

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA

DEGRADACION DE DESPERDICIOS LIGNOCELULOSICOS

POR Pleurotus ostreatus



MARIA ESTHER AVILES ESQUIVEL

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
(Orientación Tecnología de Alimentos)

1 9 8 0

M-21628



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

PRESIDENTE Prof. Lilia Vierna García

VOCAL Prof. Jorge Soto Soria

JURADO ASIGNADO
ORIGINALMENTE -
SEGUN EL TEMA.

SECRETARIO Prof. Eduardo Barzana García

1er. Suplente Prof. Ma. Dolores Lastra A.

2o. Suplente Prof. Salvador Badui Dergal

Sitio donde se desarrolló el tema: Instituto de Investigaciones Biomédicas, Dpto. de Biotecnología.

Sustentante: MARIA ESTHER AVILES ESQUIVEL

Asesor del tema: Eduardo Bárzana García

Supervisor técnico: Rodolfo Quintero Ramírez

Con agradecimiento a quienes siempre
me han brindado su ayuda.

Mis padres:

Julio Avilés González
Ma. del Socorro Esquivel de A.

y abuelos

Remigio Esquivel Avila
Mercedes V. de E.

A quien me ha orientado académicamente.

Dr. Rodolfo Quintero.

A quienes contribuyeron con un buen ambiente en el lugar de trabajo donde se desarrolló este tema.

Hilda Sandoval
Lidia Casas
Jorge Romero
Daniel Cerranco

A quienes contribuyeron con su asesoría.

Gpo. del Dr. Carlos Huitrón.

A quienes contribuyeron en los últimos
detalles de este trabajo.

Enrique Batres
Rosa Angélica Escobedo
Ma. de Jesús Rosiles de S.
Alicia Peláez

I N D I C E

	Pág.
A. INTRODUCCION	
I. Microbiología aplicada.	
I. 1. Microorganismos y fuentes de energía.	2
I. 2. Transformación de sustratos y producción de enzimas.	2
I. 3. Economía celular y sobreproducción.	3
II. Recursos celulósicos.	
II. 1. Abundancia de los recursos celulósicos.	3
II. 2. Explotación de los recursos celulósicos.	4
II. 3. Impedimentos para la completa explotación de los recursos celulósicos.	4
B. GENERALIDADES	
I. Componentes de los materiales lignocelulósicos.	
I. 1. Celulosa	
a) Estructura química de la celulosa.	7
b) Estructura de la celulosa en las fibras de materiales <u>celulósicos</u> .	7
c) Cristalinidad de la celulosa.	10
d) Distribución de la celulosa en las fibras.	10
I. 2. Hemicelulosa	
a) Estructura química de la hemicelulosa.	12
b) Distribución y estructura de la hemicelulosa en la fibra.	12
I. 3. Lignina	
a) Estructura química de la lignina.	12
b) Estructura y distribución de la lignina en las fibras.	14
I. 4. Otros componentes de los recursos celulósicos.	16
II. Degradación microbiana de los materiales celulósicos.	

II.	1.	Influencia de diferentes factores en la biodegradación de celulosa.	
	a)	Contenido de humedad de la fibra.	16
	b)	Tamaño y difusibilidad de la molécula reactiva con respecto al tamaño y propiedades de superficie de las microfibrillas y los espacios entre ellas.	16
	c)	Grado de cristalinidad.	16
	d)	Naturaleza de las sustancias a las que se encuentra asociada la celulosa.	17
	e)	Naturaleza, concentración y distribución de los grupos sustituyentes.	17
II.	2.	Impedimento por lignina.	
	a)	Relación lignina digestibilidad	17
II.	3.	Degradación microbiana de lignina.	
	a)	Microorganismos capaces de degradar lignina.	23
	b)	Reacciones de la degradación.	26
	c)	Bioquímica, genética y mecanismos biológicos involucrados en la degradación de lignina.	28
	d)	Experimentos en medio líquido con ligninas sintéticas marca--con ¹⁴ C y hongos white-rot para estudiar parámetros de cultivo que afectan la biodegradación.	34
III.		Pretratamientos físicos.	46
IV.		Experimentos con <u>Pleurotus ostreatus</u> y desperdicios agrícolas en medio sólido.	
	a)	Características de <u>Pleurotus ostreatus</u> .	48
	b)	Experimentos realizados con -- <u>Pleurotus ostreatus</u> .	48
V.		Conclusiones de la bibliografía consultada	53
		Ventajas	55
		Desventajas	55
C.		OBJETIVO	58

D.	METODOLOGIA	
I.	Crecimiento de <u>Pleurotus ostreatus</u> en cultivo sumergido con glucosa como fuente de carbono.	60
II.	Crecimiento de <u>Pleurotus ostreatus</u> en cultivo sumergido con bagacillo de caña delignificado como fuente de carbono.	60
III.	Crecimiento de <u>Pleurotus ostreatus</u> en cultivo sólido con cuatro sustratos lignocelulósicos diferentes como fuente de carbono.	60
IV.	Crecimiento de <u>Pleurotus ostreatus</u> (2I) durante 30 días en medio sólido con rastrojo de maíz y tres diferentes concentraciones de sulfato de amonio.	61
E.	METODOS Y MATERIALES	
1.-	Determinación de lignina	64
2.-	Determinación de nitrógeno total orgánico	65
3.-	Determinación de azúcares	68
4.-	Control del inóculo	72
5.-	Determinación de actividad celulolítica, -- método 3,5dinitrosalicílico .	73
6.-	Técnicas para determinar crecimiento y curvas de crecimiento de <u>Pleurotus ostreatus</u> .	75
F.	RESULTADOS	
I.	Crecimiento de <u>Pleurotus ostreatus</u> en cultivo sumergido con glucosa como fuente de carbono.	77
II.	Crecimiento de <u>Pleurotus ostreatus</u> en cultivo sumergido con bagacillo de caña delignificado como fuente de carbono.	80
III.	Crecimiento de <u>Pleurotus ostreatus</u> en cultivo sólido con cuatro sustratos lignocelulósicos diferentes como fuente de carbono.	82
IV.	Crecimiento de <u>Pleurotus ostreatus</u> en medio sólido con rastrojo de maíz y tres concentraciones diferentes de sulfato de amonio.	87
G.	DISCUSION	
I.	Crecimiento de <u>Pleurotus ostreatus</u> en cultivo sumergido con glucosa como fuente de carbono .	89
II.	Crecimiento de <u>Pleurotus ostreatus</u> en cultivo sumergido con bagacillo de caña delignificado como fuente de carbono.	99

III.	Crecimiento de <u>Pleurotus ostreatus</u> en cultivo sólido con cuatro sustratos lignocelulósicos diferentes como fuente de carbono.	101
IV.	Crecimiento de <u>Pleurotus ostreatus</u> en medio sólido con rastrojo de maíz y tres concentraciones diferentes de sulfato de amonio.	119
H.	CONCLUSIONES	122
I.	APENDICE	125
	BIBLIOGRAFIA	131

A. INTRODUCCION.

I. MICROBIOLOGIA APLICADA

La aplicación de la Microbiología ha significado un beneficio para la humanidad; esto se puede ver reflejado en la industria alimentaria, química, agrícola, farmacéutica, textil, papelera, etc., (1). Actualmente muchos de los procesos microbiológicos se llevan a cabo empíricamente debido a la falta de conocimientos acerca de los microorganismos y su interacción con el medio ambiente. Realmente, cualquier proceso microbiológico que se lleve a cabo empíricamente, tendría una gran mejoría si se realizara con base a conocimiento; un ejemplo lo tenemos en la obtención de Penicilina, proceso que se ha optimizado logrando aumentar considerablemente la producción (2).

I. 1.- MICROORGANISMOS Y FUENTES DE ENERGIA

Existe una gran variedad de microorganismos en la naturaleza, desde bacterias hasta hongos superiores, y se encuentran distribuidos en zonas según las condiciones de hábitat y su capacidad para crecer en ellas.

Es indispensable para los microorganismos disponer siempre de una fuente de carbono y energía para su sobrevivencia.

Las sustancias que los microorganismos pueden usar como fuente de carbono y energía son los carbohidratos, lípidos, alcoholes, hidrocarburos y CO_2 (3). Entre los microorganismos hay una gran diversidad en cuanto a su capacidad para utilizar determinada fuente de carbono y energía, así como para sintetizar una u otra sustancia ó para sobrevivir en condiciones aeróbicas y/o anaeróbicas ó a una determinada temperatura, de ahí su distribución en la naturaleza.

I. 2.- TRANSFORMACION DE SUSTRATOS Y PRODUCCION DE ENZIMAS

Para que los microorganismos puedan obtener energía de los sustratos es necesario que los transformen y algunas veces dependiendo de las condiciones del medio ambiente, excretan los sustratos transformados como es el caso en la producción de etanol, ácido acético, ácido cítrico, etc. En otras ocasiones los microorganismos transforman sustancias y producen metabolitos secundarios cuya función no se conoce aún.

La mayoría de las reacciones que ocurren dentro de los microorganismos y que dan lugar a la transformación de los sustratos

requieren de catalizadores. Estos catalizadores son las enzimas -- que ellos mismos sintetizan y actúan intracelular o extracelularmente. Las enzimas son específicas para cada reacción de tal modo que un microorganismo podrá transformar un determinado sustrato dependiendo de sí cuenta ó no con las enzimas necesarias para hacerlo.

I. 3.- ECONOMIA CELULAR Y SOBREPDUCCION

Se conoce que los microorganismos, al igual que todo ser -- vivo, se comportan según las condiciones del medio ambiente de -- acuerdo a sus propias características genéticas.

Los microorganismos cuentan con mecanismos regulatorios - (5), que controlan su metabolismo, de tal modo que gastarán únicamente la energía necesaria para sintetizar y degradar las sustancias que requieren y en la cantidad que las necesitan, es por esto que normalmente no sobreproducirán alcohol, ácido cítrico, enzimas, antibióticos, gas metano, gomas, etc., ni tampoco degradarán una fuente de energía que requiere mayor gasto de la misma para ser aprovechada, cuando se encuentran presentes otras fuentes más fáciles de degradar. En general, cuando se requiere producir algún metabolito ó enzima a escala industrial, se hace trabajar al microorganismo en contra de su propia economía.

II. RECURSOS CELULOSICOS

La celulosa es un polímero compuesto por unidades de glucosa unidas por enlaces 1-4 (7), por tanto es una fuente de energía y de carbono, pero sólo los microorganismos que cuentan con celulasas son capaces de hidrolizar este tipo de enlace.

II. 1.- ABUNDANCIA DE LOS RECURSOS CELULOSICOS

La celulosa se encuentra clasificada como el biopolímero más abundante sobre la Tierra. Se ha calculado que entre 10^{10} y 10^{11} ton/año de celulosa se degradan y sintetizan (17), y esto no debe extrañar, pues es el componente que da consistencia a los vegetales (8). Los animales y el hombre consumen diariamente vegetales, pues le son indispensables, pero solamente los rumiantes son capaces de aprovechar la celulosa y esto gracias a los microorganismos que habitan en el rumen (9), siendo sin embargo este aprovechamiento de sólo 30 a 50% (10). Obviamente los rumiantes que existen en el mundo no serían capaces de consumir toda la celulosa que existe como desperdicios agrícolas, basuras urbanas, pastos, hojas secas, desperdicios de la industria alimentaria y de la industria papelera.

II. 2.- EXPLOTACION DE LOS RECURSOS CELULOSICOS

a) Métodos químicos

Los desperdicios celulósicos pueden retornar a la tierra donde son biodegradados completándose así el ciclo del carbono, en - - otras ocasiones se usan como combustible (11), o simplemente se - queman como en el caso de pajas y basuras urbanas. Se usan para fabricar papel, derivados de celulosa se emplean para fabricar explosivos, aditivos de alimentos, sustancias útiles en laboratorios, - etc. Todos los productos mencionados anteriormente en la actualidad se obtienen de acuerdo a procesos bien establecidos que se llevan a cabo a escala industrial (12).

b) Métodos microbiológicos

Existen microorganismos capaces de degradar celulosa en dos diferentes condiciones: aeróbica y anaeróticamente. Al primer grupo pertenecen los microorganismos formadores de humus, existentes en los suelos (13), al segundo pertenecen las bacterias que habitan en el rumen. Ambos casos han sido estudiados en diferentes - sistemas en el laboratorio (14), ya sea con fines científicos ó prácticos. Cowling y Kirk (15), opinan:

"Todo lo que nosotros hemos trabajado para entender la degradación enzimática de celulosa y materiales lignocelulósicos ha - sido estimulado por la perspectiva de que nuestros experimentos - puedan contribuir al desarrollo de procesos de conversión a gran - escala que puedan beneficiar a la especie humana en forma sustancial. Todos nosotros hemos soñado con producir en abundancia alimentos, combustible, productos químicos de la celulosa que se encuentra en basuras urbanas, desperdicios forestales, agrícolas y de los procesos de alimentos....."

II. 3.- IMPEDIMENTOS PARA LA COMPLETA EXPLOTACION DE LOS RECURSOS CELULOSICOS POR METODOS -- MICROBIOLÓGICOS

Existen dos principales razones por las cuales la celulosa - que se encuentra en los desperdicios no puede ser utilizada con eficiencia por microorganismos. La primera razón se debe a que la celulosa en la naturaleza se encuentra asociada con la lignina que es un biopolímero aromático no degradable por la mayoría de los - microorganismos, por tanto funciona como una barrera protectora - contra el ataque microbiano.

No se conoce aún exactamente el tipo de enlace que existe -

entre la lignina y la celulosa.

El segundo impedimento es la celulosa cristalina, estas moléculas se encuentran altamente orientadas y no son modificables por enzimas; no se conoce a fondo la razón de este fenómeno, se piensa que quizá se deba a la rigidez de estas estructuras la cual impide se acoplen en el sitio activo de las enzimas.

Una de las funciones de la lignina es proteger al vegetal contra el ataque microbiano, sin embargo existen microorganismos capaces de degradar lignina al igual que celulosa, siendo este hecho una ventaja y una desventaja a la vez. Es una desventaja porque la industria maderera necesita usar conservadores para proteger su materia prima contra estos microorganismos, pero desde el punto de vista utilización de celulosa es una ventaja puesto que podemos pensar en un proceso microbiano para delignificar materiales lignocelulósicos que, como se mencionará más adelante, puede ofrecer ventajas sobre los métodos químicos de eliminación de lignina ya existentes. Este proceso no se ha desarrollado en gran parte por falta de conocimientos acerca de este tipo de microorganismos y de su relación con el medio ambiente.

Considerando de suma importancia el superar las barreras que impiden la eficiente utilización de la celulosa se ha elegido como tema de este trabajo, la investigación de un proceso microbiano de delignificación.

B. GENERALIDADES.

I. COMPONENTES DE LOS MATERIALES LIGNOCELULOSICOS

Los materiales lignocelulósicos están formados principalmente por celulosa, lignina y hemicelulosa (16). En menor cantidad -- pueden existir otros componentes como son: ceras, grasas, aceites esenciales, taninos, resinas, ácidos grasos, almidón, azúcares solubles, glicoproteínas y compuestos minerales, los cuales no son - comunes a todos los materiales lignocelulósicos.

I. 1.- CELULOSA

La celulosa es el componente, relativamente, más abundante en los vegetales.

a) Estructura química de la celulosa.

La celulosa es un polímero de cadenas lineales constituidas por unidades de glucopiranosas unidas por enlaces β 1-4 (8), Fig. 1. La molécula de celulosa puede poseer un grado de polimerización mayor a 3000, lo cual origina un peso molecular que excede a - - 500000.

La fibra de celulosa está formada por haces de estas cade-- nas empaçadas una al lado de otra y orientadas siguiendo el eje lon-- gitudinal de la fibra.

b) Estructura de la celulosa en las fibras de materiales celu-- lósicos.

La celulosa es el componente más abundante de la pared celular de los vegetales, su proporción varía según la edad y tipo de célula (18). En el algodón no hay material intercelular por tanto la celulosa representa un 90% del material y las fibras se forman independientemente sin sustancias intercelulares Fig. 2 (15).

En la madera la pared celular esta formada en un 45% por celulosa; las fibras se encuentran en una estructura tridimensional de gran cohesión cuya integridad esta asegurada por sustancias intercelulares de las cuales la lignina es el mayor constituyente (15).

En el siguiente esquema se presenta la anatomía de una an-- giosperma típica Liquidambar Styraciflus (15) Fig. 3 .

En estos materiales, algodón y madera, las fibras tienen una pared primaria que rodea la pared secundaria. La pared secundaria consiste de tres capas llamadas S_1 , S_2 y S_3 (18) (15).

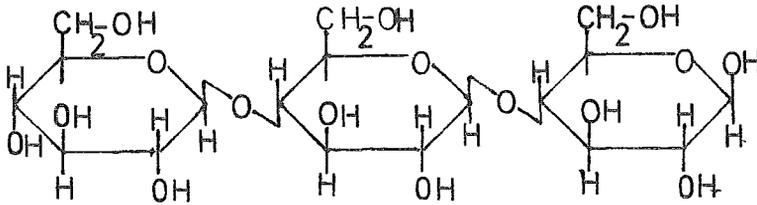


Fig. 1. - Estructura química de la celulosa (7).

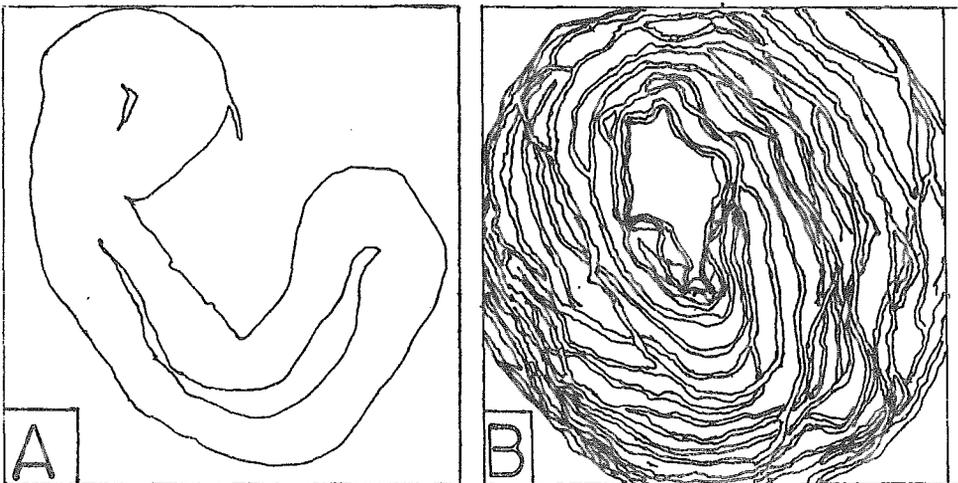


Fig. 2. - Estructura de las fibras de algodón:
 (15) A) Sección transversal de una fibra, B) Pared celular expandida, donde se muestran separadas las capas de crecimiento concéntrico en la pared secundaria. (no se reporta am---plificación).

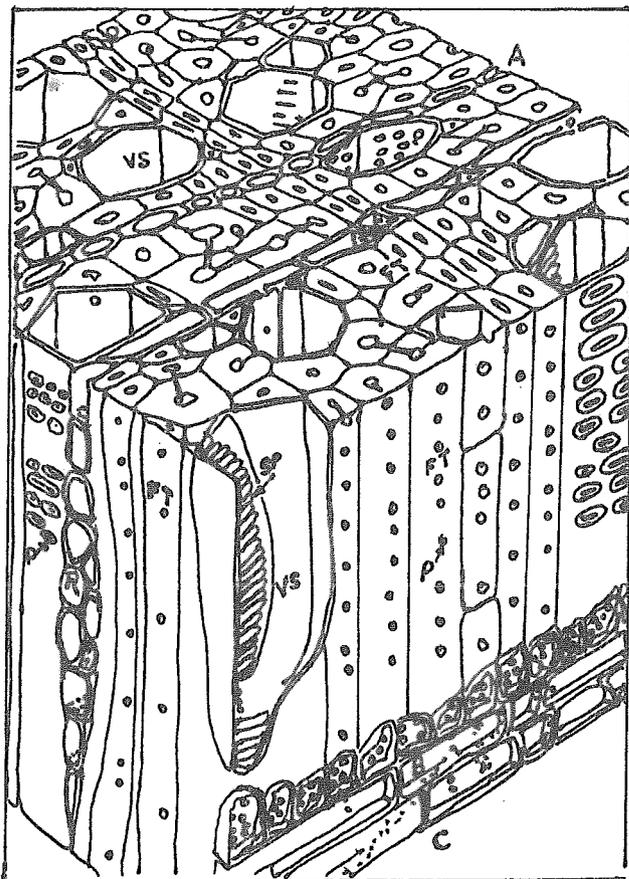


Fig. 3. - Anatomía de una angiosperma típica Liquidambar styraciflua. - En esta - figura cada tipo de célula esta repre - sentada en una sección transversal A tangencial B, radial C; pared de las células traqueidas FT, segmentos -- vasculares vs, células radiales R, es - clereidas SP, y pares de puntuacio--- nes P, entre células adyacentes que permiten el flujo de fluídos entre una célula y otra (15).

La capa S_2 es de grosor variable pero generalmente forma el mayor volumen de las sustancias de pared celular Fig. 4.

Las moléculas de celulosa en la capa S_1 y S_3 tienen una orientación que varía entre la transversal y la espiral, siendo las espiras de poca inclinación, y en la capa S_2 la orientación fibrilar fluctúa entre la longitudinal y la espiral relativamente escarpada. En la fibra de algodón la mayor parte de la membrana secundaria consta de microfibrillas orientadas en ángulo de 45 grados ó menos con respecto al eje longitudinal de la fibra (18).

En el caso de la madera existen sustancias intercelulares -- Fig. 4, a las cuales también se les da el nombre de lámina media.

c) Cristalinidad de la celulosa.

La celulosa y otros constituyentes de la pared celular se encuentran agregados en largos y finos envoltorios llamados microfibrillas. Dentro de cada microfibrilla las moléculas lineales de celulosa están unidas lateralmente por puentes de hidrógeno y están asociadas en varios grados de paralelismo. Regiones que contienen moléculas altamente orientadas se llaman cristalinas y las menos orientadas son llamadas paracristalinas ó amorfas (15).

La celulosa cristalina ha despertado interés debido a la resistencia que muestra a la hidrólisis enzimática; no se sabe exactamente a que se debe esta resistencia.

La celulosa se puede encontrar en cuatro estructuras cristalinas (17), designadas celulosa I, II, III y IV. La celulosa I son los cristales de material celulósico nativo.

Celulosa II, es la regenerada, filamentos viscosos, celofán y algodón mercerizado. Las celulosas III y IV se forman por tratamientos con etilen-amina anhidra y altas temperaturas. También existe clasificación en celulosa α , β , y γ (21), donde α celulosa es la porción insoluble en hidróxido de sodio al 9.45%, β celulosa es la porción soluble que es precipitada por acidificación de la solución y γ celulosa la fracción que permanece en la solución.

d) Distribución de la celulosa en las fibras.

En el algodón las fibras de la pared secundaria están constituidas por celulosa altamente cristalina, hemicelulosa y otros materiales se encuentran en la cutícula y en la pared primaria. En la madera los materiales no celulósicos se depositan en todas las regioes

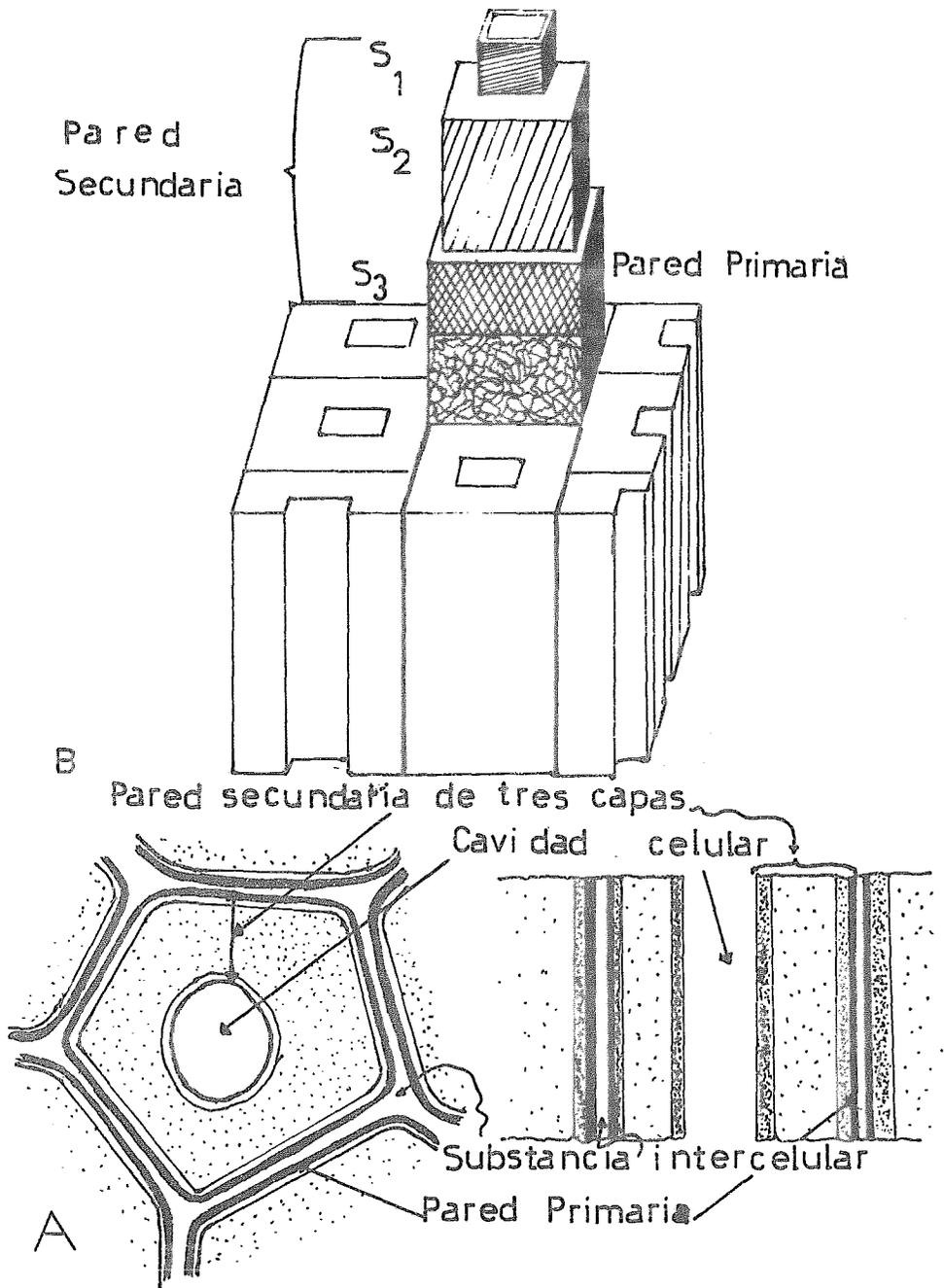


Fig. 4.- A) Esquema mostrando las diferentes capas de la pared celular (18), B) -- Esquema mostrando la orientación de las microfibrillas de la pared celular.

nes de la pared celular. La celulosa está en concentraciones mayores en la pared secundaria y disminuye hacia la lámina media.

