Querétaro. México.
- Raimbault, M. (1998). General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electron. J. Biotechnol.* 1: 1-15.
- Rexen, F., Thomsen, K. (1976). The effect on digestibility of a new technique for alkali treatment of straw. *Anim. Feed Sci. Technol.* 1: 73-83.
- Roa, V., Bárcena-Gama, J., González, S., Mendoza, G., Ortega, M., García, C. (1997). Effect of fiber source and a yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on digestion and the environment in the rumen cattle. *Anim. Feed Sci. Technol.* 64: 327-336.
- Robinson, T., Nigam, P. (2003). Bioreactor design for protein enrichment of agricultural residues by solid state fermentation. *Biochem. Eng. J.* 13: 197–203.
- Rodríguez, S., Sanromán, M. (2005). Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. *Biochem. Eng. J.* 22: 211–219.
- Rovics, J., Ely, C. (1962). Response of beef cattle to enzyme supplement. *J. Anim. Sci.* 21: 1012.
- Rust, J., Jacobsen, N., McGillard, A., Hotchkiss, D. (1965). Supplementation of dairy calf diets with enzymes. II. Effect on nutrient utilization and on composition of rumen fluid. *J. Anim. Sci.* 24: 156-160.
- Samson, R., Pitt, J. (1990). Modern Concepts in *Penicillium* and *Aspergillus* Classification. Plenum Press. New York. 373-384.
- Sangsurasak, P., Mitchell, D. (1998). Validation of a model describing two-dimensional heat transfer during solid-state fermentation in packed bed bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.* 60: 739-749.
- Sato, K., Nagatani, M., Nakamuri, K.I., Sato, S. (1983). Growth estimation of *Candida lipolytica* from oxygen uptake in a solid state culture with forced aeration. *J. Ferm. Technol.* 61: 623-629.
- Sato, K., Sudo, S. (1999). Small scale solid state fermentations. In: *Manual Industrial Microbiology and Biotechnology* (2nd Edn). 61-79. Demian, A. Davies, J. Eds. ASM Press, Washington DC.

- Scotti, C., Vergoigan, C., Feron, G., Durand, A. (2001). Glucosamine measurement as indirect method for biomass estimation of *Cunninghamella elegans* grown in solid state cultivate conditions. *Biochem. Bioeng. J.* 7: 1-5.
- Sewalt, V., Fontenot, J., Allen, V., Glasser, W. (1995). Fiber composition and *in vitro* digestibility of corn stover fractions in response to ammonia treatment. *J. Agric. Food Chem.* 44: 3136-3142.
- Shah, A., Madamwar, D. (2005). Xylanase production under solid-state fermentation and its characterization by an isolated strain of *Aspergillus foetidus* in India. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 21: 233–243.
- Sinner, M., Puls, J. (1978). Non corrosive dye reagent for detection of reducing sugars in borate complex ion-exchange chromatography. *J. Chromatogr.* 156: 197-2004.
- Sjöström, E. (1993) *Wood Chemistry. Fundamentals and Applications*, 2nd edition, Academic Press, San Diego, CA, USA, 71-88.
- Stalbrand, H. (2003). Enzymology of endo-1,4- β -mannanase. En: *Handbook of Food Enzymology*. Editado por J.R. Whitaker, A.G.J. Voragen y D.W.S. Wong. Marcel Dekker, New York, US. 879-961.
- Stokes, M. (1992). Effect of an enzyme mixture, an inoculant, and their interaction on silage fermentation and dairy production. *J. Dairy Sci.* 75: 764-773.
- Suryanarayan, S. (2003) Current industrial practice in solid state fermentations for secondary metabolite production: the Biocon India Experience. *Biochem. Eng. J.* 13: 189–195.
- Sunna, A., Jürgen, P., Garabed, A. (1996). Purification and characterization of two thermostable endo-1-4-beta-xylanase from *thermotoga thermarum*. *Biotech. Appl. Biochem.* 24: 177-185).
- Sutton, J., Phipps, R., Beever, D., Humphries, D., Hartnell, G., Vicini, J., Hard, D. (2003). Effect of method of application of a fibrolytic enzyme product on digestive processes and milk production in holstein-friesian cows. *J. Dairy Sci.* 86:546–556.
- Tanaka, M., Robinson, C., Moo-Young, M. (1985). Chemical and enzymic pretreatment of corn stover to produce soluble fermentation substrates. *Biotechnol. Bioeng.* 27: 362-368.
- Thangamani, A., Raj, K., Rajendran, A., Gonasekaran, P. (2003). Inhibition of protease during fermentation improves xylanase production by alkali tolerant *Aspergillus fumigatus* AR1. *J. Biosci. Bioeng.* 96: 394-396.