I. 2. - HEMICELULOSA

La hemicelulosa es el componente del material lignocelulósico más fácilmente degradable.

a) Estructura química de la hemicelulosa.

En el caso del algodón la hemicelulosa son sustancias pécticas; en la madera consiste en cadenas relativamente cortas, principalmente ramificadas, heteropolímeros de glucosa, xilosa, galactosa, manosa y arabinosa, así como de ácidos urónicos de glucosa y galactosa unidos por enlaces 1-3, 1-6 y 1-4. El grado de polimerización de las hemicelulosas rara vez excede a 200. Un número apreciable de grupos acetilo están presentes como sustituyentes particularmente en las glicomananas de gimnospermas y las xilanas de angiospermas (15).

b) Distribución y estructura de la hemicelulosa en la fibra.

La estructura de la hemicelulosa en las fibras no ha sido aún determinada porque no se ha encontrado un método para remover celulosa y lignina para obtener así un esqueleto de hemicelulosa (15).

La hemicelulosa se encuentra en mayor concentración en la lámina media y decrece su concentración hacia el lumen, encontrándose junto a la lignina rodeando la celulosa.

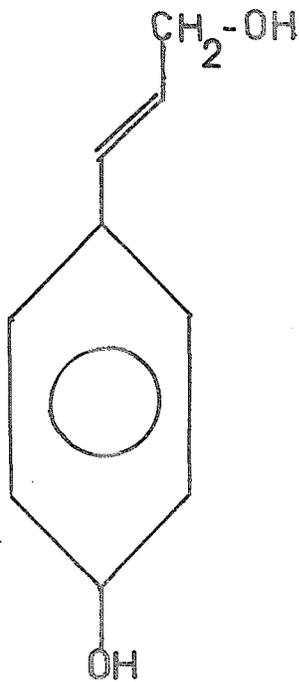
I. 3. - LIGNINA

La lignina es la última sustancia que se forma en las plantas, por esto se ha clasificado como sustancia incrustante.

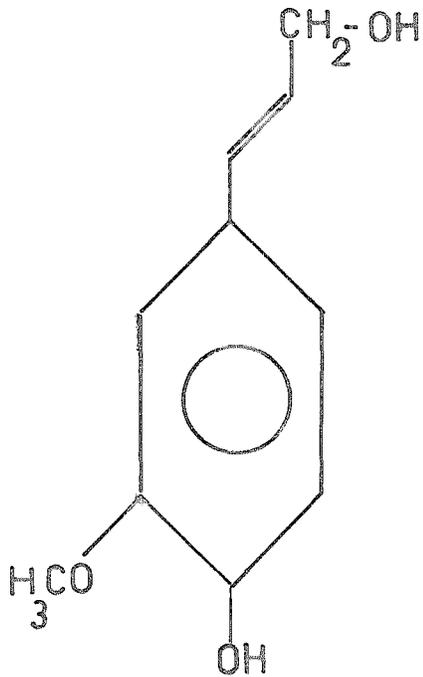
a) Estructura química de la lignina.

La lignina es un polímero aromático tridimensional (19), formado por polimerización oxidativa de tres alcoholes cinamílicos sustituidos Fig. 5.

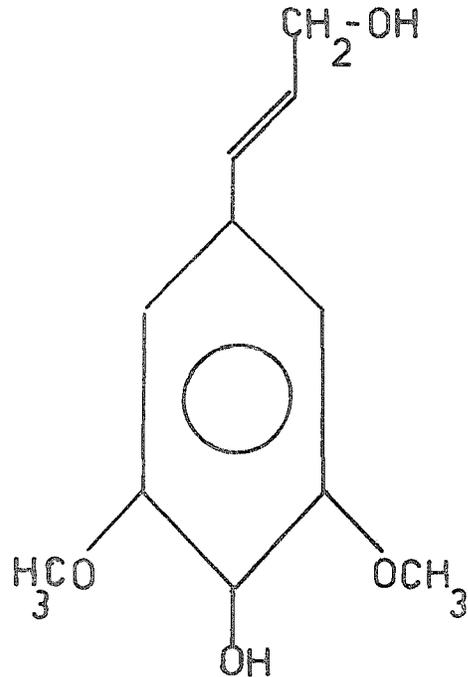
La proporción de cada uno de estos alcoholes varía en los vegetales con el origen filogenético. Las ligninas coníferas están constituidas principalmente por alcohol coniferílico, (unidades 1, 4, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15 y 16, Fig. 6), en pequeña cantidad por alcohol sinápico (unidad 3); ligninas de angiospermas están constituidas - por igual cantidad de alcohol coniferílico y sinápico, y por menor --



Alcohol p-cumárico



Alcohol coniferílico



Alcohol sinápico

Fig. 5. - Alcoholes cinamílicos que forman la lignina.

cantidad de alcohol p-cumárico; mientras que ligninas de plantas gramíneas tienen cantidades sustanciales de los tres alcoholes aunque predomina el alcohol sinápico (19). Dado un microorganismo, estas diferencias estructurales pueden influir en que éste degrade la lignina con mayor ó menor velocidad y en la composición de los productos finales.

Con el objeto de elucidar la estructura química de la lignina, se han hecho una serie de estudios, el fruto de los cuales se resume en una fórmula estructural (19), Fig. 6, ésta es sólo un esquema ya que en ella se encuentran representados en forma cuantitativa los diferentes tipos de enlaces y monómeros encontrados, pero esto no significa que tal sea la estructura real.

Se observan tres principales tipos de enlace entre los monómeros de lignina que son:

- Tipo β - aril-glicerol-aril éter entre las unidades 1 y 2, 3 y 4, 7 y 8 y 10, 10 y 11, que enlazan el 60% de unidades en el caso de ligninas de abedul y 40% en abeto.

- Tipo bifenilo entre 8 y 9, 14 y 16, que pueden unir 25% de unidades en caso del abeto y 10% en abedul.

- Tipo fenilcumarona entre 6 y 7, enlazan el 20% de unidades en abeto y 10% en abedul.

Otros enlaces de menor importancia cuantitativa son:

- Tipo di-aril éter entre 11 y 13

- Tipo pino-resinol entre 13 y 14

- Tipo bencil-éter entre 3 y 6

Existen otros enlaces de menor importancia que no están representados en la Fig. 6.

El análisis de lignina nativa de bagazo de caña revela que se trata de una lignina formada principalmente por unidades de alcohol coniferílico y alcohol sinápico (20).

b) Estructura y distribución de la lignina en las fibras.

La lignina en las fibras se encuentra en un estado estructural amorfo (22). La concentración de la lignina es mayor en la lámina media decreciendo hacia el lumen. La lignina forma una ma-

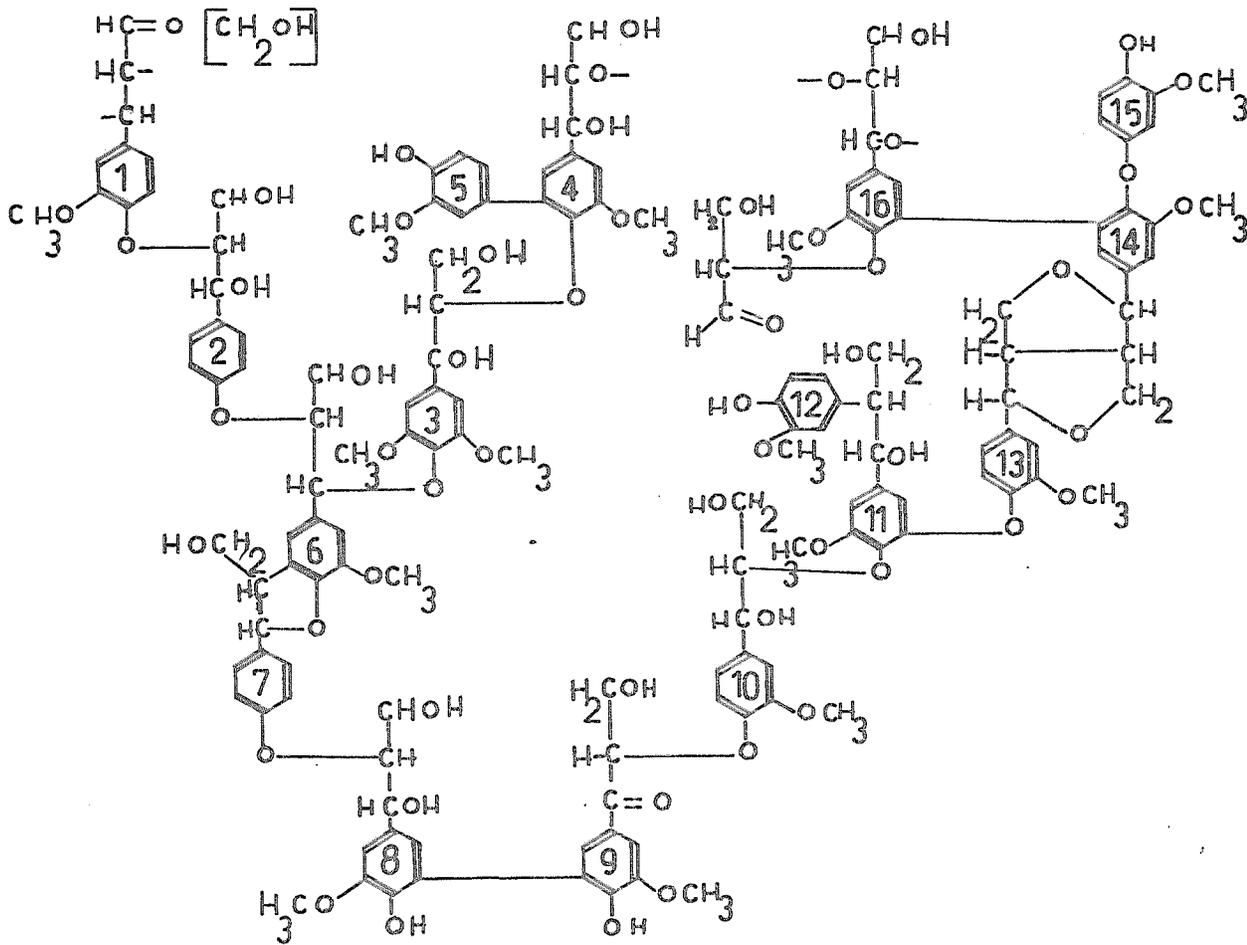


Fig. 6. - Fórmula de una lignina de conifera.

triz que rodea la celulosa, en una microfibrilla la lignina puede -- penetrar los espacios entre las moléculas de celulosa en las regiones amorfas.

I. 4. - OTROS COMPONENTES DE LOS RECURSOS CELULOSICOS.

Estos componentes existen en cantidades muy variable en los recursos celulósicos. En la madera son: ceras, grasas, azúcares solubles y varios constituyentes citoplásmicos. Los constituyentes minerales del algodón y de la madera incluyen todos los elementos inorgánicos necesarios para el crecimiento de plantas y microorganismos degradadores de fibras.

II. DEGRADACION MICROBIANA DE LOS MATERIALES CELULOSICOS.

Las diferentes características físicas y químicas de los materiales lignocelulósicos influyen en su biodegradación.

II. 1. - INFLUENCIA DE DIFERENTES FACTORES EN LA BIODEGRADACION DE CELULOSA.

Los materiales lignocelulósicos son susceptibles a la biodegradación en diferentes grados, estas diferencias están dadas en gran parte por los siguientes factores (22):

a) Contenido de humedad de la fibra.

La humedad dilata la celulosa por hidratación, de tal manera que se abre la estructura y el sustrato se hace más accesible a las enzimas celulolíticas. Además el agua sirve para añadirse a la celulosa en cada rompimiento hidrolítico de enlaces glucosídicos.

b) Tamaño y difusibilidad de la molécula reactiva con respecto al tamaño y propiedades de superficie de las microfibrillas y los espacios entre ellas.

Se tendrán mayores velocidades de reacción si los reactivos celulolíticos pueden penetrar los capilares de las paredes celulares.

c) Grado de cristalinidad.

Las enzimas celulolíticas degradan fácilmente celulosa amorfa, pero no atacan material cristalino.

Se ha sugerido que esta resistencia no se debe tanto a la --

inaccesibilidad de la celulosa cristalina a las enzimas sino a la rigidez de las unidades de anhidroglucosa en la región cristalina. En esta región la glucosa tiene forma de silla y se observan unidades alternada de glucopiranos orientadas en direcciones opuestas (22).

- d) Naturaleza de las sustancias a las que se encuentra asociada la celulosa.

Si la celulosa esta asociada a poca lignina y además a vitaminas y minerales en bajas concentraciones, habrá una mejor degradación. Pero si se encuentra asociada a sustancias tóxicas, altas concentraciones de minerales y mucha lignina, habrá poca degradación.

- e) Naturaleza, concentración y distribución de los grupos sustituyentes.

La susceptibilidad de los derivados sustituidos de la celulosa a hidrólisis enzimática, aumenta conforme aumenta su solubilidad en agua, pero después del punto de completa solubilidad (0.5 - 0.7 DP, ver apéndice No. 1), decrece hasta llegar a completa inmunidad (1.0 DP) (22).

II. 2. - IMPEDIMENTO POR LIGNINA.

La lignina es una barrera que impide la utilización de los materiales lignocelulósicos por microorganismos. Este fenómeno ocasiona que dichos materiales sean más digeribles a medida que el contenido de lignina decrece.

- a) Relación lignina digestibilidad.

Se han llevado a cabo varios estudios sugiriendo que la lignina es un impedimento al ataque completo y eficiente de las enzimas celolíticas (23), (24), (25). En estos experimentos diferentes pretratamientos ya sean químicos o microbiológicos se aplican a diferentes materiales lignocelulósicos con el fin de delignificarlos y probar el efecto de la eliminación de lignina en la digestibilidad de éstos. El contenido de lignina se mide con el método de Klason -- modificado, que se basa en obtener lignina insoluble en ácido sulfúrico al 72%. La digestibilidad se mide in vitro con líquido ruminal (26). Con diferentes maderas y por medio del proceso Kraft, se obtuvieron pulpas con diferentes contenidos de lignina Cuadro 1 (23). Estos resultados al graficarse nos dan la Fig. 7 (23), donde se observa que las fibras con mayor contenido de lignina necesitan ser delignificadas en mayor grado para alcanzar los mismos por--

DIGESTIBILIDAD DE PULPAS DE MADERA

Cuadro 1.- Preparación, composición y digestibilidad de pulpas obtenidas por el proceso Kraft (23).

Tiempo Min.	Temperatura °C	Alcali activo %	Producción %	Lignina Klason %	Carbohidratos %	Delignificación %	Digestibilidad in vitro %
Roble rojo							
-	-	-	100	22.8	65.5	0	12
0	140	8.8	79.7	22.4	73.1	21.6	45
0	140	20	73.1	22.2	73.6	28.9	48
0	160	10.5	74.0	20.2	77.0	34.5	61
30	140	20	65.6	15.7	80.6	54.7	77
0	170	13.1	62.2	13.4	87.2	63.4	78
60	140	20	60.2	12.5	87.0	68.6	82
90	140	20	56.1	9.5	91.8	76.7	80
30	170	13.1	51.2	1.6	96.5	96.5	90
Abeto rojo							
-	-	-	100	31.5	64.9	0	0
0	140	16.0	78.2	29.8	66.5	25.9	0
15	140	16.0	71.8	29.1	68.6	33.4	0
30	140	16.0	69.4	28.1	70.5	37.9	1
0	160	16.0	68.4	27.4	70.4	40.4	1
0	165	16.0	67.7	26.4	73.3	43.3	1.5
60	140	16.0	65.9	25.9	73.5	45.7	3
20	165	16.0	60.2	20.7	79.6	60.5	29
60	165	16.0	51.4	11.6	90.1	81.1	73
130	165	16.0	44.9	6.3	95.7	91.0	84
Pino rojo							
-	-	-	100	27.3	68.3	0	0
0	140	25	79.3	27.4	71.7	20.3	3
0	165	25	73.1	24.4	75.1	34.6	15
10	165	25	66.8	20.4	80.4	50.3	40
20	165	25	64.9	19.2	81.8	54.4	45
60	165	25	55.7	11.3	91.6	77.0	68
90	165	25	52.6	6.5	96.1	87.4	80
110	165	25	50.0	5.7	97.1	89.6	90
130	165	25	48.5	3.9	98.8	93.0	88
Abedul							
-	-	-	100	19.8	60.8	0	15
0	110	20	80.7	21.7	71.5	11.6	56
0	140	25	79.1	20.4	73.1	18.5	48
120	110	20	68.5	22.4	73.0	22.5	56
120	110	25	71.1	21.4	73.9	23.1	59
600	110	20	68.3	20.1	74.5	30.7	80
10	170	20	64.3	12.2	88.1	60.4	76
22	170	20	51.8	6.2	94.4	83.8	80
30	170	20	52.7	5.6	96.2	85.1	83
70	170	20	46.7	1.2	101.8	97.1	90
30	170	25	44.7	1.1	101.3	97.5	88
60	170	25	42.4	0.7	102.1	98.6	89
120	170	25	39.5	0.9	102.1	98.3	88

Sulfidez fue de 20.8% para abeto rojo y de 25% para las otras especies (ver apéndice, punto 3).

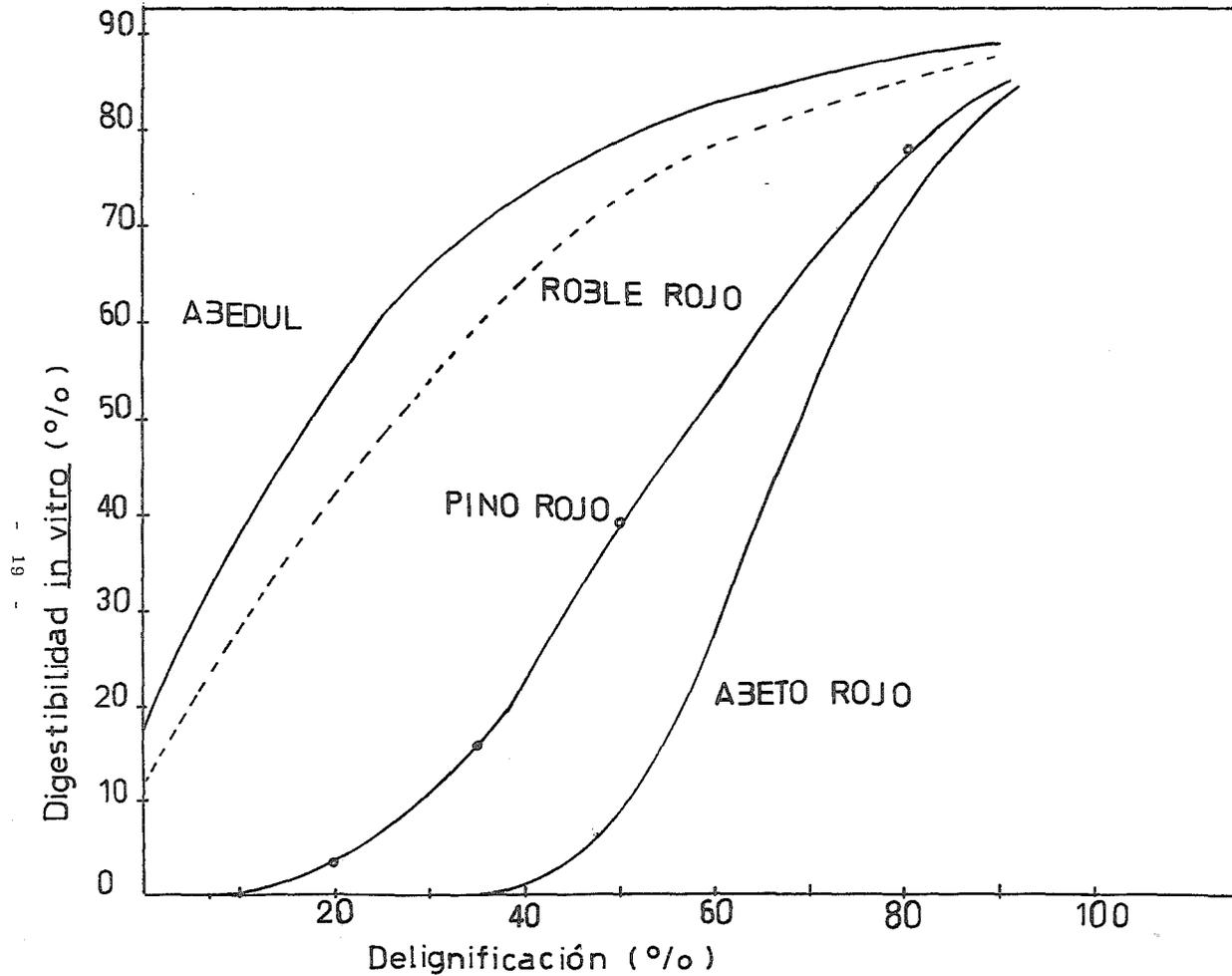


Fig. 7.- Relación entre digestibilidad in vitro y porcentaje de delignificación de pulpas de cuatro especies de maderas obtenidas por el proceso - Kraft (23).

centajes de digestibilidad, así el abedul que contiene 19.8% de lignina y el roble rojo que contiene 22.8% de lignina necesitan ser delignificados en 7-10% para alcanzar una digestibilidad de 30% mientras que el pino rojo y el abeto rojo que contienen 27.3% y 31.5% de lignina, respectivamente, necesitan ser delignificados en 40% y 60%, respectivamente, para alcanzar la misma digestibilidad. También se observa, Fig. 7, que para los materiales de bajo contenido original de lignina, al alcanzarse altos grados de delignificación 60-80%, la digestibilidad ya no aumenta con la delignificación, sino se mantiene casi constante; en cambio, cuando los materiales tienen alto contenido de lignina la digestibilidad en 60-80% de delignificación sigue aumentando hasta alcanzar 90% de digestibilidad al delignificar en un 100%.

En el Cuadro 1, podemos observar que son necesarias, para alcanzar una delignificación de 60% aproximadamente, condiciones de temperatura de 170°C durante 1-10 min., por las cuales se alcanza una digestibilidad aceptable de 70-80%, habiendo pérdidas de 30-40% en maderas duras. Para las maderas suaves se alcanzan digestibilidades de 70-80%, lo cual implica condiciones de 65°C durante 60 min., habiendo pérdidas del 45-50%.

Cuando las maderas se tratan por otros métodos, podemos observar la misma relación de % de delignificación a digestibilidad, Fig. 8.

También se han llevado a cabo pruebas de digestibilidad en materiales diferentes a las maderas, como es el caso de bagacillo de caña (24), el cual fue tratado por diferentes pretratamientos obteniéndose los resultados mostrados en el Cuadro 2. En este caso también se observa que la digestibilidad aumenta cuando el porcentaje de lignina disminuye. Sin embargo los datos deben interpretarse en forma cuidadosa, pues la digestibilidad aumenta con el grado de delignificación y no con el porcentaje de lignina en sí de una muestra dada, ya que éste puede variar por pérdidas de carbohidratos, principalmente hemicelulosa y azúcares reductores solubles, debido al pretratamiento. Así observamos en el Cuadro 2, que para los datos de bagacillo sin moler, una muestra tiene 15.45% de lignina con una digestibilidad de 60.7% y cuando tiene 14% de lignina, la digestibilidad es de 52.3%. En este artículo no se reportan pérdidas de material.

Podemos observar que el bagacillo molido presenta mayor digestibilidad que el bagacillo sin moler, 23.6% y 22% respectivamente, pero este efecto sólo se observa cuando no se delignifica. Si comparamos los datos de bagacillo sin moler con los de bagacillo molido vemos que no son más efectivos los métodos de deligni-

Cuadro 2.- Efecto de la delignificación en la digestibilidad in vitro de bagacillo de caña (24).

Tratamiento	Tiempo de Calentamiento h ^{a/}	Lignina % ^{d/}	Digestibilidad %
Bagacillo sin moler			
Ninguno	0	27.5(±.26) ^{c/}	22(±1) ^{c/} _{n=5}
Proceso Kraft	2 ^{b/}	14.0	52.4
	16	15.4	60.7
	162	15.2	50.7
Hidróxido de sodio	3	11.5	60.3
	22	14.8	56.7
Sulfito neutral	2.5 ^{b/}	23.3	32.2
Bagacillo molido (1 mm)			
Ninguno	0	27.5(±.26) ^{c/}	23.6(±2) ^{c/} _{n=20}
Proceso Kraft	3	12.2	67.3
	23	12.0	66.3
	70	14.3	56.3
Hidróxido de sodio	3	12.0	60.0
	23	14.3	57.7
	70	14.9	57.3

a/ A 80°C, 100% de humedad relativa, a menos que otra cosa se indique.

b/ A 110°C, calor seco.

c/ Desviación estándar.

d/ Datos no corregidos por cenizas y nitrógeno.

n.- Número de determinaciones.

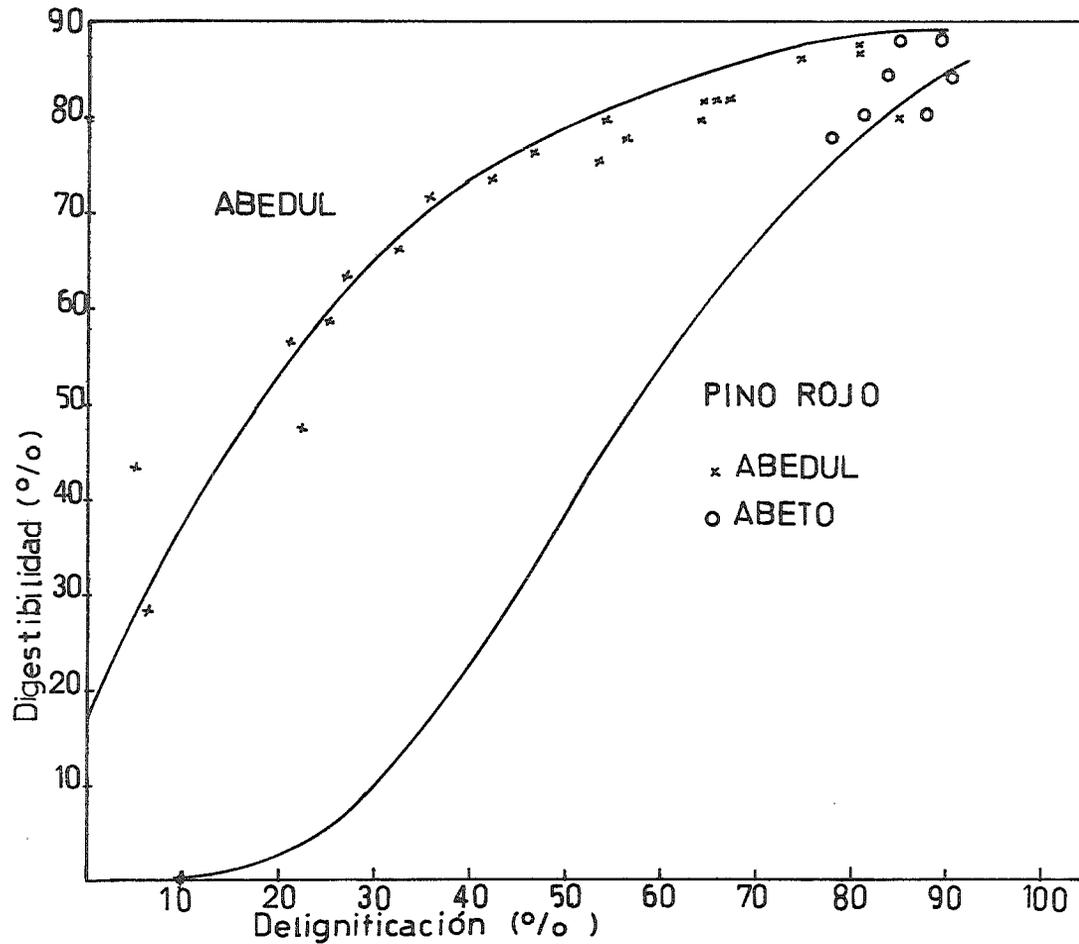


Fig. 8. - Relación entre digestibilidad y porcentaje de delignificación para pulpas de madera (23).

ficación cuando el material se ha molido. Así tenemos que cuando se somete bagacillo sin moler a pretratamiento con hidróxido de sodio a 80°C y 100% de humedad relativa, durante 22 horas, se observa un 56.7% de digestibilidad, y cuando se somete bagacillo molido a un pretratamiento semejante, pero durante 23 horas se obtiene -- 57.7% de digestibilidad, muy parecido al anterior.

Comparando los pretratamientos, se observa que se obtiene una digestibilidad más alta con el proceso Kraft que con hidróxido de sodio en las mismas condiciones: con proceso Kraft 67.3% y con - hidróxido de sodio 60.0%, pero no se reportan pérdidas.

Otro estudio (25), donde se trataron diferentes maderas duras por el método alcalino, dió como resultado la Fig. 9, donde se observa el efecto del contenido de lignina en la digestibilidad. En esta figura se ha trazado una línea recta, pero si se registran estrictamente las coordenadas de los círculos se observa que para el punto 1 se tiene 22.7% de lignina con una digestibilidad de aproximadamente el 28%, mientras que para el punto 2 con aproximadamente - 21.4% de lignina corresponde una digestibilidad de aproximadamente 19%. Esto aparentemente es contradictorio, sin embargo debe -- observarse que se ha graficado porcentaje de lignina y no grado de delignificación.

En otro estudio (27), se delignificó con hongos white-rot que degradan selectivamente lignina, obteniéndose los resultados de la - Fig. 10. En este caso, siendo la degradación selectiva hacia lignina no se observa tanta desviación como en la Fig. 9, es decir, hay una mejor correlación entre porcentaje de lignina y digestibilidad, sin embargo hay algunos puntos que muestran lo contrario, lo cual se puede deber a que los hongos también metabolizan azúcares.

Si se compara la Fig. 10 con la Fig. 9, se observa exactamente la misma correlación porcentaje de lignina-digestibilidad. Es to significa que la relación se conserva sin importar si el método - de eliminación de lignina es químico ó microbiológico.

II. 3.- DEGRADACION MICROBIANA DE LIGNINA.

La degradación de lignina por microorganismos es un fenómeno que sucede todos los días en la naturaleza y al cual se le ha -- prestado especial atención en los últimos años.

a) Microorganismos capaces de degradar lignina.

Cuando se habla de degradación de lignina se habla no solamente de la conversión de lignina a dióxido de carbono y agua sino

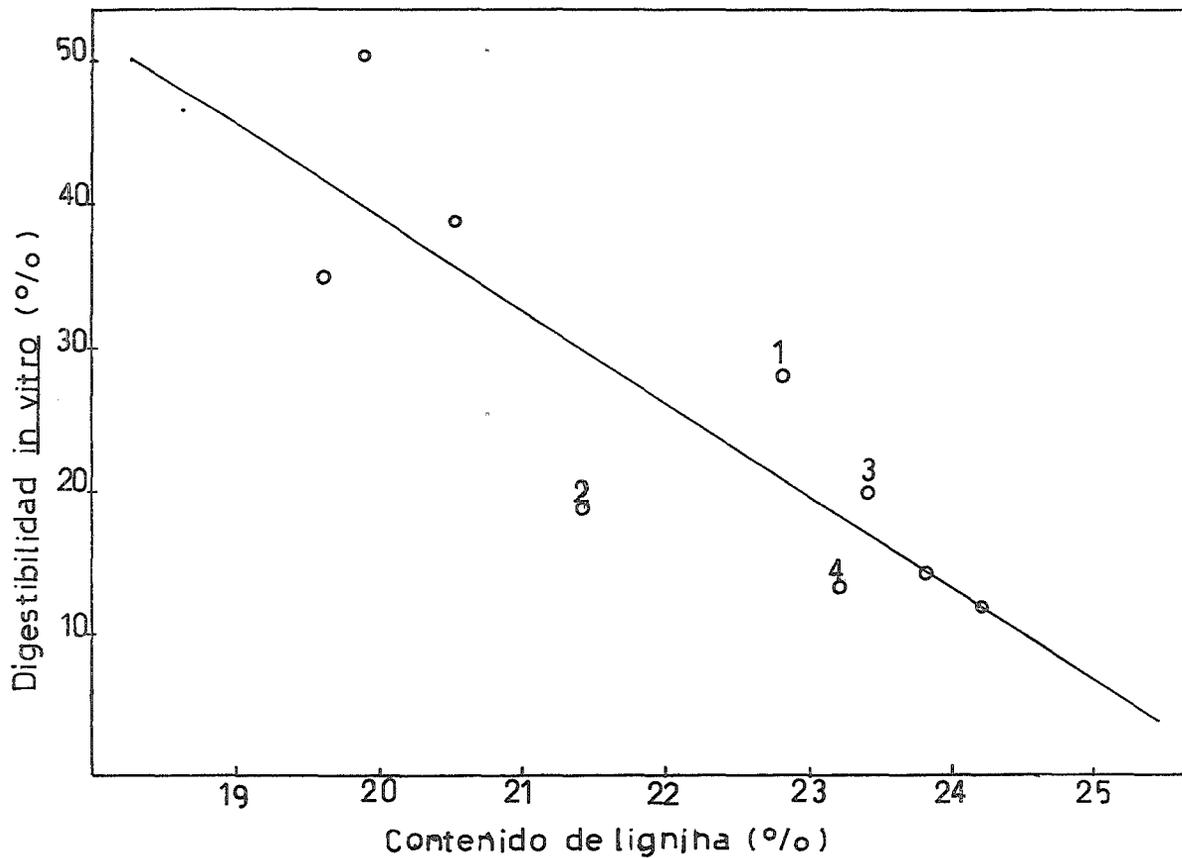


Fig. 9.- Relación entre contenido de lignina y digestibilidad in vitro para maderas duras tratadas con hidróxido de sodio (25).

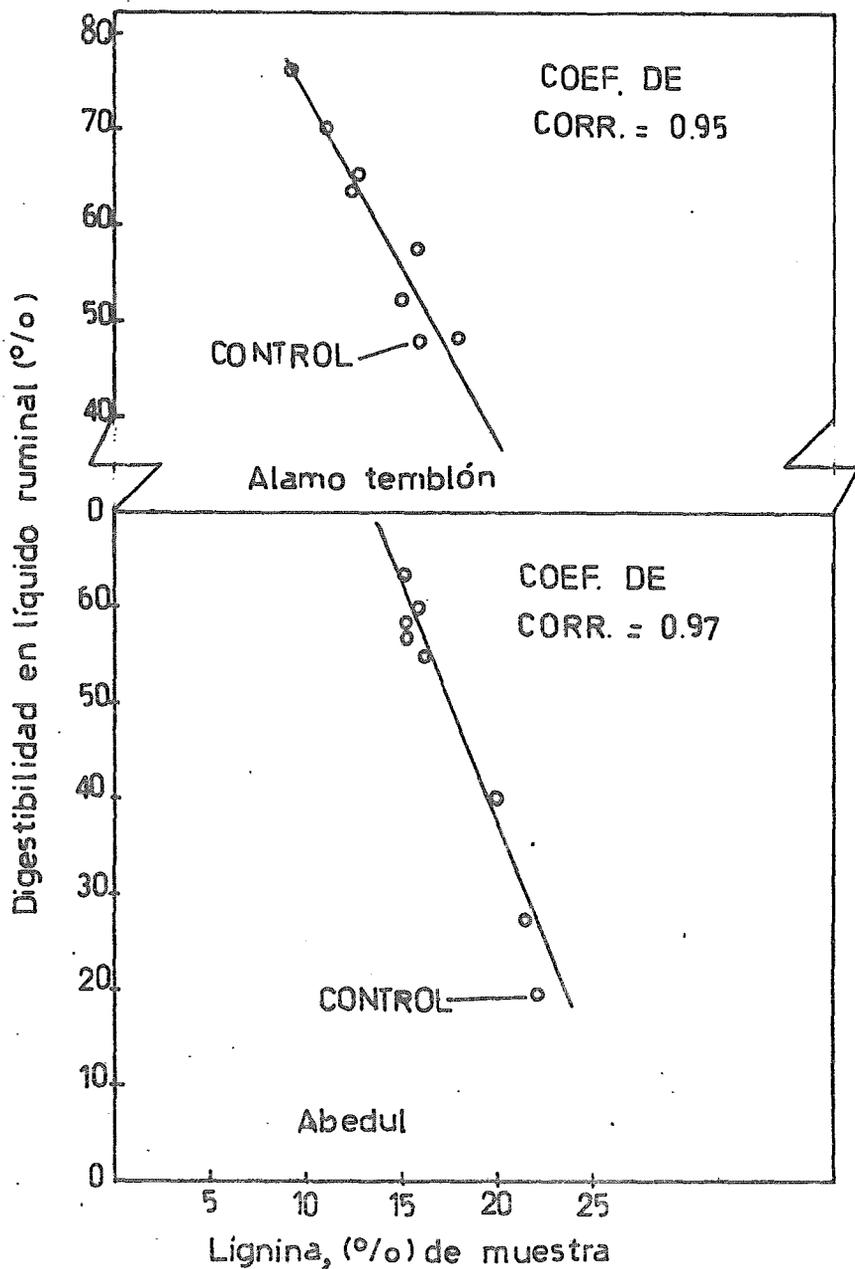


Fig. 10.- Relación entre porcentaje de lignina y digestibilidad de maderas atacadas por hongos White-rot (27).

también de bioalteraciones tales como demetilaciones y oxidaciones parciales.

A los microorganismos capaces de degradar lignina a dióxido de carbono y agua se les ha denominado degradadores primarios, a este tipo pertenecen los hongos white-rot. Varios investigadores - han probado la capacidad de degradar lignina a diferentes microorganismos, Cuadro 3.

Los hongos del tipo brown-rot causan principalmente demetilaciones (29), aunque son del mismo género que los del tipo white-rot. También los hongos del tipo litter decomposing juegan un papel predominante en la degradación de lignina, siendo degradadores primarios (28). Los hongos del tipo soft-rot degradan lignina muy lenta e incompletamente. Estas clasificaciones: white-rot, brown-rot, litter decomposing no tienen base taxonómica.

La descomposición de lignina es un paso muy importante en el ciclo del carbono, sin embargo, por ser muy complicado no se ha logrado elucidar, lo más probable es que sean un conjunto de -- microorganismos de todo tipo los que logran la rápida y completa -- descomposición de lignina. No se ha trabajado mucho sobre este -- campo principalmente por no contarse, sino hasta hace poco, con -- una metodología apropiada. Si se observa en el Cuadro 3, por lo general el método de análisis es gravimétrico, lignina insoluble en ácido, que no es completamente adecuado ni específico porque solo - se puede usar cuando la degradación ha alcanzado alto porcentaje. Así, tenemos que no se sabe si levaduras y otros hongos del suelo degradan lignina ya sea completa ó parcialmente, respecto a bacterias se han hecho algunos trabajos (28), pero se duda de estos resultados por haberse llevado a cabo los experimentos con modelos - sintéticos ó con ligninas alteradas por pretratamiento.

La mayoría de los experimentos enfocados hacia "Degradación microbiana de lignina", se han llevado a cabo con hongos del tipo white-rot, algunos comestibles, ya que son los que hasta ahora se sabe degradan lignina más eficientemente. En general este tipo de microorganismos son lentos para crecer, en la naturaleza crecen - en troncos de árboles, los cuales contienen lignina y poco nitrógeno.

b) Reacciones químicas de la degradación.

La lignina es un biopolímero, pero su degradación no se lleva a cabo por enzimas hidrolíticas extracelulares como en el caso de otros biopolímeros (proteínas ó carbohidratos) debido a que sus

Cuadro 3.- Grupos de organismos que degradan lignina (28).

Grupos de organismos	Sustratos	Método de análisis	No. de Referencias
Basidiomicetos hongos white-rot (ej. <u>Coriolus versicolor</u>)	Varios tejidos de maderas, - ligninas sintéticas.	Gravimétrico, radio-activo, químicos, - espectroscópicos.	5
Hongos brown-rot:(ej. <u>Gloeophyllum trabeum</u>)	Varios tejidos de maderas, - ligninas sintéticas.	Gravimétrico, radio-activo, químicos, - espectroscópicos.	4
Hongos litter-decomposing (ej. <u>Collybia butyracea</u>)	Basuras forestales.	Gravimétrico	1
Ascomycetos hongos white-rot (ej. <u>Hypoxylon deustum</u>)	Varios tejidos de maderas	Gravimétrico	2
Hongos soft-rot(ej. <u>Chaetoniium globosum</u>)	Varios tejidos de maderas	Gravimétrico, radio-activo	2
Hongos imperfectos hongos soft rot (ej. <u>Papulospora sp.</u>)	Varios tejidos de maderas	Gravimétrico	1

enlaces intermonoméricos son muy variados y la mayoría no hidrolizables. Se demostró que la degradación es un proceso oxidativo -- (28), en el Cuadro 4, se resumen una serie de trabajos donde se encuentra que después de la degradación parcial de lignina por hongos white-rot hay un aumento de los grupos funcionales que contienen oxígeno y también la relación oxígeno/carbono aumenta.

Con base en estos resultados y otros más (30), se llegó a las siguientes conclusiones:

- Las porciones del polímero de lignina en la madera se degradan sin ser fragmentadas antes a unidades monoméricas u oligoméricas.

- Los anillos aromáticos se rompen oxidativamente cuando todavía forman parte de la estructura polimérica.

- Las cadenas laterales propílicas se oxidan en la posición α con formación de grupos carbonilo, y algunas cadenas laterales terminales son fragmentadas oxidativamente produciendo grupos aromáticos ácidos.

También se ha sugerido una secuencia de degradación que es la siguiente:

Unidades de derivados fenólicos en varias regiones expuestas del polímero, se convierten oxidativamente a unidades catecol por demetilación y por tanto por hidroxilación aromática. Las unidades dihidroxi se rompen oxidativamente para producir residuos alifáticos ricos en carbonilos que luego son degradados con liberación de productos alifáticos, éstos entran en la hifa fungal donde son metabolizados. Nuevos grupos de derivados fenólicos son liberados gradualmente para posterior ataque por este proceso de erosión y quizá -- también en parte por rompimiento oxidativo de interunidades -éter.

- Se han encontrado estructuras demetiladas sólo en una fracción enlazada al micelio, lo cual hace pensar en que es necesario para que haya degradación del polímero que éste tenga contacto con la hifa.

c) Bioquímica, genética y mecanismos biológicos involucrados en la degradación de lignina.

Las enzimas necesarias para degradar lignina son las fenoloxidasas (31), en Sporotricum pulverulentum.

Se ha encontrado que la enzima lacasa (O_2 : p-difenol óxido -

Cuadro 4.- Cambios en ligninas causados por hongos white-rot (28).

Propiedad	Cambios ^{a/}		Métodos de Análisis ^{b/}
	Aumento	Disminución	
Contenido de carboxilos	+		C, U, V, IR, PMR
Contenido de hidroxilos			
Fenoles	+ <u>c/</u>		C, UV, PMR
Alifáticos		+	C, PMR
Contenido de carbonilos	+		UV, IR, PMR
Hidrógeno / Carbono		+	C
Oxígeno / Carbono	+		C
Metoxilo / Carbono		+	C
Producción de ácidos metoxilados aromáticos en degradación oxidativa después de la metilación, ^{d/}		+	C
Obtención de productos -- principales de acidólisis, ^{e/}		+	C
Obtención de mayores productos en oxidación con <u>ni</u> trobenceno		+	C

a/ Ligninas degradadas se compararon con ligninas enteras.

b/ C, varios métodos químicos; UV, IR, PMR ultravioleta, (UV) infrarrojo y resonancia magnética nuclear (RMN)

c/ Hasta (1966) encontró un aumento en el contenido de hidroxilos fenólicos y obtuvo resultados variables con el contenido de hidroxilos alifáticos.

d/ El mayor producto es 3,4-dimetoxibenzoico ácido de ligninas gimnospermas.

e/ El mayor producto de ligninas completas es 3-hidroxi-1-(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)-2-propanona. Acido vanílico es el mayor producto de ligninas atacadas por white-rot.

reductasa EC 1.10.3.2.), tiene relación con la regulación de enzimas que degradan tanto lignina como polisacáridos pero no se conoce exactamente cuál es esa relación.

Se ha estudiado también la enzima celobiosa: quinona oxido - reductasa (32), esta enzima tiene importancia en la degradación de lignina y como su nombre lo indica, requiere de celobiosa para su funcionamiento. Se ha propuesto (31), el siguiente mecanismo según el cual se sugiere que lacasa juega un papel desintoxicante de fenoles de bajo peso molecular, Fig. 11.

Sin embargo la enzima quinona oxido reductasa no es indispensable para degradar lignina, aunque se degrada menos lignina en su ausencia (33).

También se encontró que el grado de polimerización de la celulosa usada como fuente de carbono y energía, tiene importancia en la degradación de lignina: a mayor grado de polimerización, aumenta la degradación de lignina. Cuando se usa celobiosa y/o glucosa se obtiene la menor degradación de lignina. Esto se ha interpretado como represión catabólica de celulosa, celobiosa deshidrogenasa, lacasa, etc. (33).

En Pleurotus ostreatus la celulosa aumenta la degradación de lignina (34), hecho que va de acuerdo con las afirmaciones anteriores, sin embargo en trabajos donde se usó otro método para medir la degradación de lignina (35), el cual consiste en usar ligninas sintéticas marcadas con ^{14}C y luego medir la degradación por medio del $^{14}\text{CO}_2$ liberado se encuentra que la glucosa no tiene efecto represivo en sistemas degradadores de lignina (36), Cuadro 5, hecho con traductorio a lo anteriormente mencionado. Quizá esta contradicción se deba al tipo de sustrato usado. En el caso del estudio donde se usó el método del ^{14}C (36), se comprobó que la lignina sintética -- usada era muy semejante a una lignina natural, sin embargo en los otros trabajos (33) (34), no fue demostrado que las ligninas usadas fueran semejantes a ligninas naturales. Es posible que en la degradación de ligninas alteradas tengan gran influencia las enzimas oxidantes, las cuales se encontró son inducibles por sustratos ricos en lignina (40), hecho que también está en contradicción con los resultados obtenidos por el método de $^{14}\text{CO}_2$ (36), Cuadro 6.

En el Cuadro 5, podemos observar como a medida que aumenta la concentración de glucosa aumenta la degradación de lignina y a su vez la degradación es mayor a los 21 días que a los 10 días llegando a duplicarse cuando se usan 1.11 milimoles de glucosa/litro.

En el Cuadro 6, se observa que se obtiene la misma activi-

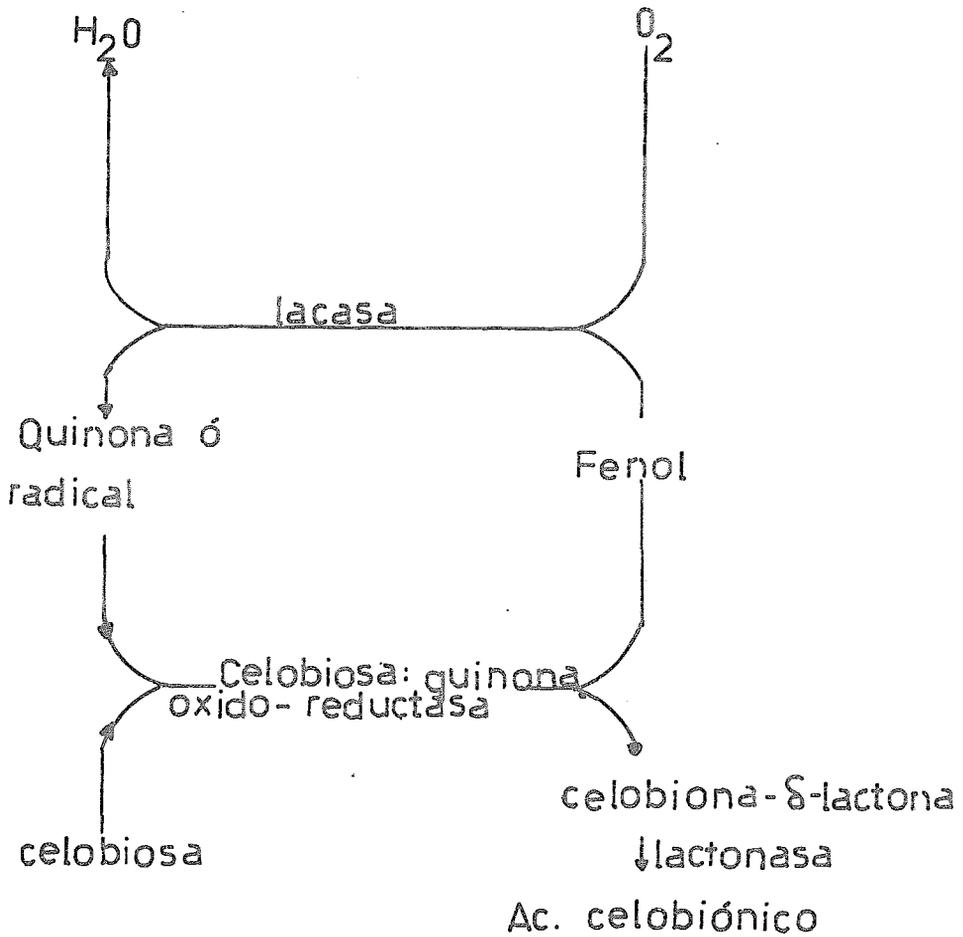


Fig. 11.- Mecanismo según el cual se sugiere lacasa juega un papel detoxificante en la degradación de lignina (31).

Cuadro 5.- Efecto de la concentración de glucosa en la descomposición de lignina por Phanaerochaete chrysosporium (36).