- Tian-Hong, W., Ti, L. Zhi-Hong, W., Shi-Li, L., Yi, L., Yin-Bo, Q. (2004). Novel cellulase profile of *Tichoderma reesei* strains constructed by *cbh1* gene replacement with *eg3* gene expression cassette. *Biochim. Biophys. Acta.* 36: 667–672.
- Tipson, R., Horton, D. (1988). Aqueous, high-temperature transformation of carbohydrates relative to utilization of biomass. *Adv. Carbohydrate Chem. Biochem.* 46: 273-326.
- Van Soest, P., Robertson, J., Lewis, B. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74: 3583-3597.
- Villena, G., Gutiérrez-Correa, M. (2003). *Aspergillus niger* biofilms for cellulases production: Some structural and physiological aspects. *Rev. Peruv. Biol.* 10: 78-87.
- Weber, F., Tramper, J., Rinzema, A. (1999). A simplified material and energy balance approach for process development and scale-up of *Coniothyrium minutans* conidia production by solid-state cultivation in a packed-bed reactor. *Biotech. Bioeng.* 65: 447-458.
- Whitaker, J.R. (1994). *Principles of Enzymology for the Food Sciences.* 2a ed. Marcel Decker. New York. 271-299.
- Wong, K., Tan, L., Saddler, J. (1988). Multiplicity of beta-xylanase in microorganism functions and applications. *Microbiol. Rev.* 52: 305-317.
- Yang, W., Beauchemin, K., Rode, L. (1999). Effects of an enzyme feed additive on extent of digestion and milk production of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82: 391-403.
- Yang, W., Beauchemin, K., and Rode, L. (2000). A comparison of methods of adding fibrolytic enzymes to lactating cow diets. *Journal of Dairy Science.* 83: 2512-2520.
- Yescas-Yescas, R., Bárcena-Gama, G., Mendoza-Martínez, S., González-Muñoz, M., Cobos-Peralta, M., Ortega, M., (2004). *In situ* digestibility of corn stover or oat straw diets with fibrolytic enzymes. *Agrociencia* 38: 23-31.
- Zaman, M., Owen, E. (1995). The effect of calcium hydroxide and urea treatment of barley straw on chemical composition and digestibility in vitro. *Anim. Feed Sci. Technol.* 51: 165-171.
- Zakari, M., Ashiuchi, M., Yamamoto, S. (1998). Optimization for β -mannanase production of a Psychrophilic Bacterium, *flavobacterium* sp. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62: 655-660.

ANEXO I

Solución FDN

Agua destilada	18 L
Lauril sulfato de sodio	540 g
Ácido etilendiaminotetraacético	263 g
Hidróxido de sodio (NaOH), R.A.	72 g
Tetraborato de sodio •10 H ₂ O (Na ₂ B ₄ O ₇ •10H ₂ O)	122.6 g
Na ₂ HPO ₄ , Fosfato ácido de sodio	82.1 g
Etilenglicol monoetil éter, grado purificado	180 mL

ANEXO II

Solución FDA

Ácido sulfurico (H_2SO_4), R.A. 1 N	18 L
Bromuro de cetil trimetil amonio, ($C_{12}H_{42}NBr$),	360 g

ANEXO III

Suplemento de nutrientes

Factores	g L ⁻¹
Extracto de levadura	10
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.5
Glucosa	6
Na ₂ HPO ₄	3.4
MgSO ₄ •7H ₂ O	0.3
FeSO ₄ •7H ₂ O	0.1
KH ₂ PO ₄	2.4
ZnSO ₄ •7H ₂ O	0.1
CuSO ₄ •5H ₂ O	0.08

ANEXO IV

Diseño factorial fraccionado 2^{9-5}

Factores	Niveles (g L^{-1})	
	-1	1
Extracto de levadura	12	16
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2.5	4.5
Glucosa	6	9
Na_2HPO_4	3	4
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.3	0.7
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1	0.3
KH_2PO_4	2	4
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1	0.3
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.008	0.016

ANEXO V

Diseño Draper-Lin (1990), para 4 factores

Factores	Niveles (g L ⁻¹)				
	-1.68	-1	0	1	1.68
Extracto de levadura	12.5	13.5	15	16.5	17.5
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.25	1.75	2.5	3.25	3.75
Glucosa	7.5	8.125	9.0625	9.375	10.625
CuSO ₄	0.0138	0.0156	0.017	0.0187	0.02