Concentración original de glucosa por cultivo mM	Lignina descompuesta a $^{14}\text{CO}_2$	
	% del $^{14}\text{C}_{\text{total}}$	
	A los 10 días	A los 21 días
0.00	0	0
0.14	2 \pm 0	
0.21	5 \pm 2	7 \pm 2
0.28	10 \pm 1	13 \pm 1
0.42	15 \pm 2	29 \pm 3
0.56	21 \pm 3	39 \pm 33
1.11	22 \pm 4	43 \pm 6

Cada matraz, de 125 ml, contenía 10 ml de medio basal: NH_4NO_3 y L-asparagina (ambos 0.6 mM), 0.01 M de buffer de ftalato pH 4.5, 5300 g de lignina incluyendo 2.3×10^4 dpm de ligninas marcadas en el anillo con ^{14}C . Los valores son promedios de muestras por quintuplicado.

Cuadro 6.- Efecto de incubación previa con lignina en la actividad ligninolítica (36).

Tratamiento	Actividad ligninolítica ¹⁴ CO ₂ dpm/h/matraz)	
	0-6 h	6-24 h
Con lignina al iniciar	57 ± 36	24 ± 14
Sin lignina al iniciar	73 ± 16	30 ± 5

Seis de los doce matraces por duplicado contenían 500 g cada uno de lignina sin marcar desde la incubación.

Después de 5.5 días se añadió cicloheximida a todos los cultivos. Una hora más tarde, 3000 g de lignina, conteniendo 3 a 10 dpm de lignina marcada en el anillo. Los cultivos de Phanerochaete chrysosporium tuvieron 100% de O₂ y se mantuvieron a 39°C.

dad ligninolítica ya sea añadiendo ó no lignina antes de hacer la prueba, también se observa que después de 6-24 horas hay menos degradación que de 0-6 horas. Aunque los valores de $^{14}\text{CO}_2$ dmp/h por matraz son diferentes: 57 y 73; si se toma en cuenta que estos valores pueden variar entre ± 36 y ± 16 respectivamente, puede considerarse que no hubo cambio entre una y otra condición. Lo mismo sucede con los valores a las 6-24 horas.

Se han propuesto una serie de enzimas actuando en la degradación de lignina (33), pero ninguna de ellas se ha aislado ni estudiado. Ya que el polímero de lignina por su tamaño no puede entrar en la célula, estas enzimas deben ser extracelulares y por su función requieren coenzimas. Hasta la fecha no se conoce ninguna enzima con ambas características.

- d) Experimentos en medio líquido con ligninas sintéticas marcadas con ^{14}C y hongos white-rot para estudiar parámetros de cultivo que afectan la biodegradación.

Dado que la degradación microbiana de lignina es un proceso oxidativo, se ha investigado el efecto de la concentración de oxígeno en la atmósfera sobre la actividad ligninolítica (36).

Cuando la atmósfera tiene 5% de oxígeno, prácticamente no hay degradación de lignina a CO_2 , pero el hongo Phanerochaete chrysosporium crece, durante los primeros 5 días rápidamente hasta alcanzar 11 mg de peso seco, después durante los siguientes 25 días crece lentamente hasta alcanzar 25 mg de peso seco, y a su vez la glucosa en los primeros 5 días se consume más rápido que en los siguientes 25 días. En este caso no se consume toda la glucosa, Fig. 12.

Cuando se tiene una atmósfera de 21% de oxígeno Fig. 13, la degradación de lignina empieza después de los primeros 5 días de crecimiento en los cuales el hongo crece más rápido y se consume glucosa a mayor velocidad, y la lignina se consume en un 45% después de 35 días. Aunque el micelio en este caso alcanza 25 mg de peso seco a los 20 días, después de este tiempo decrece hasta 11 mg. En este caso la glucosa se consume totalmente a los 25 días, lo cual no sucede cuando la atmósfera es de 5% de oxígeno.

Cuando se tiene una atmósfera de 100% de oxígeno Fig. 14, la degradación de lignina empieza también después de los 5 días, pero es más rápida, de tal manera que a los 13 días ya se tiene una degradación de 45% comparable con la que se obtiene en 35 días con una atmósfera de 21% de oxígeno. Con 100% de oxígeno a los

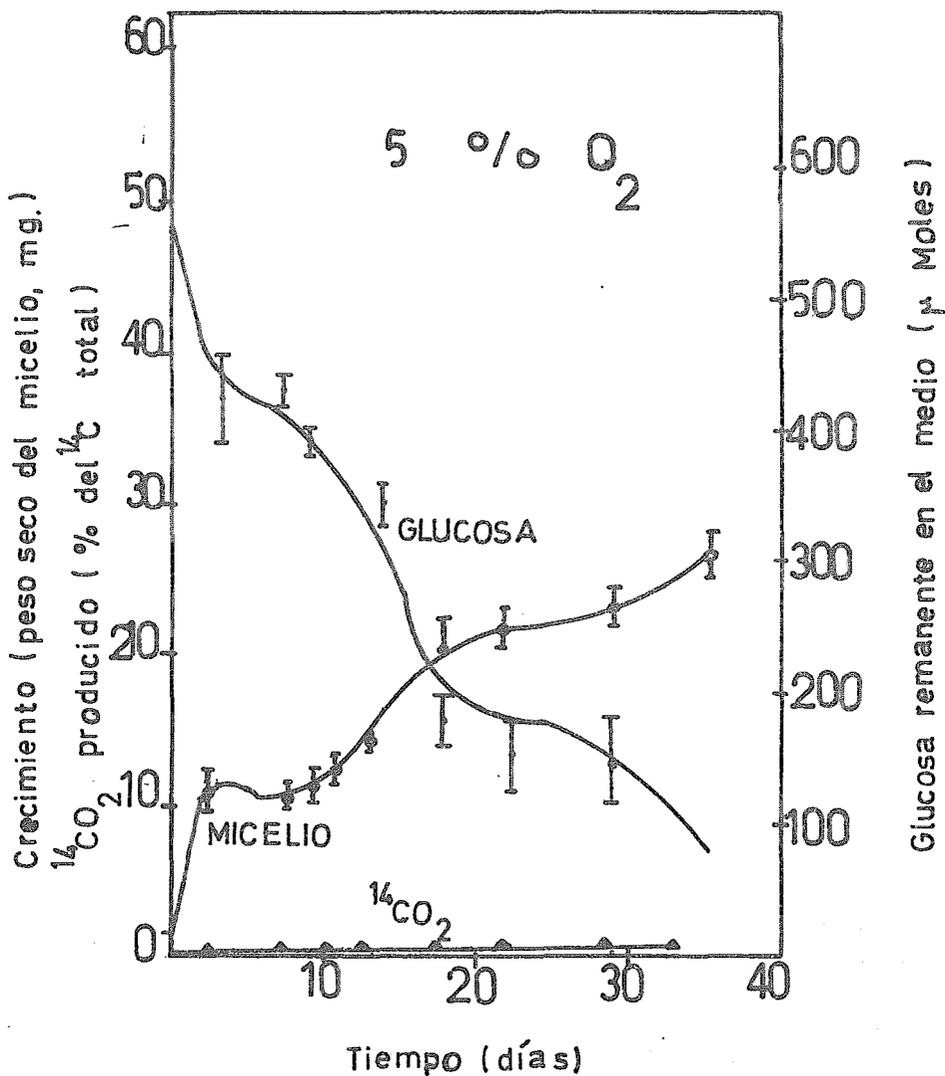


Fig. 12. - Degradación de lignina en una atmósfera de 5% de oxígeno (36).

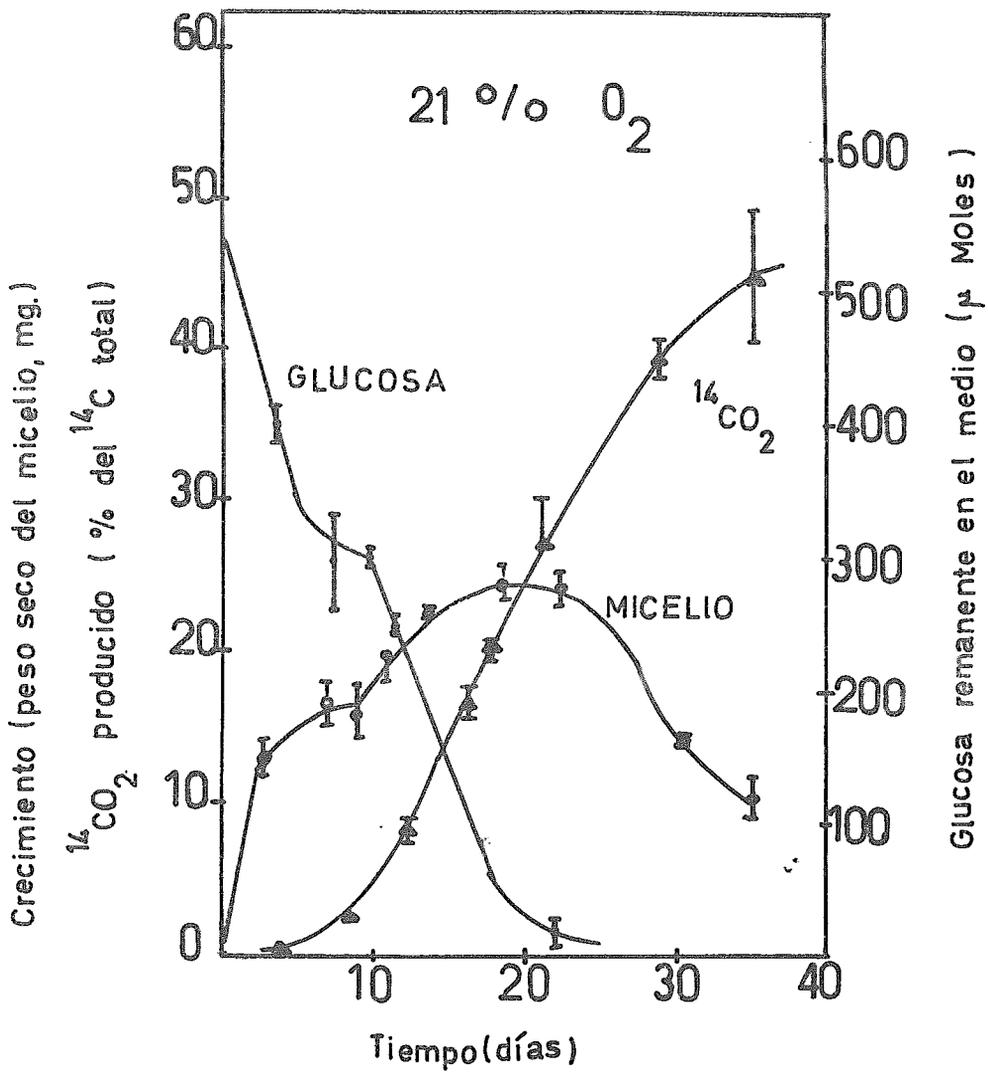


Fig. 13.- Degradación de lignina en una atmósfera de 21% de oxígeno por Phanerochaete chrysosporium (36).

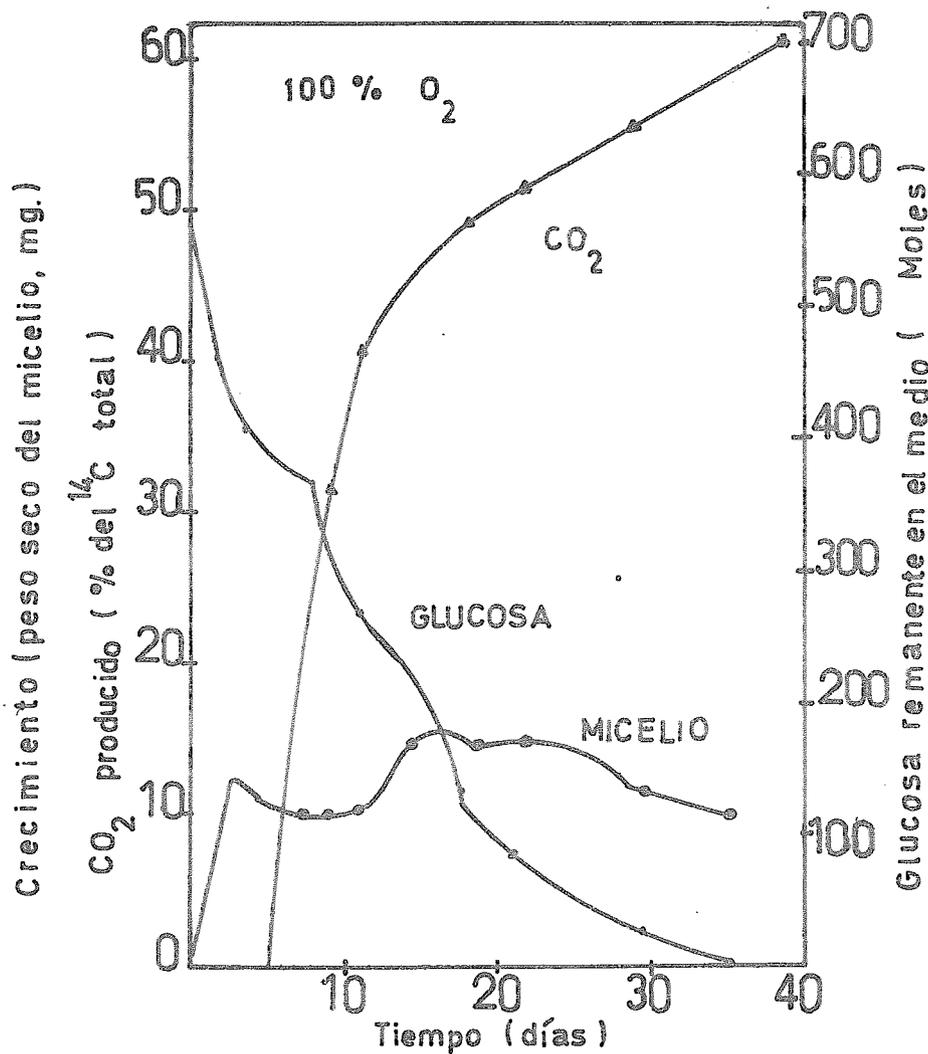


Fig. 14. - Degradación de lignina en una atmósfera de 100% de oxígeno por Phanerochaete chrysosporium (36).

35 días se obtiene una degradación del 55%, es decir, 10% más que con una atmósfera de 21% de oxígeno.

Se observa también que el micelio, en condiciones de 100% de oxígeno, Fig. 14, crece sólo hasta alcanzar 15 mg de peso seco. -- Por tanto, aunque degrada más lignina crece menos que en 5% de oxígeno y 21% de oxígeno respectivamente.

Por lo general la forma de obtener mayores concentraciones de oxígeno en un líquido es agitar y aerear los cultivos. En este caso la degradación no se mejora con la agitación (36).

Cuando se agitan los cultivos constantemente, tanto con 100% de oxígeno como con 21% de oxígeno se observa una mínima degradación de lignina Fig. 15. Cuando los cultivos se mantienen estacionarios se alcanzan mayores porcentajes de degradación. Sin embargo, cuando se agitan después de los 9 primeros días de crecimiento se obtiene, en una atmósfera de 21% de oxígeno, una mayor degradación que cuando está estacionario, este incremento es muy significativo: estacionario 15%, agitando después de 9 días 20%.

Estos resultados el Dr. Kirk (47), se los atribuye a la formación de pelets; pero no se sabe si el efecto es por una mala transferencia de oxígeno al centro del pelet ó por disminución de la superficie de contacto entre el micelio y la lignina ó por ambas causas.

Se estudió el efecto del pH y se encontraron resultados que se representan en el Cuadro 7, (36).

En el cuadro se observa que el mayor crecimiento se obtiene en un pH de 4.5 - 5.0 y la mejor degradación en un pH de 4.0 - 4.5, mejor aún en 4.5.

En todos los casos el pH tiende a subir excepto cuando el pH es inicialmente de 3.5, 5.5 y 6.

Se probaron varias fuentes de carbono (30). Celulosa y glucosa fueron las mejores fuentes de carbono para degradar lignina, Cuadro 8. Succinato de sodio, gluconato de potasio, glucoronolactona y vanilato de sodio aparentemente son malas fuentes pero no se sabe si este efecto se debe en sí a los compuestos ó al cambio de pH que -- producen al metabolizarse, ya que el pH no se controló en estos experimentos.

El nitrógeno en el medio tiene un efecto represor (36), Fig.16. La fuente usada fue nitrato de amonio.

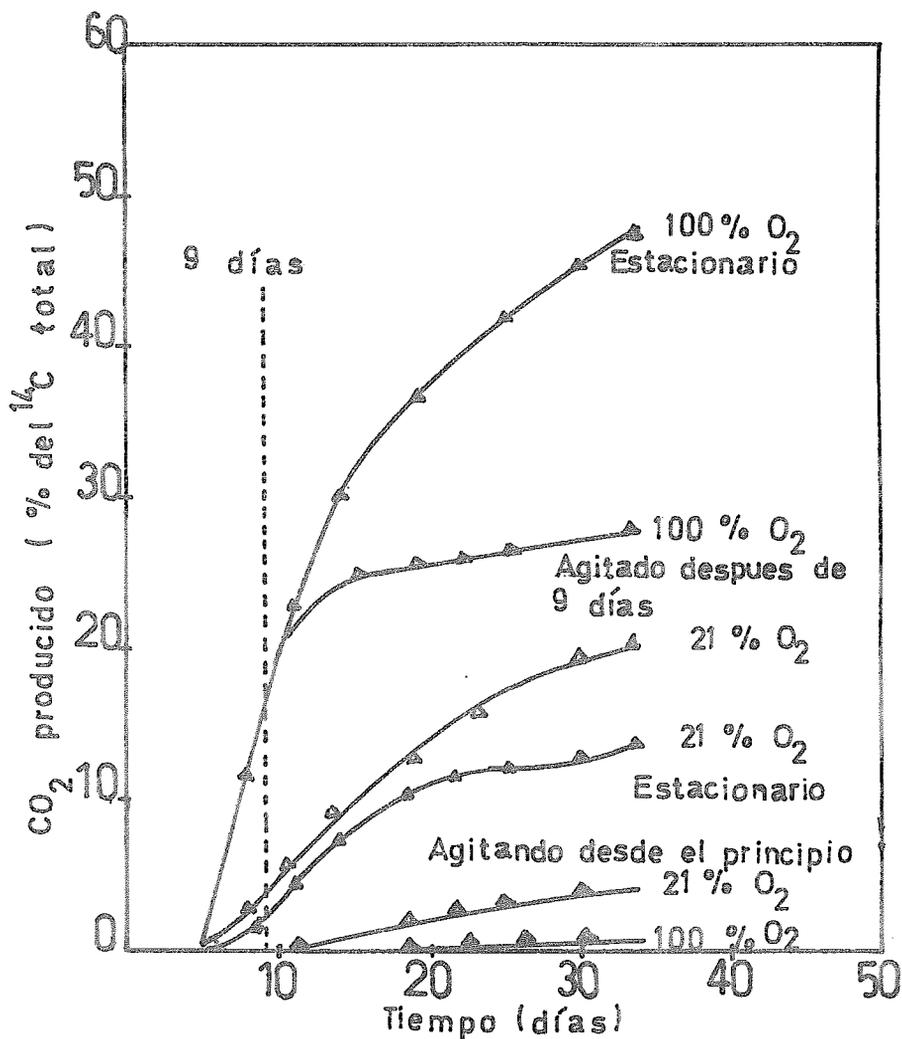


Fig. 15. - Degradación de lignina en diferentes condiciones de agitación (36).

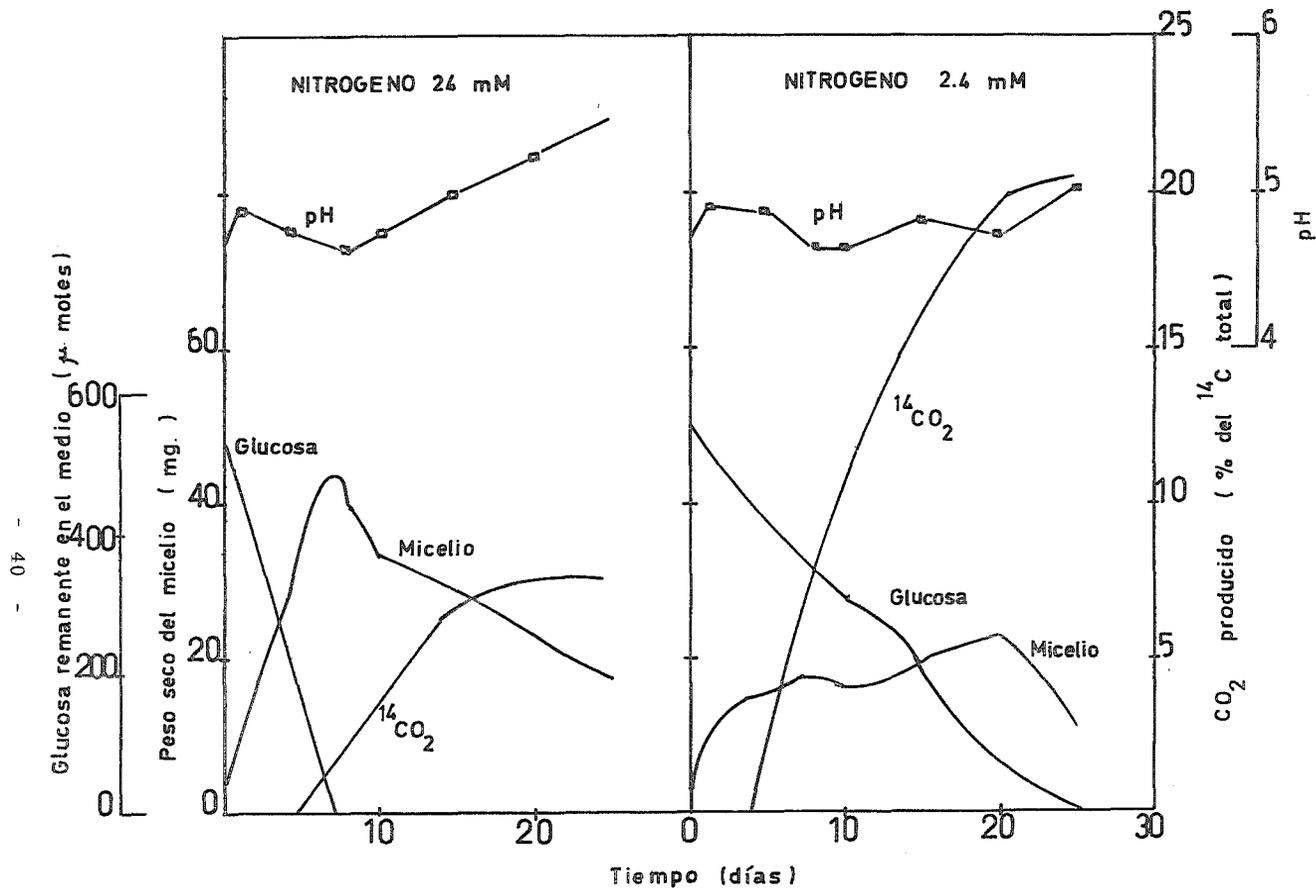


Fig. 16.- Efecto del nitrógeno en la degradación de lignina. Se usó como fuente de nitrógeno nitrato de amonio (36).

Cuadro 7. - Efecto del pH en el medio sobre el crecimiento y descomposición de lignina por Phanerochaete chrysosporium. (36).

pH		Crecimiento, peso seco del micelio mg.	Lignina descompuesta a $^{14}\text{CO}_2$, % del ^{14}C - Total
Inicial	Final		
3.0	2.9	7.8 ± 3	1
3.5	3.6	10.7 ± 0.2	8 ± 6
4.0	4.3	12.6 ± 0.4	37 ± 2
4.5	4.9	13.9 ± 0.4	38 ± 4
5.0	5.1	13.9 ± 0.5	20 ± 2
5.5	4.9	14.4 ± 0.8	8 ± 1
6.0	4.9	12.0 ± 0.1	3 ± 1

Cada matraz, de 125 ml, contenía 10 ml de medio basal, descrito anteriormente, 56 mM de glucosa, y 3 a 10 dpm de lignina -- marcada en el anillo, no hubo agitación y se mantuvo una atmósfera de 100% de O_2 por 9 días.

Cuadro 8. - Efectividad de varios compuestos como sustratos de crecimiento para degradar ligninas sintéticas marcadas con ^{14}C , con Phanerochaete chrysosporium (30).

Compuesto	Lignina descompuesta a $^{14}\text{CO}_2$ después de 13 días. % del ^{14}C total.
Glucosa	38 ± 6
Glicerol	29 ± 3
Celulosa	41 ± 4
Succinato de sodio (pH 4.5)	23 ± 3
Gluconato de potasio (pH 4.5)	2 ± 2
Glucoronolactona	7 ± 2
Vanilato de sodio (pH 4.5)	1

Cada matraz contenía 10 ml del medio basal, descrito anteriormente, 300 mg de lignina sintética marcada en el anillo y 40 - mg de sustrato de crecimiento (excepto vanilato). El control del pH fué inadecuado.

Observamos que cuando se usan en el medio 24 milimoles/litro la degradación de lignina alcanza aproximadamente un 72%, la glucosa se consume totalmente antes de los diez días y el micelio alcanza aproximadamente 40 mg de peso seco. El pH sube de 4.5 a 5.5.

Cuando en el medio se tienen 2.4 milimoles/litro la degradación de lignina alcanza hasta un 20%. El crecimiento alcanza sólo 25 mg de peso seco como máximo y la glucosa se consume totalmente pero en forma más lenta, de tal manera que a los 10 días aún quedan 300 micromoles aproximadamente y es hasta los 25 días cuando se consume totalmente.

Con el fin de conocer un poco más a fondo el efecto del nitrógeno se hicieron experimentos midiendo la desaparición del nitrógeno del medio.

Los resultados obtenidos se presentan en la Fig. 17, (37). -- Cuando el nitrógeno se ha agotado, el micelio no deja de crecer. -- Después del sexto día la actividad ligninolítica disminuye, fenómeno que en las otras figuras no se aprecia por graficarse % de $^{14}\text{CO}_2$ - en relación al ^{14}C total que se encuentra en la lignina, mientras que en este caso son dpn/hora/cultivo.

La actividad ligninolítica empieza dos días después de que el nitrógeno se ha agotado y un día después de que el micelio ha dejado de crecer. Se ha tratado de relacionar este fenómeno con la actividad de la permeasa NH_4 encontrándose los resultados en el Cuadro 9, (37).

En este cuadro se encuentra que a los dos días (un día después de que se agota el amonio) aparece la actividad de la permeasa NH_4 y la actividad ligninolítica. Al cuarto día se detecta fenol oxidasa. El DNA aumenta después de 6 horas de que se agota el nitrógeno extracelular.

Se sugiere que este fenómeno se debe a una conexión indirecta entre el metabolismo de lignina y el metabolismo del nitrógeno, quizá relacionado a través de permeasa NH_4 . La aparición de esta enzima es un indicador del agotamiento del NH_4 , después del cual empieza la actividad ligninolítica (37).

El medio de cultivo reportado para la degradación de lignina en medio líquido sin agitación es el siguiente:

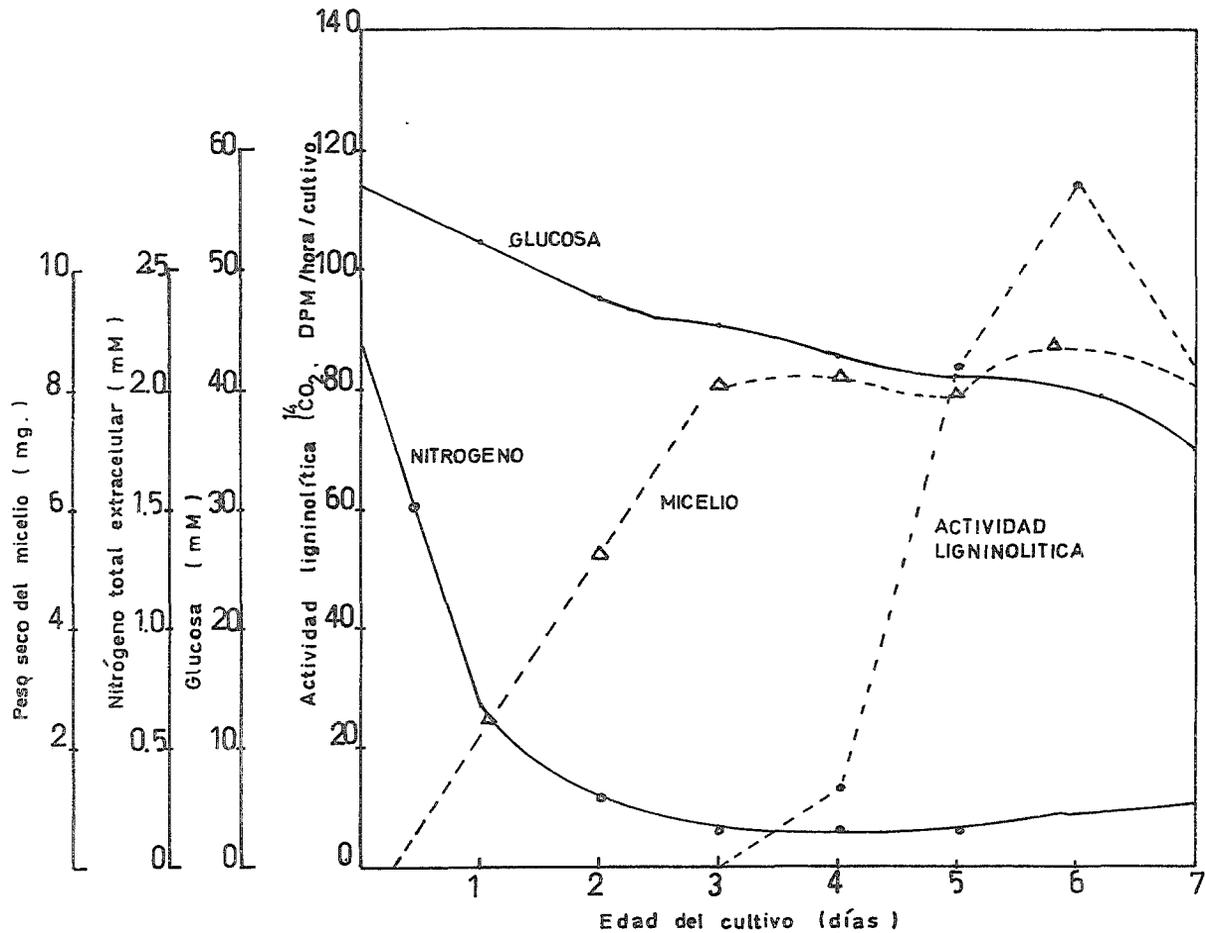


Fig. 17.- Relaciones entre parámetros de cultivo y actividad ligninolítica durante siete días de crecimiento de *Phanerochaete chrysosporium* (37).

Cuadro 9.- Características del cultivo durante 6 días de crecimiento con tartrato de amonio (37).

Edad del cultivo (días)	Peso del micelio (mg)	Glucosa umol/ml.	DNA umol/ml.	Permeasa NH ₄ ⁺ umol/ml	Actividad ligninolítica	Fenol oxidasa	NH ₄ ⁺ extracelular (umol /ml)
0	0	56					2.1
0.25	0	56					2.1
0.5	0	56	3				1.6 - .5
1	2.9 - 1	50 + 1	19	ND	0		0
1.25			21				
2	6.2	44 + 1	19	0.71	1		0
3	7.9		18	0.55	1		
4	8.7		17	0.56	32 + 14	+	
5	10.8		17	0.60	94 + 36	+	
6	13.2	25 + 1	16	0.52	93 + 21	+	

Estos experimentos se realizaron en una atmósfera de 100% de O₂ a 39°C. Después de adicionar 5 10⁴ dpm de lignina marcada en el anillo; se midió el ¹⁴CO₂ durante 6 horas. El microorganismo usado fué Phanerochaete chrysosporium.

Componente	Cantidad (g)
Glucosa	10.0
NH ₄ NO ₃	0.05
L-asparagina	0.10
KH ₂ PO ₄	0.20
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.05
CaCl ₂	0.01
Tiamina-HCl	0.0025
Metales ^{a/}	0.001 de c/u
Lignina	.01-3.0
Buffer	b/
H ₂ O	1 litro

a/ Mn, Na, Fe, Ca, Zn, Cu, Al, Borato, molibdato.

b/ o- ftalato .01 M para llevar el medio de un pH de 4.6.

Incubando a 40^o C y a una atmósfera de 100% de oxígeno por medio de un flujo periódico (30).

Todos los experimentos indican que los polímeros de lignina no sirven como sustratos de crecimiento para el tipo de hongos - - white-rot. La base de este fenómeno no se conoce. Una posibilidad es que el hongo puede gastar más energía en degradar lignina a fragmentos que pueda digerir, de la que gana al digerirlos. Otra posibilidad es que los niveles de enzimas que degradan lignina sean bajos.

III. PRETRATAMIENTOS FISICOS.

Los pretratamientos físicos tales como aplicación de radiaciones, molido de materiales ó tratamientos con vapor, no eliminan lignina, sino que aumentan la digestibilidad de los materiales debido a cambios físicos que éstos sufren.

En la Fig. 18, (39), se observan las digestibilidades in vitro de varios tipos de maderas molidas durante diferentes períodos.

Durante los primeros 20 minutos de molido la digestibilidad de estos materiales aumenta rápidamente, después de este tiempo - la digestibilidad se mantiene constante. En todos los casos la digestibilidad no se incrementa en un gran porcentaje, muestras que tienen originalmente de 0 a 5% de digestibilidad se logran aumentar -- hasta 20 a 30% respectivamente, moliendo durante 140 minutos. Un caso especial es el del Eucalipto en el que se logra aumentar la di

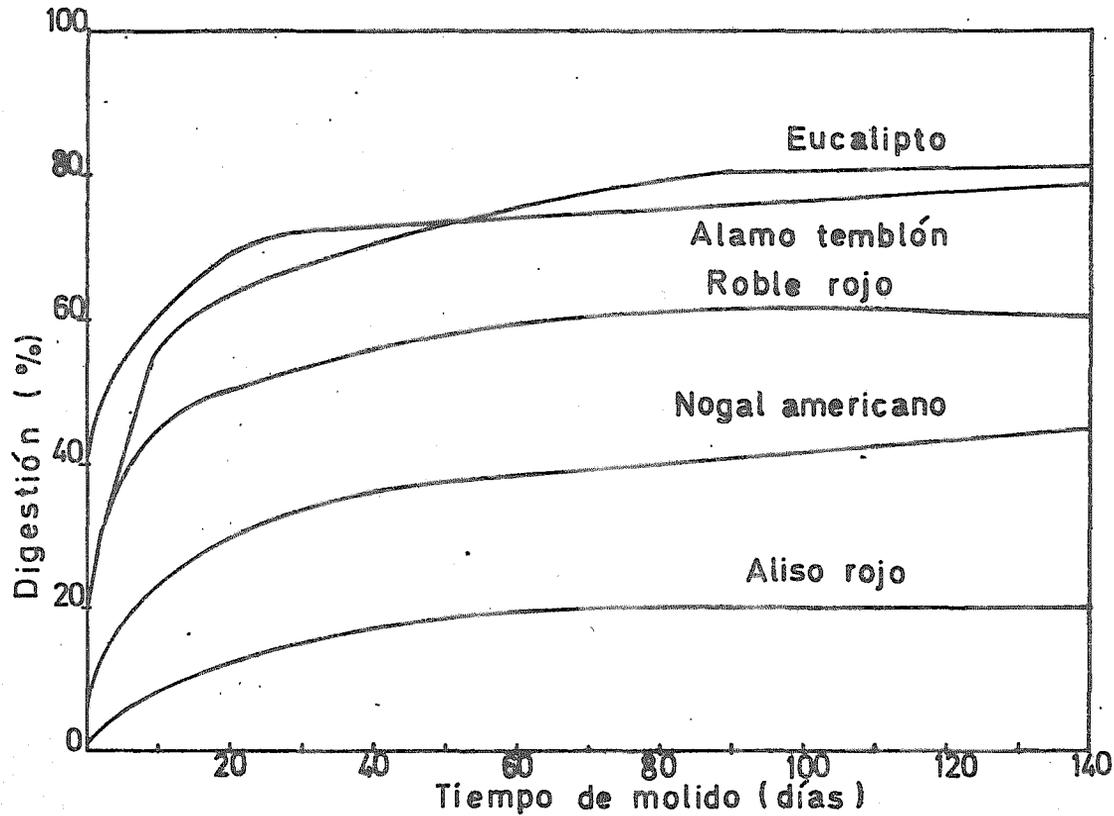


Fig. 18. - Relación entre digestibilidad in vitro y tiempo de molido (38).

gestibilidad de 10 a 83% en un tiempo de molido de 2 horas 20 minutos aproximadamente.

Empleando celulasas se comprueba que este efecto no se debe a la solubilización de componentes. En varios casos se estandarizó el tamaño de partícula y puede deducirse que el efecto no lo gobierna el tamaño de partícula, ya que a tamaño constante se obtienen digestibilidades diferentes, por tanto se piensa que el efecto está gobernado por la cantidad, naturaleza y distribución de lignina, aunque el menor tamaño de partícula ayuda a que los materiales sean más digeribles.

Por todo lo anterior se concluye que hay dos formas de aumentar la digestibilidad: delignificando ó modificando físicamente el material. Los pretratamientos físicos son muy costosos por la energía que se gasta al aplicarlos, por consiguiente si se quiere aumentar la digestibilidad de un material, es preferible no pensar en modificarlo física sino químicamente.

IV. EXPERIMENTOS CON *Pleurotus ostreatus* Y DESPERDICIOS AGRICOLAS EN MEDIO SOLIDO.

Pleurotus ostreatus se ha usado en trabajos de delignificación de materiales lignocelulósicos por pertenecer al tipo de hongos - - white-rot. En otros trabajos se han investigado las condiciones para su cultivo por ser comestible y muy apreciado en Europa.

a) Características de *Pleurotus ostreatus*

Pleurotus ostreatus.- Hongo con sombrero liso a veces algo escamoso hacia el centro ó base: de 5-10 cm. de ancho (ó hasta 15 cm.), grisáceo ó café grisáceo con tonos ó reflejos metálicos, sus láminas son blancas o rosa amarillentas en seco, poco ó nada unidas entre sí en la base, más ó menos delgadas y con bordes lisos. No tiene pie ó éste es muy corto y mal definido. Carne blanca carnosa-correosa, con olor y sabor agradables. Crece en grandes conjuntos sobre troncos caídos ó árboles en zonas tropicales, subtropicales ó bosques de pino y encino, en jardines a veces sobre fresnos y sauces (39).

b) Experimentos realizados con *Pleurotus ostreatus*.

Se han llevado a cabo varios experimentos en los cuales se hace crecer *Pleurotus ostreatus* en paja de trigo (deshecho agrícola), con el fin de delignificarla y así hacerla más digerible (41). Estos experimentos proporcionan datos acerca de 5 aspectos importantes para la evaluación técnico-económica de este proceso:

- 1.- ¿Qué fuente de nitrógeno es la más apropiada para que Pleurotus ostreatus consuma más lignina, menos celulosa y la pérdida de material sea mínima?
- 2.- ¿Cuánta lignina se consume?
- 3.- ¿Cuánta celulosa se consume?
- 4.- ¿Cuánto material se pierde como CO₂?
- 5.- ¿En cuánto aumenta la digestibilidad de la paja de trigo?

Los aspectos 2, 3, 4, y 5 dependen, en este caso, de la - - fuente de nitrógeno usada. Se probaron tres fuentes diferentes: sulfato de amonio, urea, y harina de avena. En los tres casos, las - cantidades de nitrógeno fue la misma para todos. Las respuestas a los incisos 1, 2, 3, 4, y 5 varían con respecto al tiempo de crecimiento de Pleurotus ostreatus en paja de trigo, por tanto si se toman los tiempos de 5, 15, 30 y 70 días son las siguientes:

- A los 5 días Pleurotus ostreatus consume más lignina de - paja de trigo cuando no se usa ninguna fuente de nitrógeno (8%), con sulfato de amonio y harina de avena consume menos lignina (5%), con urea no consume lignina Fig. 19, (41). Con harina de avena consume más celulosa (6%), con sulfato de amonio no se consume celulosa, con urea se consume (1%), al igual que cuando no se suplementa la paja de trigo con fuente de nitrógeno, Fig. 20, (41). Respecto a la pérdida de material con harina de avena se pierde más material -- (2.5%), que con paja de trigo sin fuente de nitrógeno (1%), y con - sulfato de amonio ó urea no se detectó la pérdida de material, Fig. 21, (41). Por lo anterior se concluye que sulfato de amonio es la fuente más apropiada para que Pleurotus ostreatus consuma más lignina, menos celulosa y la pérdida de material sea mínima a los 5 días.

- A los 15 días Pleurotus ostreatus consume menos celulosa (2%), con sulfato de amonio, más lignina de paja de trigo cuando se - usa harina de avena como fuente de nitrógeno (12%), y con sulfato - de amonio, urea y paja de trigo sólo consume de 8 a 10% de lignina. Con harina de avena se consume más celulosa (19%), con sulfato de amonio, urea y paja de trigo sólo consume de 2 a 5% de este polímero Fig. 20.

Respecto a la pérdida de material, ésta es máxima con harina de avena (9%), con paja de trigo sola, sulfato de amonio y urea hay pérdida de 2 a 5% Fig. 21.

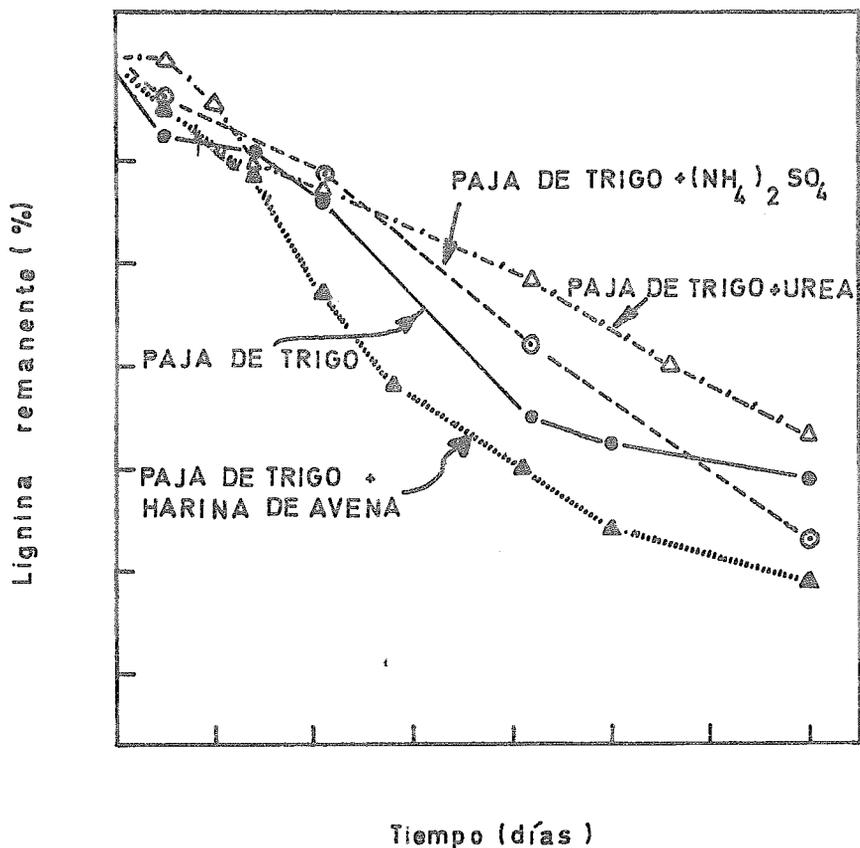


Fig. 19.- Degradación de lignina de paja de trigo por *Pleurotus ostreatus* usando diferentes fuentes de nitrógeno (41).

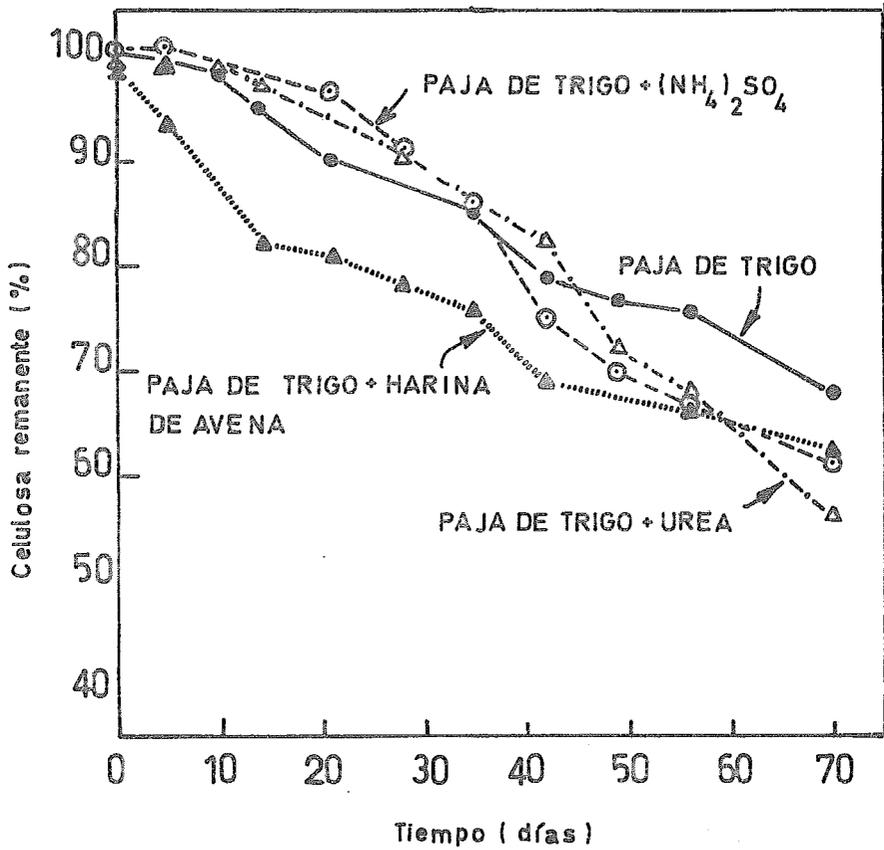


Fig. 20. - Degradación de celulosa por Pleurotus ostreatus usando diferentes fuentes de nitrógeno (41).

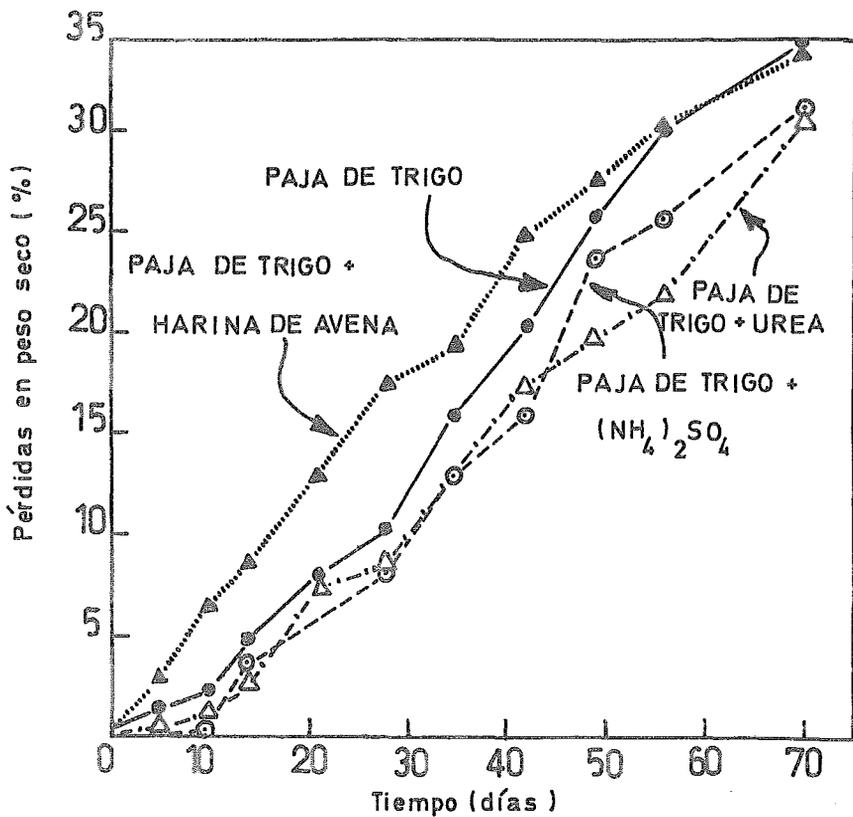


Fig. 21.- Pérdida de material haciendo crecer *Pleurotus ostreatus* en paja de trigo suplementada con diferentes fuentes de nitrógeno (41).

Observando las gráficas, se concluye que sulfato de amonio es la fuente de nitrógeno más apropiada a los 15 días.

- A los 30 días Pleurotus ostreatus consume más lignina cuando se usa harina de avena (34%), con paja de trigo sola (24%), con sulfato de amonio y urea (16 a 17%), con harina de avena consume más celulosa (22%), con paja de trigo sola (12%) y con sulfato de amonio y urea (10%). Las pérdidas son mayores con harina de avena (18%), mientras que con paja de trigo sola llega a 12% y con sulfato de amonio y urea a 9%. A los 30 días las fuentes más apropiadas son sulfato de amonio y urea, ya que con harina de avena hay demasiada pérdida de material. En este experimento no se midió crecimiento.

- A los 70 días se consume más lignina con harina de avena (51%), después con sulfato de amonio (48%), paja de trigo sola (40%) y urea (38%). Se consume más celulosa con urea (45%), después con sulfato de amonio y harina de avena (36 a 40%), y con paja de trigo sola (32%). Las pérdidas son: con urea y sulfato de amonio de 30 a 31% y con harina de avena y paja de trigo sola de 35%.

A los 70 días sulfato de amonio es la mejor fuente de nitrógeno.

La digestibilidad empieza a aumentar después de 20 días, la máxima digestibilidad se alcanza con sulfato de amonio: 100 mg. de azúcares reductores liberados/200 mg. de paja de trigo/24 hrs. Las pruebas de digestibilidad se hicieron con celulasas determinando los azúcares reductores liberados Fig. 22, (41).

Se han hecho otros experimentos con el fin de delignificar sustratos lignocelulósicos y hacerlos más digeribles con Pleurotus ostreatus (48). En esta investigación se usan desperdicios sólidos (mezclas), y se encuentra que la lignina decrece en 10-40% y la celulosa en 15-40% durante la fermentación, pero no cambia el porcentaje de celulosa y lignina cuando se crece en un medio aserrín-avena.

V. CONCLUSIONES DE LA BIBLIOGRAFIA CONSULTADA.

De los métodos que existen para hacer más digeribles los materiales lignocelulósicos, unos los modifican físicamente y otros los delignifican, los primeros son los pretratamientos físicos que resultan muy costosos por la energía que exigen y la digestibilidad no aumenta en gran porcentaje, los segundos son los pretratamientos químicos y microbiológicos.