ANEXO VI

Reactivo Sinner y Puls

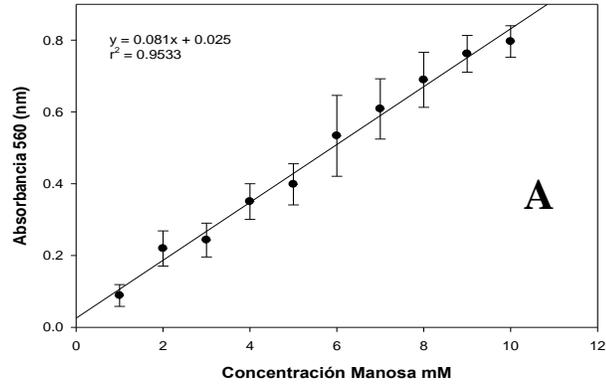
95.833 mL de solución A + 4.167 mL de solución B

Solución A (para 500 mL)	Solución B (para 25 mL)
0.65 g ácido bibinconínico	0.5 g ácido cítrico •H ₂ O
6.27 g carbonato de sodio •H ₂ O	0.1665 g sulfato de cobre •5H ₂ O

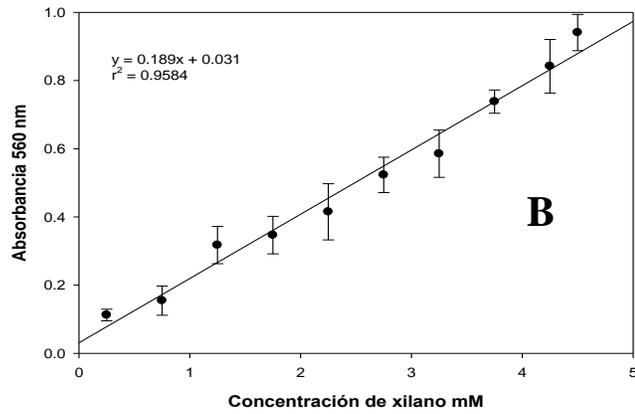
ANEXO VII

Curvas de calibración para determinar la actividad de mananasa (A), xilanasas (B) y celulasas (C).

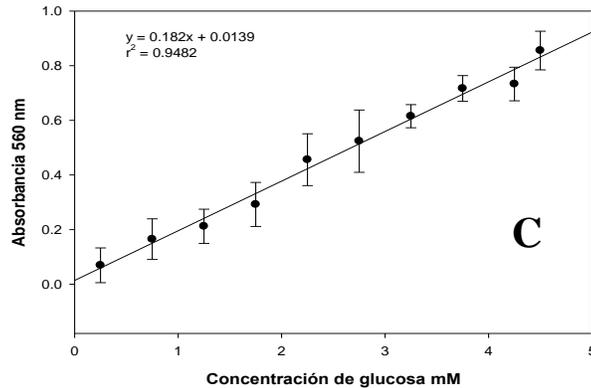
Curva Calibración Manosa



Curva Calibración Xilosa



Curva Calibración Glucosa



ANEXO VIII

Soluciones para Digestibilidad *in vitro*

Solución buffer A (g L ⁻¹)		Solución buffer B (g L ⁻¹)	
KH ₂ PO ₄ 10	10	Na ₂ CO ₃	15
MgSO ₄ •7H ₂ O	0.5	Na ₂ SO ₄ •9H ₂ O	1
NaCl	0.5		
CaCl ₂	0.1		
Urea	0.5		

ANEXO IX

Resultados obtenidos por el análisis estadístico mediante el programa estadístico

JMP 5.0

Analysis of Variance of Mannanase

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Model	15	409.06185	27.2708	97.2913
Error	32	8.96961	0.2803	Prob > F
C. Total	47	418.03146		<.0001