¿Cuál de los dos pretratamientos es mejor, el químico ó el

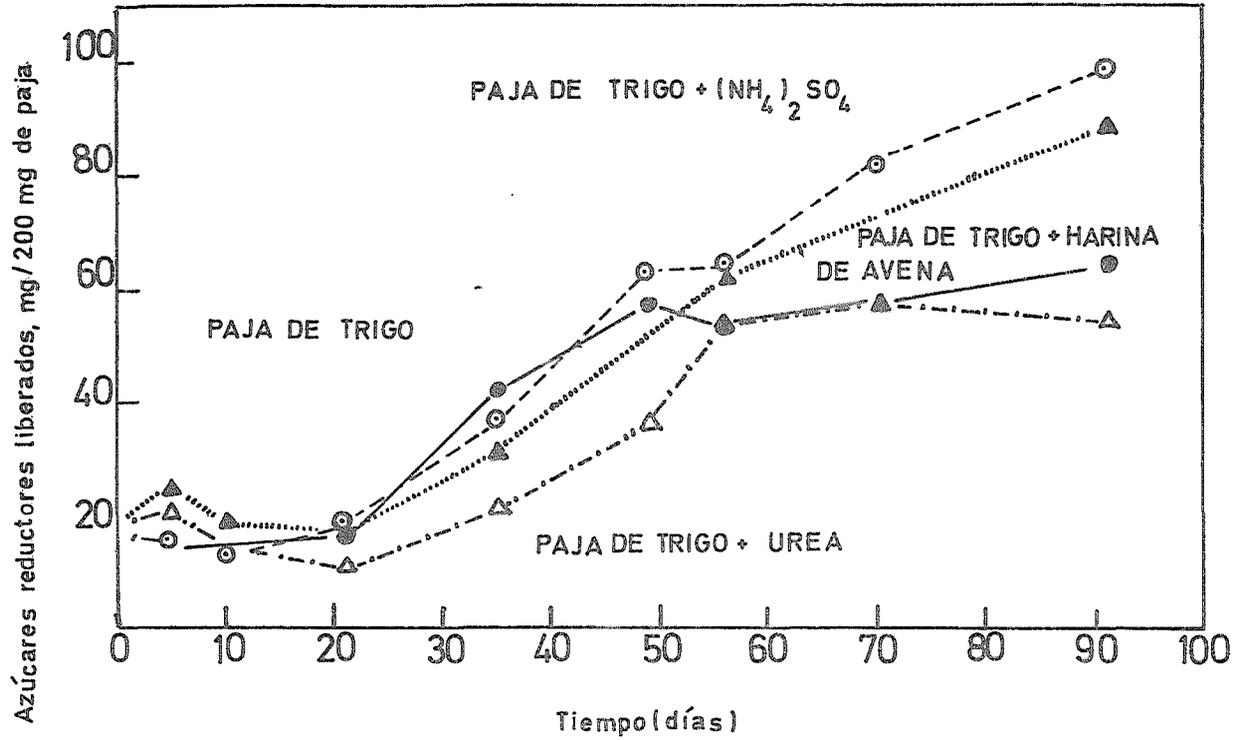


Fig. 22. - Digestibilidad de paja de trigo después de crecer Pleuròtus ostreatus con diferentes fuentes de nitrógeno (41).

microbiológico?

En realidad no se cuenta con información suficiente para resolver este punto ya que se desconoce cuánta lignina y cuánta celulosa se consume en condiciones óptimas de degradación selectiva de lignina en los diferentes materiales lignocelulósicos. A pesar de esto se pueden enumerar algunas posibles ventajas y desventajas del proceso microbiano con respecto al proceso químico.

Ventajas

1.- La degradación de lignina ocurre por fermentación no agitada, esto podría evitar el uso de equipo con el tipo de agitación tradicional que consume energía.

2.- La degradación de lignina es óptima cuando la concentración de nitrógeno en el medio es baja. Esto significa un ahorro en cuanto a materia prima.

3.- El tipo de microorganismo de los que se sabe degradan mejor lignina, pueden hacerlo entre 20 y 30°C significando un ahorro en el gasto de energía, ya que es temperatura ambiente.

4.- No se producen sustancias tóxicas, esto podría evitar la separación del producto de la mezcla de reacción.

Desventajas

1.- En caso de que se pretendiese efectuar el proceso en gran escala, por el clásico método de composteo, sería necesario gastar en mano de obra porque el apilamiento de grandes cantidades de material puede hacer problemáticas las transferencias de masa y calor por lo que un constante movimiento del material sería necesario. En realidad esta desventaja puede ser una ventaja ya que el crear mano de obra en un país como el nuestro resulta necesario, siempre y cuando el proceso sea costeable.

2.- El tipo de microorganismo usado en este proceso (Basilomycetos) crece lentamente ocasionando que la degradación sea un proceso prolongado, al principio, más susceptible a contaminación.

3.- Para una óptima degradación de lignina son necesarias concentraciones altas de oxígeno. Resulta difícil la aeración de cultivos sólidos. Tal vez este problema se pueda superar por medio del diseño de un fermentador adecuado.

4.- ¿Qué tan digerible queda el material después de la -- transformación y cuánto material se pierde como CO₂? Es necesario investigar este punto, ya que es muy probable que sea diferente para cada sistema microorganismo-material-condiciones.

5.- Se conoce poco acerca de las enzimas que degradan lignina.

C. OBJETIVO.

El objetivo principal de este trabajo consiste en seleccionar una ó varias cepas de Pleurotus ostreatus que degraden selectivamente lignina (de un bando de diez), en sustratos lignocelulósicos - naturales: paja de trigo, paja de cebada, rastrojo de maíz y bagacillo de caña.

Las diez cepas de Pleurotus ostreatus provienen de la Facultad de Farmacia y Tecnología de Alimentos, Phillips Universität -- Marburg Marbacher Weg 6, Alemania (RFA).

Cada una de las cepas se obtuvo de cultivos de una sola especie de tres cepas diferentes:

Cepa	Monocariones
<u>Pleurotus ostreatus</u> var. Florida	3a, 6a, 9a, 12a,
<u>Pleurotus ostreatus</u> var. Florida	2I, 2II, 2IV.
<u>Pleurotus ostreatus</u> var. Michigan	M ₁ , M ₄ , M ₁₇ .

Los sustratos usados en este trabajo provienen de diferentes estados de la República Mexicana:

Paja de trigo	Estado de Puebla, Méx.
Paja de cebada	Estado de Hidalgo, Méx.
Rastrojo de Maíz	Estado de México, Méx.
Bagacillo de caña	Estado de Veracruz, Méx.

D. METODOLOGIA.

I. CRECIMIENTO DE Pleurotus ostreatus EN CULTIVO SUMERGIDO CON GLUCOSA COMO FUENTE DE CARBONO.

Con el fin de saber en que forma crecen las diez cepas de Pleurotus ostreatus (pelets pequeños ó grandes, forma y color de los pelets), se crecieron en un medio líquido (42), con glucosa como - fuente de carbono durante diez días en matraces agitados de 125 ml con 20ml de medio. Al final de los diez días se les determinó peso seco para saber cuanto habían crecido.

A una de las diez cepas (2I), se le determinó su curva de crecimiento durante 15 días en las mismas condiciones. Otra segunda curva se llevó a cabo variando el tamaño del matraz, 500 ml, y el volumen del medio, 100 ml. Esta segunda curva se hizo con el objeto de obtener mayores pesos que dieran menos error.

II. CRECIMIENTO DE Pleurotus ostreatus EN CULTIVO SUMERGIDO CON BAGACILLO DELIGNIFICADO COMO FUENTE DE CARBONO.

Con el fin de saber como crecen las diez cepas de Pleurotus ostreatus en medio líquido con holocelulosa (celulosa - hemicelulosa) de bagacillo de caña, se crecieron las diez cepas en el medio indicado anteriormente (42), pero sustituyendo la glucosa por bagacillo delignificado. El bagacillo se delignificó con cloro gaseoso y alcohol-etanolamina, se usó este método por ser específico para eliminar lignina y no hemicelulosa como es el caso del proceso Kraft (23), -- y el método alcalino (24) (27).

El crecimiento en este caso se determinó por el método - - Kjeldahl, debido a la interferencia de la celulosa no fué posible determinararlo por otro método.

Se determinó actividad celulolítica por el método DNS, pero no fué posible determinar actividad específica debido a la falta de - un método para determinar proteína fungal, la peptona del medio in fluyó en la determinación. Estas determinaciones se hicieron al final de diez días de crecimiento.

III. CRECIMIENTO DE Pleurotus ostreatus EN CULTIVO SOLIDO CON CUATRO SUSTRATOS LIGNOCELULOSICOS DIFERENTES COMO FUENTE DE CARBONO.

Con el fin de elegir una de las diez cepas en cuanto a su capacidad para delignificar específicamente se hicieron experimentos en medio sólido.

Los sustratos se molieron con el fin de tener muestras lo -- más homogéneas posible y fáciles de analizar de acuerdo a los métodos TAPPI (21).

La cantidad de nitrógeno que se usó es la reportada por Kirk (37), para una buena delignificación.

No se usó otro nutriente con el fin de hacer los experimentos en las condiciones más económicas posibles.

Se eligió el sulfato de amonio por ser la mejor fuente de nitrógeno para delignificar selectivamente según los trabajos reportados (41).

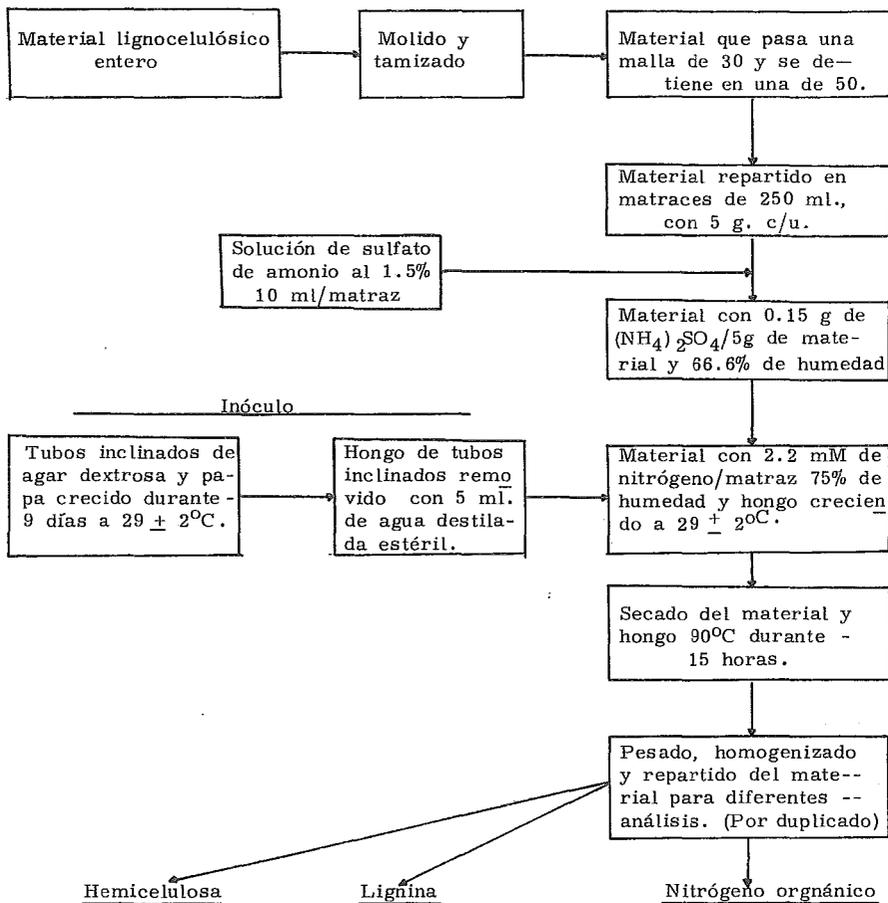
La secuencia de este experimento se observa en el esquema 1.

Los materiales empleados fueron: bagacillo de caña, paja de trigo, paja de cebada y rastrojo de maíz. Estos experimentos se hicieron durante 15 días.

La cepa 2I se creció en los cuatro sustratos durante un mes con el fin de analizar la degradación a este tiempo.

IV. CRECIMIENTO DE Pleurotus ostreatus (2I) DURANTE 30 DIAS EN MEDIO SOLIDO CON RASTROJO DE MAIZ Y TRES DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SULFATO DE AMONIO.

Este experimento se hizo con el fin de observar el efecto de concentraciones mayores de nitrógeno en la degradación de lignina.



Esquema 1.- Diagrama de bloque de la metodología empleada en la selección de una ó varias cepas de Pleurotus ostreatus.

E. METODOS Y MATERIALES.

Las técnicas y material empleadas para la determinación de lignina, azúcares, nitrógeno orgánico, actividad celulolítica, crecimiento y curvas de crecimiento son las siguientes:

1.- Determinación de lignina (42).

Material	Reactivos
Tubos de ensaye 10 x 10 mm.	Acido Sulfúrico "Baker"
Varilla de vidrio 5 x 140 mm.	Grado Analítico al 72%
Baño 30°C	p/p
Probeta 50 ml.	Benceno-etanol 2:1 ambos
Pipetas de 10 ml.	"Baker" grado analítico
Pipetas de 2 ml.	
Matraces Erlenmeyer 125 ml.	
Kitasato 1000 ml.	
Embudo Buchner 10 cm.	
Papel filtro whatman No. 41	
Estufa	
Balanza analítica	
Extractor Soxhlet	

Método

Se extrae la muestra con benceno-etanol 2:1 durante 8 horas. Se pesan 200 mg. de la muestra extraída y seca en un tubo de ensaye de 10 x 100 mm. Se agregan 2 ml. de ácido sulfúrico al 72% p/p, se mezcla y macera con una varilla de vidrio.

Se coloca en un baño de 30°C durante una hora. Se vierte cuantitativamente el contenido del tubo de ensaye en un matraz Erlenmeyer de 125 ml. con 56 ml. de agua destilada. Se coloca el matraz en un autoclave durante 1 hora a 120°C. Se deja enfriar y se filtra el contenido en un papel Whatman No. 41, previamente tarado. Se lava el filtrado muy bien con agua destilada. Se seca en una estufa durante 8 horas a 90°C, se deja enfriar en un desecador y se pesa.

Cálculo

$$\% \text{ lignina} = \frac{\text{Peso de lignina} \times 100}{\text{Peso de la muestra}}$$

2.- Determinación de nitrógeno total orgánico (43).
(Micro-Kjeldahl)

Material empleado	Reactivos
Matraz micro-Kjeldahl. 30 ml.	Acido sulfúrico concentra
Parrilla digestora	do "Baker" grado reacti-
Matraz Erlenmeyer 250 ml.	vo analítico.
Matraz Erlenmeyer 50 ml.	Mezcla catalizadora de -
Pipetas 10 ml.	selenio (Merck).
Buretas 50 ml.	Acido bórico "Baker" al
Tripie con diámetro de 20 cm.	4% p/v grado analítico.
Aparato de destilación micro-	Acido clorhídrico "Baker"
Kjeldahl (Fig. 1).	grado analítico .01N.
	Hidróxido de sodio "Ba-
	ker" grado analítico 50%
	p/v.

Método

En este caso como las muestras contenían nitrógeno del hongo y nitrógeno del sulfato de amonio añadido, fue necesario dializar las muestras antes de la determinación, para ello se usaron tubos de dialisis de 35 mm x 100. Una vez seca la muestra, se pesan de 100 - 200 mg, se envuelve en papel glassine y se introduce en el matraz micro-Kjeldahl, se añaden aproximadamente 0.5 g de mezcla catalizadora y 5ml. de ácido sulfúrico concentrado, se coloca en la parrilla digestora reclinando el matraz sobre el tripie formando así un ángulo de 45° con la vertical. Se deja digerir hasta que desaparezcan todas las partículas negras.

Se vierte el contenido del matraz Kjeldahl en la copa receptora del aparato de destilación, se lava dos veces con 5 ml. de agua destilada y después se lava la copa con 10 ml. de agua destilada.

Se colocan 15 ml. de ácido bórico al 4% con unas gotas de indicador verde de bromocresol (amarillo en medio ácido), en un matraz Erlenmeyer de 50 ml.

Se agregan al bulbo receptor de la muestra unas gotas de fenolftaleína.

Se colocan en la copa 10 ml. de hidróxido de sodio al 50% y se dejan caer lentamente en el bulbo receptor, cuando la mezcla vira a rojo, inmediatamente se introduce la cola del refrigerante en el matraz Erlenmeyer de 50 ml. conteniendo ácido bórico al 4%, de tal for

ma que el refrigerante quede sumergido en éste. Se continua agregando el resto de hidróxido de sodio; en este caso se debe tener -- precaución para que no haya sifoneo de la muestra. Cuando se -- han destilado 50 ml., se separa el matraz Erlenmeyer del aparato y se vierte cuantitativamente su contenido en un matraz Erlenmeyer de 250 ml. Se titula con ácido clorhídrico .01 N.

Cálculo

$$\%N = \frac{V_{HCl} \times N_{HCl} \times .014 \times 100}{g \text{ de muestra}}$$

.014.- miliequivalente del nitrógeno.

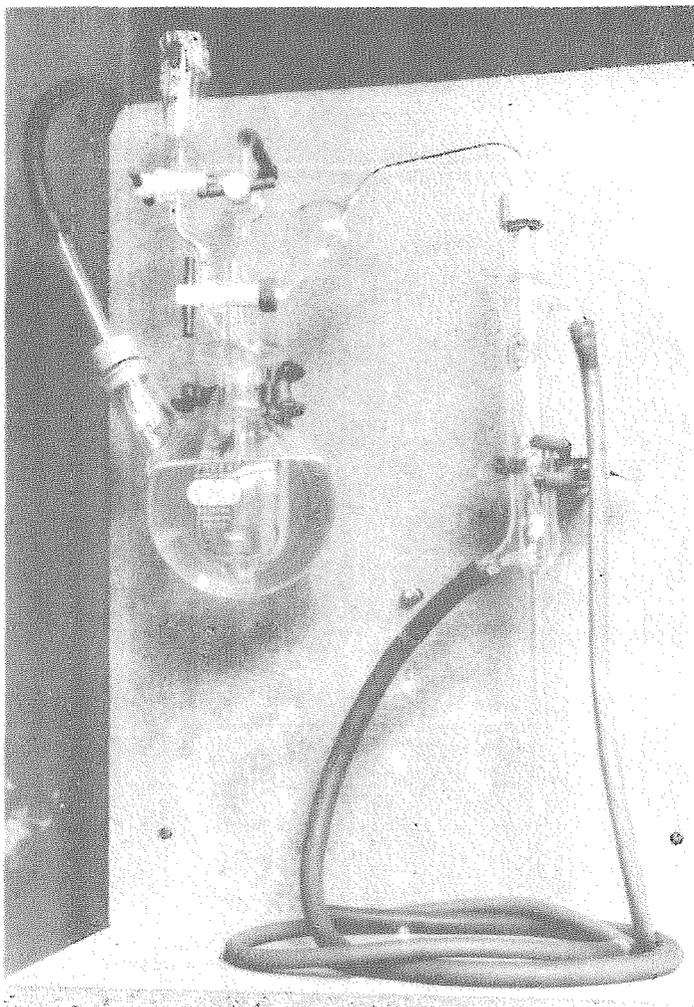


Fig. 1E. - Aparato de destilación micro-kjeldahl, usado en la determinación de nitrógeno total orgánico.

3.- Determinación de azúcares.

Fundamento

Los polisacáridos contenidos en los materiales ligno-celulósicos (celulosa, hemicelulosa, monosacáridos), son susceptibles en diferente grado a la hidrólisis ácida. Este fenómeno queda expresado por los diferentes valores de las constantes de velocidad de reacción (31), los cuales son posibles de obtener mediante las siguientes ecuaciones.

Celulosa

Azúcares reductores

Azúcares des-
compuestos.

Hemicelulosa

$$K_1 = 2.77 \times 10^{16} \left[C_{ac}^{1.314} \right] e^{-36369/RT}$$

$$K_2 = 1.51 \times 10^{14} \left[C_{ac}^{1.105} \right] e^{-32229/RT}$$

$$K_3 = 9.005 \times 10^5 \left[C_{ac}^{0.945} \right] e^{-13062/RT}$$

Donde:

C_{ac} = Concentración del ácido empleado en la hidrólisis en porción p/v.

T = Temperatura a la cual se lleva a cabo la hidrólisis en °K.

R = Constante de los gases en cal/mol.

Dadas las condiciones:

$$C_{ac} = 72\% \text{ p/v}$$

$$T = 303 \text{ °K}$$

$$\text{Tiempo} = 60 \text{ min.}$$

Con las condiciones anteriores los valores de las constantes son:

$$K_1 = 1.55 \times 10^{-10}$$

$$K_2 = 8.39 \times 10^{-10}$$

$$K_3 = 2.87 \times 10^{-4}$$

Considerando la hidrólisis ácida como una reacción de primer orden tenemos:

$$\int_{A_1}^{A_2} \frac{dA}{A} = \int_{t_1}^{t_2} Kt = -(1nA_2 - 1nA_1) = K(t_2 - t_1)$$

dónde $t_1 = 0$

$t_2 = 60 \text{ min.}$

Si inicialmente tenemos 30 mg de hemicelulosa, al final nos quedaran: (entodos los casos los miligramos se encuentran en un volumen de 2 ml.)

$$-1nA_2 = K(t_2 - t_1) - 1nA_1$$

$$-1nA_2 = 2.87 \times 10^{-4} (60 \text{ min}) - 1n30$$

$$-1nA_2 = 2.87 \times 10^{-4} (60 \text{ min}) - 3.4$$

$$-1nA_2 = 3.39$$

$$A_2 = \text{antilog } 3.39 = 2.46 \text{ mg.}$$

En el caso de celulosa, si inicialmente tenemos 60 mg.

$$-1nA_2 = 1.55 \times 10^{-10} (30 \text{ min}) - 1n60$$

$$-1nA_2 = 1.55 \times 10^{-10} (30 \text{ min}) - 4.09$$

$$-1nA_2 = -4.09$$

$$A_2 = 60 \text{ mg}$$

Suponiendo que los 30 mg de hemicelulosa se hayan transformado a azúcares reductores, bajo estas condiciones la cantidad de azúcares reductores que se transforme a azúcares descompuestos -- será:

$$-1nA_2 = 8.39 \times 10^{-10} (30 \text{ min}) - 1n30$$

$$-1nA_2 = 8.39 \times 10^{-10} (30 \text{ min}) - 3.4011$$

$$-1nA_2 = -3.401$$

$$A_2 = 29.9 \text{ mg.}$$

Estos resultados implican que a estas condiciones sólo hay hidrólisis de hemicelulosas a azúcares reductores y no de celulosa a hemicelulosa, ni de azúcares reductores a azúcares descompuestos. Por tanto, después de la hidrólisis a estas condiciones es posible - saber el contenido de hemicelulosa con una prueba de azúcares reductores.

Material	Reactivos
Tubos de ensaye 10 x 10 mm.	Acido sulfúrico "Baker"
Varilla de vidrio 5 x 140 mm.	grado analítico 72% p/v
Baño 30°C	Reactivo DNS
Baño 92°C	Acido 3,5 di-nitro salicílico "Sigma" grado analítico.....8 g/l
Matraces Erlenmeyer 125 ml.	Hidróxido de sodio "Baker" grado analítico
Probetas 25 ml.14 g/l
Pipeta 10 ml.	Tartrato de sodio y potasio "Baker" grado analítico.....216 g/l
Canicas.	Fenol "Baker" grado analítico.....5.4 g/l
Colorímetro (550 nm).	Meta-bisulfito de sodio "Baker" grado analítico.....5.9 g/l
Papel filtro Whatman No. 4	Hidróxido de sodio "Baker" al 20%.
Kitasato 500 ml.	
Embudo Buchner.	

Método.

Se pesan 100 mg de muestra en un tubo de ensaye de 10 x 10 mm., se añaden 2 ml. de ácido sulfúrico al 72% p/v, se agita - el contenido del tubo perfectamente con una varilla de vidrio, se co - loca el tubo en un baño a 30°C durante una hora. Se vierte el con - tenido del tubo en un matraz de 125 ml. con 20 ml. de agua desti - lada, se mezclan perfectamente y se filtra al vacío en un embudo - Buchner y papel filtro Whatman No. 4, recibiendo el filtrado en un tubo de 50 ml. que se encuentra colocado dentro del Kitasato.

Se toman 0.5 ml. de filtrado en un tubo de ensaye 20 x 150 mm., se agregan 0.5 ml. de hidróxido de sodio al 20% con el fin de neutralizar el filtrado y se añaden 0.5 ml. de agua destilada. - Se agregan 3 ml. de reactivo DNS y se agita el tubo, se tapa con una canica y se coloca en un baño a ebullición, durante 5 min., se sacan, se agregan 16 ml. de agua destilada y se lee en un colorí-

metro a 550 nm.

Se hace una curva estándar con un azúcar reductor, en este caso se hizo con xilosa, y se lee en ella los mg de azúcares contenidos en 0.5 ml. de muestra.

$$\% \text{ de azúcares (hemicelulosa)} = \frac{\text{mg leídos en la curva} \times 40 \times 100}{\text{peso de la muestra en mg.}}$$

40.- Factor de dilución.

4.- Control del inóculo.

Material

Tubos de rosca 20 x 150 mm.
Pipetas de 10 ml.
Autoclave.

Reactivos

Medio:
Agar dextrosa y papa
(Bioxon)

Método.

Se preparan tubos inclinados con 15ml. de medio agar dextrosa y papa(Bioxon), se esterilizan durante 20 min. a 120°C, se inclinan y se dejan enfriar.

Se siembran con una asada de Pleurotus ostreatus y se dejan crecer durante 9 días a 27 ± 2°C. Se desprende el micelio con una asa, se agregan 5 ml. de agua destilada y se vierte el contenido sobre el material que se desea inocular procurando que el agar permanezca en el tubo.

5.- Determinación de actividad celulolítica, método 3, 5
dinitro-salicílico (44).

Material

Tubos de ensaye 20 x 150 mm

Baño 50°C

Baño ebullición

Pipetas 10 ml., 1 ml., .5 ml., .2 ml., .1 ml.

Papel filtro Whatman No. 1 en tiras de 1 x 6 cm.

Reactivos

Reactivo 3,5 DNS (descrito en la técnica anterior)

Buffer de citratos 0.1M pH 4.8, se usaron reactivos "Baker" grado analítico.

Solución estándar de glucosa 1000 /ml.

Método.

Se prepara una curva estándar como lo indica el siguiente esquema:

Tubo	Solución estándar (ml)	Buffer (ml)				
1	0.1	1.4	3 ml de DNS	Hervir 5 min, baño maría	16 ml de H ₂ O destilada	Leer a 550 nm,
2	0.2	1.3				
3	0.3	1.2				
4	0.4	1.1				
5	0.5	1.0				
6	0.6	0.9				
7	0.7	0.8				
8	0.8	0.7				
9	0.9	0.6				
Blanco	1.0	0.5				

La actividad celulolítica se mide como indica el siguiente esquema:

X ₁	1 ml Buffer	0.5 ml de filtrado	Papel filtro 1 x 6 cm.	Baño maría 50°C, 1 hora	3 ml DNS	Hervir 5 min baño maría	16 ml H ₂ O destilada	Leer a 550 nm.
X ₂								
.								
.								
Blanco								

El tiempo de crecimiento, al cual se hizo la determinación, fue de 10 días.

El filtrado se obtuvo filtrando todo el contenido del matraz de 125 ml., el cual contenía 20 ml. de medio, a través de un papel filtro Whatman No. 1.

6.- Técnicas para determinar crecimiento y curvas de crecimiento de *Pleurotus ostreatus*.

Materia]

Matraces Erlenmeyer 125 ml.
Probeta 20 ml.
Potenciómetro
Autoclave
Agitadora
Balanza analítica

Medio (45).

D-glucosa	20 g/l
Peptona (Bioxon)	2 g/l
Mono-fosfato de potasio	0.5 g/l
Sulfato de magnesio	0.5 g/l
Cloruro de calcio	0.1 g/l
Clorhidrato de tiamina	100 g
Citrato de sodio	0.1%
pH	6.5

Todas las sales mencionadas se usaron en grado analítico de la marca "Baker".

Método.

Preparar el medio necesario, ajustar el pH, colocar 20 ml. de medio en matraces Erlenmeyer de 125 ml., se esterilizan a 120°C durante 20 min., se dejan enfriar a temperatura ambiente y se inoculan con una asada de *Pleurotus ostreatus*, crecido previamente en agar dextrosa y papa. Se ponen en agitación a 29°C. Se determina peso seco al tiempo requerido.

Método para determinar peso seco.

Se filtra todo el contenido del matraz en papel Whatman No. 1 con vacío. El papel debe estar previamente tarado.

Se lava el micelio con agua destilada, tres veces con 10 ml. cada una.

Se seca a 100°C durante 15-20 min. (ver apéndice, punto 8).

Se deja enfriar en un desecador y se pesan lo más rápido posible en balanza analítica.

F. RESULTADOS.

I. CRECIMIENTO DE *Pleurotus Ostreatus* EN CULTIVO SUMERGIDO CON GLUCOSA COMO FUENTE DE CARBONO.

a) *Pleurotus ostreatus* creció en medio líquido, con glucosa como fuente de carbono, en forma de pelets. Después de crecer durante diez días, se determinaron los pesos secos de tres corridas para las diez cepas. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 1F.

Tabla 1F. Crecimiento de las diez cepas de *Pleurotus ostreatus* en medio líquido con glucosa como fuente de carbono y agitación después de diez días de crecimiento.

Corrida	1	2	3	Promedio
Cepa	Peso seco mg/20 ml.	Peso seco mg/20 ml.	Peso seco mg/20 ml.	Peso seco mg/20 ml.
2 I	91	21.7	47.8	53.5
2 II	20	23.2	21.2	21.4
2 IV	40	24.4	27.7	30.7
3 a	38	25.6	29.2	30.9
6 a	46	20.3	36.3	34.2
9 a	29	18.7	10.9	19.5
12 a	26.1	12.9	19.1	19.3
M ₁	15	17.6	18.2	16.9
M ₄	12	18.6	15.2	15.2
M ₁₇	22	13.5	12.4	15.9

b) Se determinó la curva de crecimiento para la cepa 2I, - los resultados por triplicado se muestran en la Tabla 2F.

Tabla 2F. Curvas de crecimiento de la cepa 2I en medio líquido con glucosa y agitación.

1a. Curva		2a. Curva		3a. Curva	
Tiempo (horas)	Peso seco mg/20 ml	Tiempo (horas)	Peso seco mg/20 ml	Tiempo (horas)	Peso seco mg/20 ml
41	1.8	74.5	1.7	48	3.8
96	5.3	104.0	5.6	72	12.7
137	7.6	194.0	13.6	151	23.3
192	16.2	271.5	21.6	175	36.5
288	43.4	341.2	36.9	216	46.9
425	46.5	372.5	36.1	438	64.2
		389.5	41.1		
		413.5	66.4		

c) Se determinó la curva de crecimiento de la cepa 2I en -- 100 ml. de medio, Tabla 3F.

Tabla 3F. Curva de crecimiento de la cepa 2I en 100 ml. de medio líquido con glucosa y agitación.

<u>Tiempo</u> <u>(horas)</u>	<u>Peso seco</u> <u>mg/100ml</u>
36.5	7.3
94.0	18.2
108.0	26.2
143.0	47.9
182.0	30.8
216.0	87.1
255.0	145.0
291.0	193.0

El crecimiento de las diez cepas de Pleurotus ostreatus después de diez días se encuentra en la gráfica 1F, se graficaron únicamente los resultados promedio.

Las curvas de crecimiento de la cepa 2I, se encuentran graficados en las gráficas 2F - 5F.



II. CRECIMIENTO DE Pleurotus ostreatus EN CULTIVO SUMER-
GIDO CON BAGACILLO DELIGNIFICADO COMO FUENTE DE
CARBONO.

En este caso el crecimiento se midió determinando nitrógeno total por el método Kjeldahl. Los resultados obtenidos se encuentran en la Tabla 4F.

Tabla 4F. Crecimiento de las diez cepas de Pleurotus ostreatus, en bagacillo de caña delignificado, medio líquido y agitación, - después de diez días.

Corrida	1	2	Promedio
Cepa	ml.de HCl (.416N)	ml.de HCl (.416N)	ml.de HCl (.416N)
2I	0.15	3.35	1.75
2II	0.40	0.70	0.55
2IV	10.30	4.8	7.50
3a	32.2	0.15	16.1
6a	10.2	0.10	5.15
9a	0.10*	-	0.1
12a	0.3	0.12	0.21
M ₁	0.05	0.2	0.12
M ₄	0.10	1.2	0.65
M ₁₇	0.3	0.2	0.25

*Los valores menores de 1 ml. en realidad se determinaron -- con ácido 0.1N, pero se hicieron cálculos para reportarlos en ácido 0.4N con el fin de que la tabla quedara uniforme.

En el experimento anterior también se determinó actividad ce lulolítica, los resultados se encuentran en la Tabla 5F.

Tabla 5F. Actividad celulolítica de las diez cepas de Pleurotus ostreatus, después de crecer diez días en medio líquido con baga cillo delignificado como fuente de carbono.

Cepa	D. O. (a)	mg/glucosa/ml/hora
2I	0.387	0.155
2I _B	0.250	
2II	0.390	0.150
2II _B	0.252	
2IV	0.325	0.128
2IV _B	0.197	
3a	0.250	0.095
3a _B	0.155	
6a	0.330	0.105
6a _B	0.225	
9a	-	
9a _B		
12a	0.530	0.293
12a _B	0.237	
M ₁	0.430	0.250
M _{1B}	0.180	
M ₄	0.572	0.322
M _{4B}	0.250	
M ₁₇	0.675	0.275
M _{17B}	0.400	

a.- Ver apéndice, punto 7

B.- El subíndice significa blanco.

III. CRECIMIENTO DE *Pleurotus ostreatus* EN CULTIVO SOLIDO CON CUATRO SUSTRATOS LIGNOCELULOSICOS DIFERENTES COMO FUENTE DE CARBONO.

Pleurotus ostreatus creció en bagacillo de caña, paja de trigo, paja de cebada y rastrojo de maíz suplementados con una solución al 10% de sulfato de amonio. Los resultados del análisis del material después de crecer *Pleurotus ostreatus* durante quince días fueron los siguientes:

Cuando se usó bagacillo de caña (Tabla 6F).

Tabla 6F. Resultados después de crecer *Pleurotus ostreatus* en bagacillo de caña y sulfato de amonio en medio sólido sin agitación.

Cepa	Peso (g)	Azúcares* mg/ml	Lignina mg/200 mg de muestra	ml. HCl (.0103N)
2I	4.7	1.17	51.6	8.1
2II	4.7	1.18	54.3	7.4
2IV	4.6	1.02	56.3	7.9
3a	4.5	1.24	55.0	7.8
6a	4.6	1.36	55.0	7.3
9a	4.7	1.46	57.0	7.2
12a	4.6	1.13	53.2	7.6
M ₁	4.5	1.13	54.6	7.9
M ₄	4.6	1.26	51.8	7.4
M ₁₇	4.5	1.18	44.4	7.9
Testi go.	5.0	1.28	55.6	2.07

Estos resultados son promedios de cuatro muestras, el experimento se hizo por duplicado y cada matraz se analizó por duplicado.

* Ver apéndice, punto 5.

Cuando se usó paja de trigo (Tabla 7F).

Tabla 7F. Resultados después de crecer Pleurotus ostreatus en paja de trigo y sulfato de amonio en medio sólido sin agitación.

Cepa	Peso (g)	Azúcares* mg/ml	Lignina mg/200mg de muestra	ml. HCl (.0103N)
2I	4.7	1.82	20.6	14.84
2II	4.7	1.78	20.2	14.46
2IV	4.5	1.66	22.6	15.29
3a	4.6	1.7	22.4	14.27
6a	4.6	1.64	24.4	13.0
9a	4.6	1.69	27.0	17.2
12a	4.5	1.64	26.8	17.2
M ₁	4.5	1.58	22.0	9.5
M ₄	4.6	1.74	26.0	16.7
M ₁₇	4.5	1.58	26.8	20.5
Testi go	5.0	1.95	25.6	4.4

* Ver apéndice, punto 5.

Cuando se usó paja de cebada (Tabla 8F).

Tabla 8F. Resultados después de crecer Pleurotus ostreatus en paja de cebada y sulfato de amonio en medio sólido sin agitación.

Cepa	Peso (g)	Azúcares* mg/ml	Lignina mg/200mg de muestra	ml. HCl (.0103N)
2I	4.7	1.34	35.6	11.9
2II	4.7	1.35	36.1	10.3
2IV	4.5	1.31	35.8	7.1
3a	4.6	1.30	41.8	7.4
6a	4.6	1.35	41.6	10.4
9a	4.6	1.29	38.8	9.2
12a	4.5	0.19	40.0	7.8
M ₁	4.5	1.02	34.8	10.4
M ₄	4.6	1.04	38.6	16.2
M ₁₇	4.5	1.02	42.6	10.2
Testi go.	5.0	1.48	38.8	3.7

* Ver apéndice, punto 5.

Cuando se usó rastrojo de maíz (Tabla 9F)

Tabla 9F. Resultados después de crecer Pleurotus ostreatus en rastrojo de maíz y sulfato de amonio en medio sólido sin agitación.

Cepa	Peso (g)	Azúcares* mg/ml	Lignina mg/200 mg de muestra	ml. HCl (.0103N)
2I	4.5	1.35	35.4	8.2
2II	4.6	1.41	35.0	6.3
2IV	4.4	1.33	36.0	10.7
3a	4.7	1.42	34.0	8.6
6a	4.6	1.4	32.2	6.7
9a	4.3	1.28	35.4	10.9
12a	4.5	1.47	34.8	5.4
M ₁	4.5	1.36	33.4	2.7
M ₄	4.5	1.35	32.4	6.5
M ₁₇	4.5	1.35	32.4	4.6
Testi go.	5.0	1.50	28.2	-

* Ver apéndice, punto 5.

La cepa 2I de Pleurotus ostreatus se creció durante treinta días en los cuatro sustratos lignocelulósicos; los resultados obtenidos después de hacer los análisis correspondientes se muestran en la Tabla 10F.

Tabla 10F. Resultados después de crecer Pleurotus ostreatus (2I), en cuatro sustratos lignocelulósicos y sulfato de amonio en medio sólido sin agitación.

Sustrato	Peso (g)	Azúcares* mg/ml	Lignina mg/200 mg de muestra	ml. HCl (.0103N)
Paja de cebada	4.0	1.28	32.4	6.59
Rastrojo de maíz	4.0	1.22	29.0	7.16
Paja de trigo	4.1	1.44	20.2	6.7
Bagacillo de caña	4.3	1.10	48.8	5.7
Rastrojo sin hongo	5.0	2.62	28.2	-
Paja de cebada sin hongo	5.0	2.54	38.8	3.7
Paja de trigo sin hongo	5.0	3.02	25.6	4.4
Bagacillo de caña sin hongo	5.0	2.40	47.2	1.9

* Ver apéndice, punto 5.

IV. CRECIMIENTO DE Pleurotus ostreatus (2I), DURANTE 30 DIAS EN MEDIO SOLIDO CON RASTROJO DE MAIZ Y TRES CONCENTRACIONES DIFERENTES DE SULFATO DE AMONIO.

Los resultados de este experimento se muestran en la Tabla 11F.

Tabla 11F. Experimento con Pleurotus ostreatus (2I), creciendo en rastrojo de maíz con tres concentraciones de sulfato de amonio. Se añadieron a 5g de rastrojo 10 ml de una solución al 3%, 6% y 9% de sulfato de amonio respectivamente.

	Pérdida de material			Hemicelulosa remanente			Lignina remanente			Crecimiento		Tiempo Semanas
	%C'	g/g de rastrojo	% de pérdida	%C'	g/g de rastrojo	% de pérdida	%C'	g/g de rastrojo	% de pérdida	%C'	Crecimiento	
9	0.00	0.0	9	0.320	1.20	9	0.136	6.8	9	-		
6	0.02	2.0	6	0.302	6.70	6	0.139	4.8	6	+	1	
3	0.06	4.0	3	0.300	7.40	3	0.141	2.8	3	++		
9	0.00	0.0	9	0.252	22.20	9	0.136	6.8	9	+		
6	0.096	9.6	6	0.222	31.40	6	0.164	-	6	++	2	
3	0.100	10.0	3	0.236	27.10	3	0.146	0.0	3	+++		
9	0.050	5.0	9	0.272	16.00	9	0.150	-	9	+		
6	0.100	10.0	6	0.262	19.10	6	0.148	-	6	+++	3	
3	0.226	22.6	3	0.210	35.10	3	0.146	0.0	3	++++		
9	0.056	5.6	9	0.314	3.00	9	0.136	5.4	9	+		
6	0.116	11.6	6	0.300	7.40	6	0.152	-	6	++	4	
3	0.160	16.0	3	0.272	16.00	3	0.148	-	3	++++		

%C'.- Porcentaje de sulfato de amonio en la solución añadida.

Los casos en los cuales no se reporta el % de pérdida de lignina dieron valores mayores que el testigo.

G. DISCUSSION.

I. CRECIMIENTO DE *Pleurotus ostreatus* EN CULTIVO SUMERGIDO CON GLUCOSA COMO FUENTE DE CARBONO.

Este experimento se hizo con el objeto de conocer la forma de crecimiento de las diez cepas de *Pleurotus ostreatus*, saber si crecía en forma micelial ó en pelets, el tamaño y color de los mismos, etc., familiarizándose así con su manejo. Originalmente las cepas se conservaban en tubos inclinados presentando un crecimiento algodonoso - de color blanco, siendo el micelio duro y chicloso.

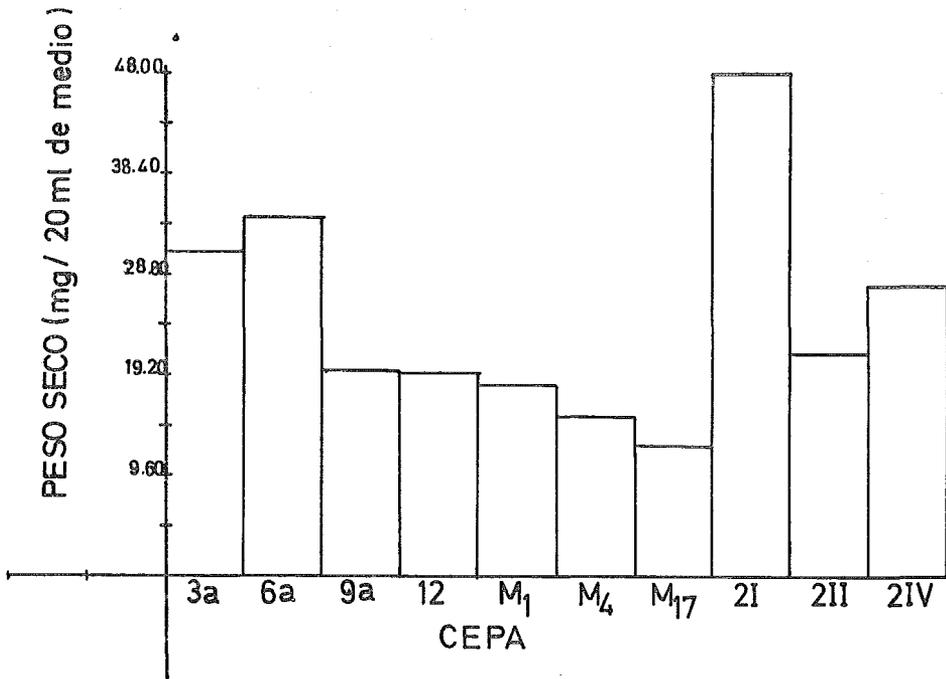
Se eligió un medio completo optimizado para *Pleurotus ostreatus* de acuerdo a la literatura (45), para así observar las diferencias entre las diez cepas en cuanto a eficiencia de utilización del sustrato cuando se encuentran en condiciones óptimas para crecer en cultivo - sumergido.

El cultivo sumergido con glucosa como fuente de carbono inicialmente se eligió por ser más fácil de manejar que el sistema con sustrato sólido. Ya que en este experimento sólo se pretendía conocer las diez cepas en cuanto a su forma de crecimiento no importa - cual sea el sustrato empleado como fuente de carbono y energía, siempre y cuando sea degradable por *Pleurotus ostreatus*.

Los resultados obtenidos de cada una de las corridas, Tabla 1F y el promedio aritmético calculado, con el cual se construyó la Gráfica 1G, muestran claramente que todas las cepas de *Pleurotus ostreatus* pueden crecer en cultivo sumergido con glucosa como fuente de -- carbono, pero no todas las cepas aprovechan la glucosa con la misma eficiencia, en general las cepas 2I, 2II, 2IV, 3a y 6a (monocariones de dos cepas variedad Florida), son más eficientes que las cepas 9a - 12a (monocariones variedad Florida), y M₁, M₄ y M₁₇ (monocariones de una cepa variedad Michigan).

En la Tabla 1F se observa que el peso seco determinado a cada cepa al final de cada corrida (a los diez días de crecimiento), no fué reproducible, por ejemplo, la cepa 2I en la primera corrida pesó 91 - mg/20 ml., en la segunda 21.7 mg/20 ml., y en la tercera 47.8 mg/20 ml.

En todos los casos *Pleurotus ostreatus* creció en forma de pelets, los cuales no fueron iguales en número y tamaño, en algunos casos creció un sólo pelet grande Fig. 1G, y en otros muchos pelets pequeños y grandes Fig. 2G. Cuando un microorganismo crece en forma de pelets, la transferencia de oxígeno disuelto en el medio al centro del pelet disminuye conforme aumenta el radio del pelet y este efecto puede llegar a ser un factor limitante de crecimiento (6). Quizá los pesos secos no reproducibles se deban a que en unos casos hubo mejor



Graf. 1G.- Crecimiento de 10 cepas de Pleurotus ostreatus después de 10 días en medio líquido con glucosa.

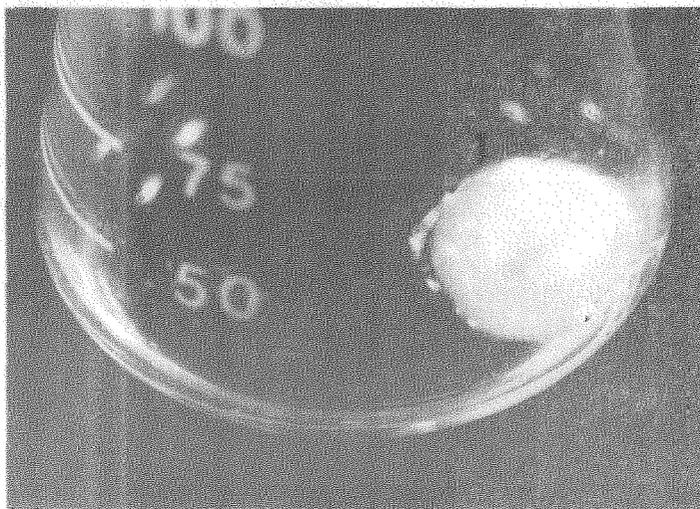


Fig. 1G. - Crecimiento de Pleurotus ostreatus después de 10 días, en medio líquido con glucosa, creció con solo pelet.



Fig. 2G. - Crecimiento de Pleurotus ostreatus después de 10 días en medio líquido con glucosa, crecieron muchos pellets.

transferencia de oxígeno que en otros debido a los diferentes tamaños de pelets, originándose así, quizá un estado de anaerobiosis en el centro del pelet. Otra consideración que favorece la suposición anterior es que generalmente los microorganismos transforman 50% en peso (valor aproximado), de la fuente de carbono, cuando ésta es un azúcar, en biomasa. Lo anterior se cumple cuando todos los demás nutrientes se encuentran en cantidades no limitantes (49). En este caso se usó un medio con 20 g de glucosa/l, en estas condiciones con una bacteria que no crece en pelets se obtendría 10 g/l, con la cepa 2I se obtuvieron 2 g/l. Este resultado sugiere que probablemente esté limitando el crecimiento otro nutriente, que suponemos es el oxígeno.

En algunos casos el tiempo de cultivo fué de más de diez días, encontrándose en ocasiones disminución del peso seco.

Otro aspecto importante en la evaluación de un proceso microbiano es la velocidad específica de crecimiento del microorganismo usado. En promedio la cepa 2I creció más que las demás, por tanto a esta cepa se le determinó su curva de crecimiento. Debido al crecimiento en pelets se decidió de terminar la curva de crecimiento por el método de sacrificio de matraz ya que debido a los pelets diferentes, las muestras no serían representativas. Se determinó la curva de crecimiento solamente a la cepa 2I porque para determinar curvas de crecimiento a diez cepas durante quince días por el método de sacrificio de matraz se requiere mayor equipo y material que con el que se contó

Las curvas de crecimiento de la cepa 2I tampoco fueron reproducibles, Tabla 2F, así a las 400 horas aproximadamente, en la primera curva, el peso seco es de 46.5 mg/20 ml., pero en la segunda y tercera curvas es de 65 mg/20 ml. aproximadamente. Con el objeto de obtener pesos mayores y por tanto menor error en la determinación de peso seco, se hizo la curva de crecimiento con inóculos mayores y con mayor cantidad de medio, los resultados se muestran en la Tabla 3F, en la cual también se aprecian discrepancias, a las 182 horas el peso seco es de 30.8 mg/100 ml., siendo que el punto anterior a las 143 horas fué de 47.9 mg/100 ml., y el punto posterior a las 216 horas de 87.1 mg/100 ml. Por tanto, se supone que estas discrepancias no se deben a errores en la determinación de peso seco sino al efecto de los pelets en la transferencia de oxígeno, mencionado anteriormente, y a la metodología usada ya que si una curva de crecimiento se hace sacrificando matraces, los puntos que se obtengan dependerán del inóculo de cada matraz, por tanto la velocidad de crecimiento puede verse modificada aparentemente por el inóculo.

A pesar de los resultados no reproducibles se calculó, aproximadamente, la velocidad específica de crecimiento de Pleurotus ostreatus (2I).

Tenemos que la velocidad de crecimiento es

$$\mu = \frac{dx}{dt} \frac{1}{x}$$

donde x = peso seco (mg/20 ml)

t = tiempo (horas)

μ = velocidad específica de crecimiento

Considerando μ constante (lo cual se puede considerar cierto en la fase log de crecimiento), e integrando tenemos

$$\mu t = \ln \frac{x}{x_0} + C$$

Esta es la ecuación de una línea recta donde μ es la pendiente, por tanto, si se grafica $\ln x$ vs t tomando únicamente los puntos de la fase log, Gráficas 2G - 4G se tendrá la velocidad específica de -- crecimiento.