Analysis of Variance de Xylanase

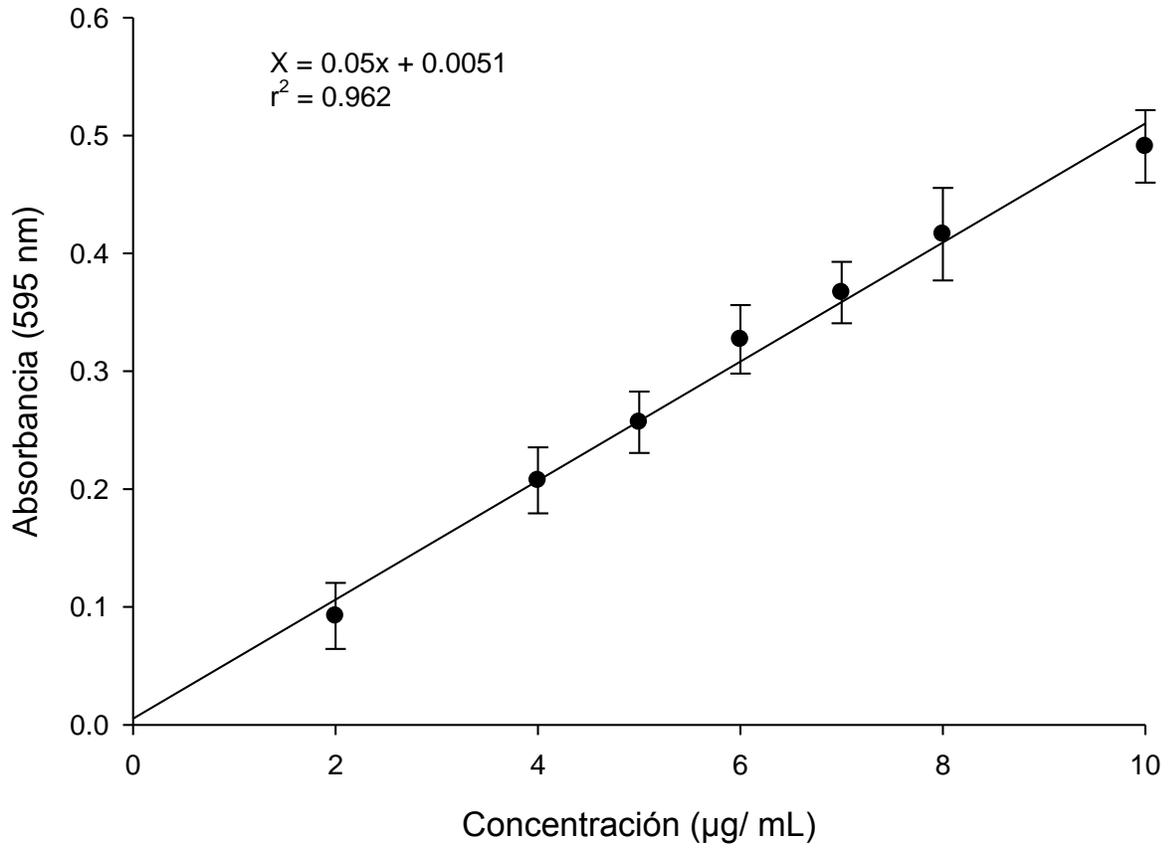
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Model	15	1100.3249	73.3550	34.3163
Error	32	68.4037	2.1376	Prob > F
C. Total	47	1168.7286		<.0001

Analysis of Variance de Cellulose

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Model	15	4633.4042	308.894	50.4343
Error	32	195.9897	6.125	Prob > F
C. Total	47	4829.3939		<.0001

ANEXO X

Curvas de calibración de proteína



ANEXO XI

Ecuaciones cuadráticas que representan la actividad de mananasa, xilanasa y celulasa

$$\begin{aligned} \text{Mananasa} = & -115.87 + 8.04*EL + 3.61*SA + 6.78*G - 33337.9*SC - 0.39*EL^2 - \\ & 3.10891*EL*SA - 0.46*EL*G + 1021.62*EL*SC - 6.79*SA^2 + 0.15*SA*G + 4474.61*SA*SC \\ & - 5.64*G^2 + 1876.4*G*SC - 347418.0*SC^2 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Xilanasa} = & 94.7536 + 13.55*EL - 10.78*AS + 61.9776*G - 54066.5*SC - 0.68*EL^2 - \\ & 2.32*EL*SA - 0.11*EL*G + 976.72*EL*SC - 8.03*SA^2 + 1.55*SA*G + 4296.57*SA*SC - \\ & 5.50*G^2 + 2188.9*G*SC + 205534.0*SC^2 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Celulasa} = & -946.56 + 62.95*EL - 31.31*SA + 81.73*G - 81227.3*SC - 1.18*EL^2 - \\ & 6.32*EL*SA - 5.0*EL*G + 2262.43*E*SC - 19.61*SA^2 + 2.27*SA*G + 12034.7*SA*SC - \\ & 17.38*G^2 + 5627.32*G*SC - 1.12E6*SC^2 \end{aligned}$$