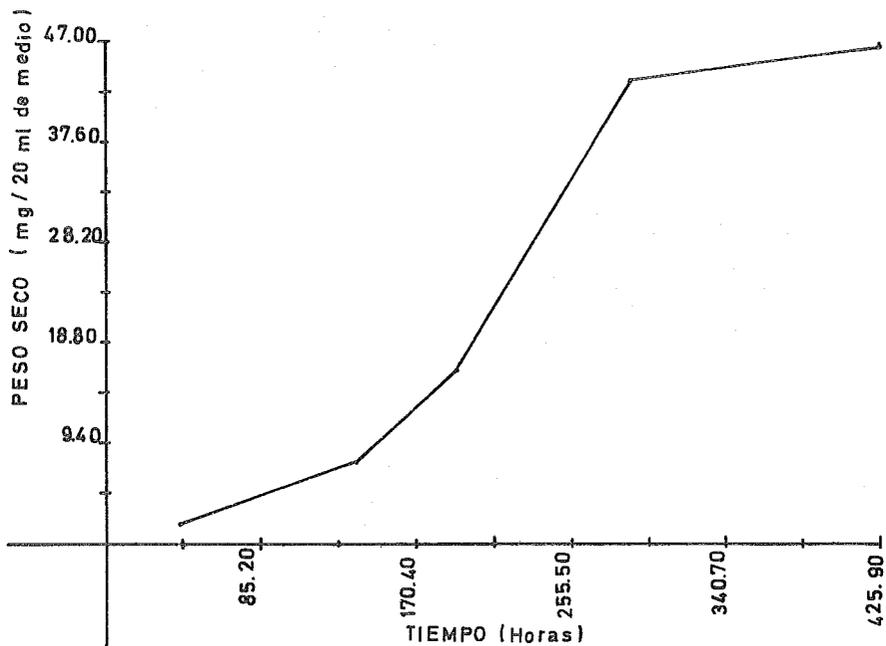
La Gráfica 5G muestra las velocidades específicas de crecimiento calculadas para tres curvas. Sacando promedio aritmético tenemos que es de $.0075 \text{ hr}^{-1}$, de estos datos también es posible calcular el -- tiempo de duplicación.

Si se integra este límite de $t_0 \longrightarrow t$, $x_0 \longrightarrow x$ y se considera $x = 2x_0$ y $t_0 = 0$ tendremos

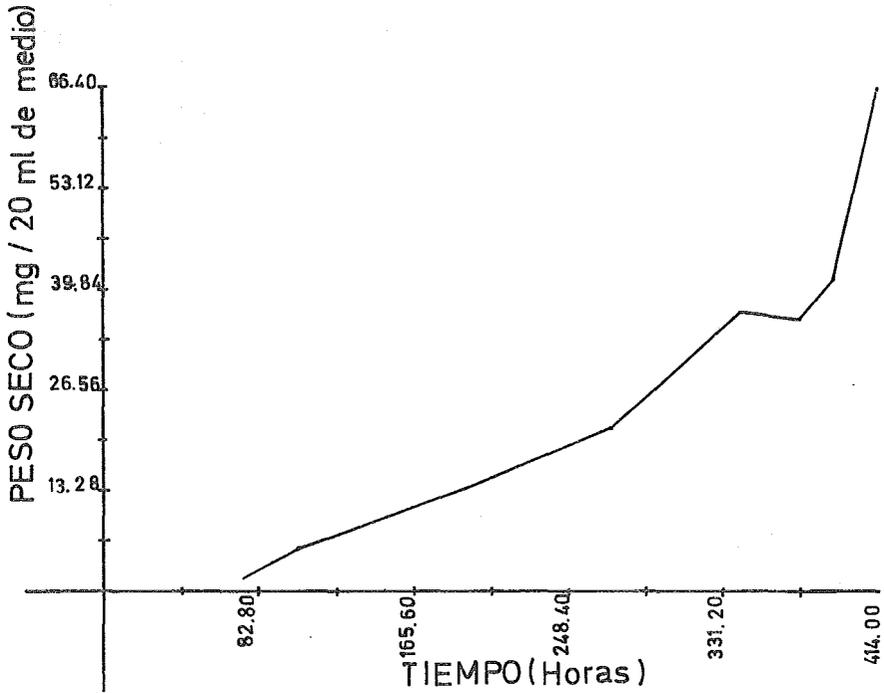
$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{0.69}{0.0075}$$

Lo cual nos da un tiempo de duplicación de 92 horas, esto significa que Pleurotus ostreatus es lento para crecer; por este motivo, es necesario cuando se va a inocular Pleurotus ostreatus en medio rico, trabajar con el menor riesgo posible de contaminación, muy cerca del mechero con puertas y ventanas cerradas ó si es posible en una - campana de flujo laminar.

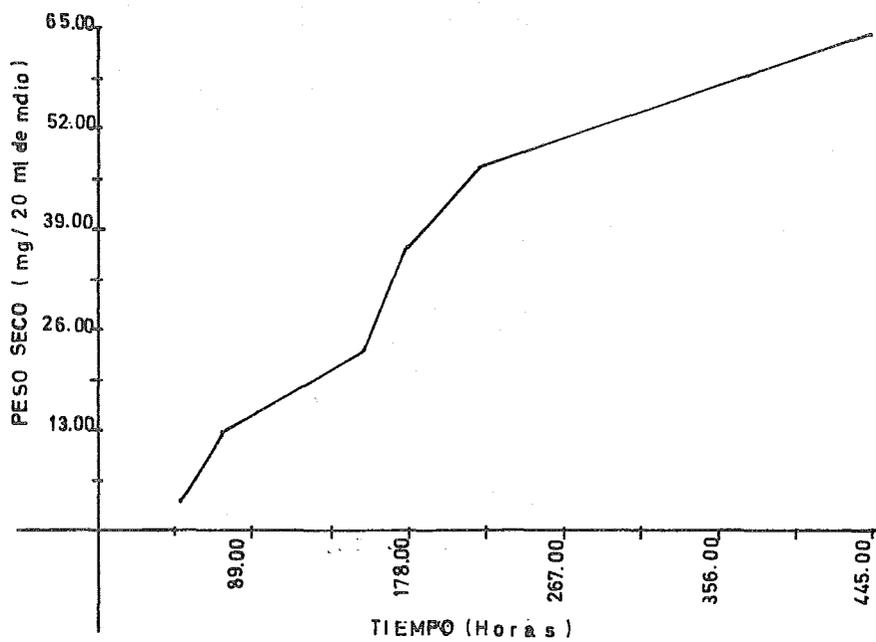
Comparando este resultado ($.0075 \text{ hr}^{-1}$), con trabajos de Kirk que utiliza Phanerochaete chrysosporium, donde se encontraron velocidades de crecimiento de $.0016 \text{ hr}^{-1}$ (36), y de $.0288 \text{ hr}^{-1}$ (37), observamos que nuestro valor está dentro del rango pero aún así las diferencias encontradas en este trabajo también se encuentran en la literatura,



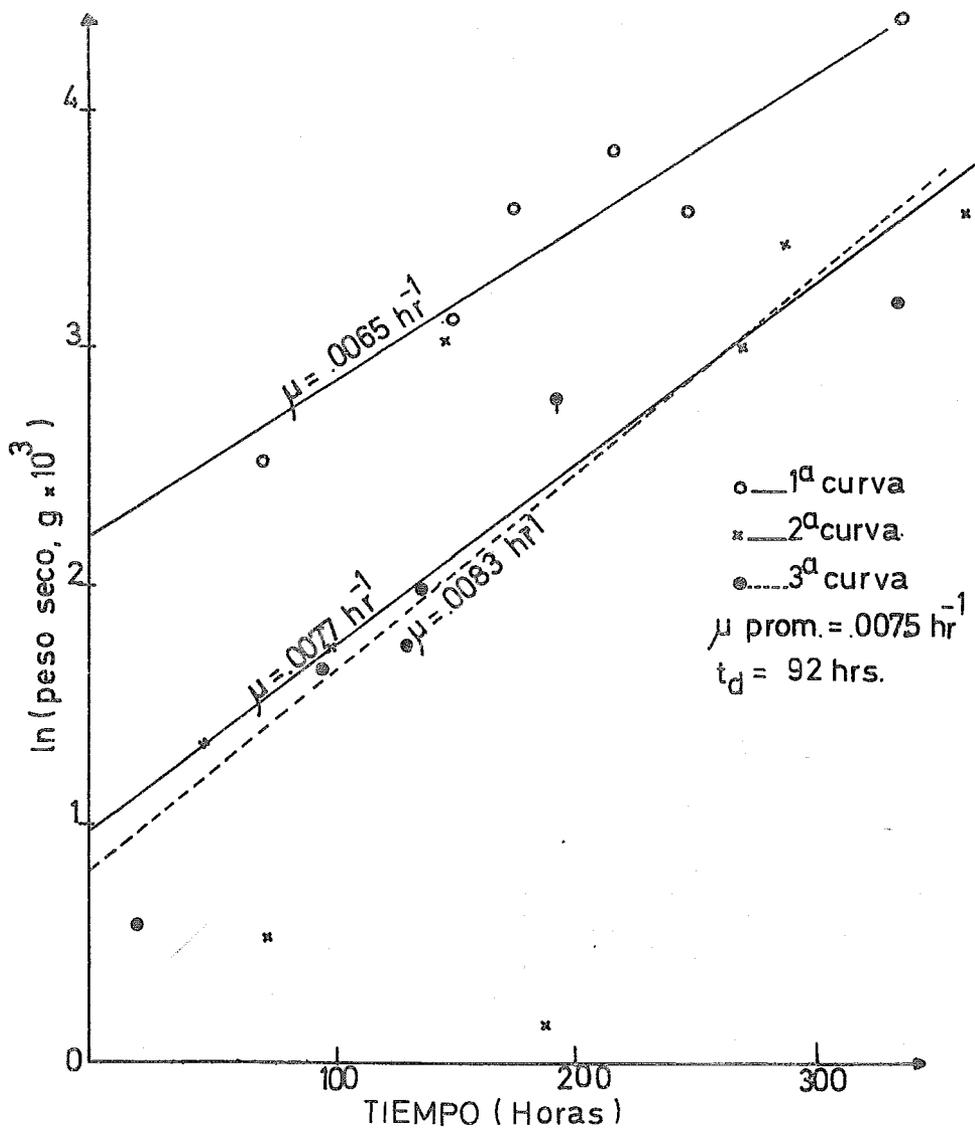
Graf. 2G.- 1a. curva de crecimiento de Pleurotus ostreatus (21) en 20 ml de medio líquido con glucosa.



Graf. 3G. - 2a. curva de crecimiento de Pleurotus ostreatus (2I) en 20 ml de medio líquido con glucosa.



Graf. 4G. - 3a. curva de crecimiento de Pleurotus ostreatus (2I) en 20 ml de medio líquido con glucosa.



Graf. 5G.- Velocidades de crecimiento de las tres curvas de Pleurotus ostreatus (21).

razón por la cual los experimentos en ésta se hicieron por quintuplica-
do.

Este tipo de microorganismos presenta variaciones en determi-
nado rango el cual es amplio por tanto no debe extrañar que algunas
veces los resultados parezcan discrepantes ó erróneos como se ha
venido mencionando.

II. CRECIMIENTO DE Pleurotus ostreatus EN CULTIVO SUMERGI DO EN BAGACILLO DE CAÑA DELIGNIFICADO COMO FUENTE DE CARBONO.

Con el objeto de conocer el comportamiento (crecimiento, actividad celulolítica, producción de enzimas), de las diez cepas en un sustrato celulósico se crecieron las cepas de Pleurotus ostreatus en el mismo medio completo, usado en el experimento anterior, pero sustituyendo la glucosa por celulosa. Esta celulosa se preparó delignificando bagacillo de caña por medio de cloraciones y lavados con etanol amina (50), ya que por medio de este método se obtiene no solamente celulosa sino también hemicelulosa que acompaña a los desperdicios lignocelulósicos Tabla 1I.

Los resultados de crecimiento de las diez cepas a los diez días se muestran en la Tabla 4F y los de actividad celulolítica para el mismo tiempo en la Tabla 5F. En este caso Pleurotus ostreatus también creció en pelets de diferentes tamaños. La mayoría de ellos tenían incrustados fragmentos de fibras. La determinación de crecimiento por medio del peso seco es inadecuada porque la separación de los pelets de las fibras de bagacillo de caña es muy difícil, por lo cual se decidió hacer la determinación de crecimiento midiendo el nitrógeno total por el método microkjeldahl; los resultados se muestran en la Tabla 4F, donde observamos discrepancias; por ejemplo, el gasto de ácido clorhídrico de la cepa 3a es demasiado alto (32.3 ml de HCl -- .416N), en la primera corrida y muy bajo en la segunda (0.15 ml de HCl 0.416N). Si suponemos que Pleurotus ostreatus contiene 8% de nitrógeno aproximadamente, tenemos que en la primera corrida el % de nitrógeno es de 1.875, por tanto 0.1087 mg son de Pleurotus ostreatus.

En la segunda corrida tenemos .0087% de nitrógeno total, por tanto 23.43 mg son micelio. Aunque, como se observó en el experimento anterior, el crecimiento de Pleurotus ostreatus no es muy reproducible, las diferencias encontradas en este experimento entre una corrida y otra están fuera del rango encontrado en el experimento I. Esto muy probablemente se deba a que las fibras obtenidas después de la delignificación contenían residuos de etanol-amina, a pesar del lavado intensivo al que se sometieron, interfiriendo la determinación. Por lo anterior los resultados de las determinaciones Kjeldahl son muy dudosos. Sin embargo, en todos los casos se observó crecimiento lo cual indica que las diez cepas de Pleurotus ostreatus sintetizan celulasas, por tanto pueden usar celulosa como fuente de carbono y energía, de ahí que su hábitat natural sea un sustrato rico en celulosa: troncos de árboles caídos. La actividad celulolítica de las diez cepas se muestra en la Tabla 5F, aunque la actividad se midió en un sustrato diferen

te, papel filtro, esto no afectó la determinación porque las celulasas de Pleurotus ostreatus tienen todos los componentes (51). La actividad celulolítica de las cepas 12a, M₁, M₄ y M₁₇ fué mayor que la de las cepas 2I, 2II, 2IV, 3a, 6a, Tabla 1G, pero no se sabe si esto ocurrió porque hubo mayor cantidad de enzima en unos casos que en otros ó si hubo mayor crecimiento ó si porque las enzimas de unas cepas son más activas que otras bajo estas condiciones. La cantidad de enzima no fué posible medirla porque el medio contenía peptona que interfiere en la determinación.

Aunque este experimento no nos llevó a los objetivos buscados, si nos permitió vislumbrar las dificultades experimentales y de medición que se pueden presentar cuando se trabaja con sustratos sólidos.

Tabla 1G. Actividad celulolítica de diez cepas de Pleurotus -- ostreatus a los diez días de crecimiento. Medición de actividad en - papel filtro.

Cepa	mg glucosa/ml/hora
2I	0.155
2II	0.150
2IV	0.128
3a	0.095
6a	0.105
9a	-
12a	0.293
M ₁	0.250
M ₄	0.322
M ₁₇	0.275

(valores obtenidos restando los blancos, ver apéndice, punto 7).

III. CRECIMIENTO DE *Pleurotus ostreatus* EN CULTIVO SOLIDO CON CUATRO SUSTRATOS LIGNOCELULOSICOS DIFERENTES COMO FUENTE DE CARBONO.

El objeto de este experimento fué determinar si las diferencias existentes entre los sustratos, en cuanto a composición química y propiedades físicas, influyen en su degradación por cada una de las diez cepas de *Pleurotus ostreatus*, y a su vez encontrar la cepa ó cepas - que degradan eficiente y selectivamente lignina. Los sustratos elegidos fueron paja de cebada, paja de trigo, rastrojo de maíz y bagacillo de caña por ser algunos de los desperdicios agrícolas que más se producen en México.

En la Tabla 2I (apéndice), se muestra la producción en toneladas de estos desperdicios la cual se calculó con los datos de producción de trigo, cebada, maíz y caña (52), y el porcentaje de desperdicios existente en cada uno de los cultivos.

Las razones por las cuales se eligieron determinadas condiciones para este experimento son las siguientes:

- La condición de cultivo sólido sin agitación se eligió con base en los resultados obtenidos por Kirk, los cuales muestran que en cultivo sumergido con agitación no ocurre la delignificación (36), y la experiencia nuestra de que si el cultivo sumergido no se agita el hongo crece en la superficie y el sustrato se asienta en el fondo del matraz, por tanto no hay contacto entre las hifas y el sustrato. Muchos autores suponen que debe haber contacto para la delignificación (36).
- El tiempo, 15 días, durante el cual se dejaron crecer las cepas, se eligió con base en los resultados obtenidos en trabajos hechos con paja de trigo y *Pleurotus ostreatus* (41), donde se observa que la degradación fue selectiva para lignina durante los primeros quince días. Con el objeto de observar que sucede cuando *Pleurotus ostreatus* se deja crecer más de quince días, en otro experimento, se dejó crecer la cepa 2I durante 30 días en los cuatro sustratos.
- La temperatura 29 - 20°C se eligió con base en datos de la literatura (41) (42), y considerando el equipo con que se cuenta. La literatura reporta 28°C y se cuenta con un cuarto a 29°C que oscila - 20°C.
- La fuente de nitrógeno y la cantidad de la misma para una mejor degradación de lignina se encontró reportada en la literatura.
- La cantidad de agua también se encuentra reportada.

En este experimento no se controló la humedad atmosférica, -- factor que seguramente es importante pero impráctico para controlarlo sobre todo cuando se trabaja con diez cepas a la vez y con cuatro sustratos lignocelulósicos diferentes.

Los parámetros medidos antes y después de la degradación y las razones por las cuales se midieron dichos parámetros son:

- Se midió la cantidad de material que se pierde después de la degradación puesto que es importante en la evaluación de todo proceso.

- Se midió el contenido de hemicelulosa del material antes y después de la degradación. En el material se encuentran tres posibles fuentes de carbono que son: lignina, celulosa y hemicelulosa, en la literatura se reporta que la lignina no es una fuente suficiente de carbono y energía y que la hemicelulosa es más susceptible a degradación que la celulosa, por tanto se pensó que los primeros quince días Pleurotus ostreatus degrada hemicelulosa.

Lo más adecuado hubiese sido medir holocelulosa (celulosa y hemicelulosa), pero no se hizo porque los métodos existentes para hacerlo requieren tiempo y equipo con los cuales no se contó.

- Se midió cantidad de lignina antes y después de la degradación puesto que lo que se busca es la mejor cepa degradadora de lignina.

- Se midió el contenido de nitrógeno total orgánico puesto que es una medida indirecta de crecimiento.

Los tubos inclinados en los cuales se crecieron los inóculos -- que posteriormente se transfirieron a los matraces con sustratos sólidos, se muestran en la Fig. 3G. Podemos observar que a pesar de que todas las cepas de Pleurotus ostreatus tienen 9 días de crecimiento, unas presentan mayor crecimiento 2I, 2II, 2IV, M₁₇ que otras 3a, 6a, 9a, 12a, M₁, y M₄; por lo cual la cantidad de inóculo fué diferente entre una cepa y otra, estas diferencias se repitieron, es decir, las cepas 2I, 2II, 2IV y M₁₇ siempre crecieron más, en agar dextrosa y papa, que las demás cepas. Se decidió no tratar de igualar las cantidades de inóculo de todas las cepas, sino igualar el tiempo de -- crecimiento en el tubo inclinado (9 días), considerando que la selección de la cepa debía hacerse desde el inóculo; tiene ventaja una cepa con la cual se logra un inóculo mayor con respecto a otra que, en el mismo tiempo, se logra un inóculo menor, esto se debe a que en medio sólido es necesario que el micelio este en contacto con el sustrato pa

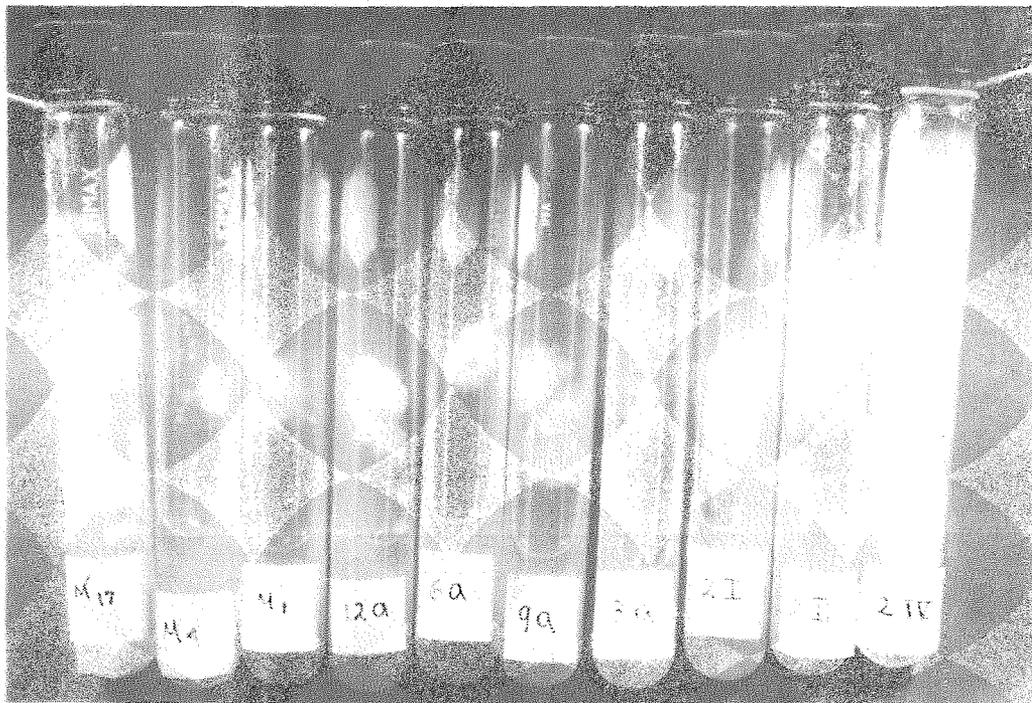


Fig. 3G.- Pleurotus ostreatus en agar dextrosa y papa, 9 días de crecimiento.

ra que ocurra la degradación, por tanto habrá una mayor degradación cuando el micelio ha invadido todo el sustrato, lo cual se logra en menos tiempo cuando se tiene más inóculo que cuando se tiene menos. Por todo lo anterior observamos que las cepas 2I, 2II, 2IV y M₁₇, llevan ventaja desde el inóculo sobre el resto.

En la Tabla 2G, donde la pérdida de material se calculó (ver apéndice, punto 4), a partir de los datos reportados en la sección de resultados (Tablas 7F - 11F), podemos observar que las diferencias en pérdida de material entre las diez cepas con los cuatro sustratos, son pequeñas; la mayor diferencia está entre la cepa 9a en rastrojo de maíz cuya pérdida fué de 0.14 g/g de material y las cepas que tuvieron de .06 g/g de material, esta diferencia fué de 0.08 g/g de material. También se observa que la pérdida de material para una misma cepa depende del sustrato en que se use, a su vez la pérdida de material para un sustrato dado depende de la cepa de Pleurotus ostreatus empleada. En rastrojo de maíz, a los quince días, la cepa 3a tuvo la menor pérdida, quizá esto se deba a que degradó menos sustrato. Y ya que la pérdida de material se debe a la degradación de todos ó cada uno de los componentes del mismo, el análisis de pérdida de material se hará considerando los factores de: degradación de lignina, degradación de azúcares y crecimiento en conjunto. Los datos de pérdida de material reportados en la literatura (41), son:

Con (NH₄)₂SO₄ como fuente de nitrógeno y 5 gramos de paja de trigo como fuente de carbono se liberan 0.075 ml CO₂/min a los 8 - 10 días de crecimiento, declinando a 0.040 ml CO₂/min a los 36 días.

Considerando que la fermentación dure de 8 a 10 días tenemos:

$$0.075 \frac{\text{ml}}{\text{min}} \times \frac{60 \text{ min}}{1 \text{ hora}} \times \frac{24 \text{ horas}}{1 \text{ día}} = 108 \text{ ml/día}$$

para conocer la masa en gramos se tiene:

$$PV = nRT$$

$$P = 1 \text{ atm}$$

$$R = 0.082 \text{ atm l/mol } ^\circ\text{K}$$

$$T = 301^\circ\text{K}$$

$$V = 0.108 \text{ l}$$

$$n = ?$$

$$n = \frac{PV}{RT} = \frac{(1 \text{ atm.}) (0.108 \text{ l})}{0.082 \frac{\text{l-atm}}{\text{mol } ^\circ\text{K}} (301 ^\circ\text{K})} = 0.00437 \text{ mol}$$

Tabla 2G.- Pérdida de material después de crecer Pleurotus ostreatus durante 15 y 30 días en cuatro sustratos diferentes.

sustrato Cepa	Material perdido g/g de material (15 días)				Material perdido g/g de material (30 días)			
	Rastrojo de Maíz	Paja de Cebada	Paja de Trigo	Bagacillo de Caña	Rastrojo de Maíz	Paja de Cebada	Paja de Trigo	Bagacillo de Caña
2I	0.09	0.06	0.06	0.06	0.19	0.20	0.17	0.13
2II	0.08	0.06	0.06	0.06				
2IV	0.11	0.10	0.10	0.08				
3a	0.06	0.08	0.08	0.10				
6a	0.08	0.07	0.08	0.08				
9a	0.14	0.07	0.08	0.06				
12a	0.10	0.09	0.10	0.10				
M ₁	0.10	0.09	0.10	0.10				
M ₄	0.10	0.07	0.08	0.08				
M ₁₇	0.10	0.09	0.10	0.10				

P.M. CO₂ _____ 44

masa = (n) (P.M.) = 0.00437 x 44 = 0.192 g/día
si la fermentación fué de diez días tendremos:

1.92 g de materia como CO₂ se pierden/5 g de paja, -
aproximadamente durante diez días.

Este valor es mayor que el obtenido experimentalmente por nosotros donde la máxima pérdida se tiene con la cepa 9a en rastrojo de maíz después de crecer 15 días, se pierden 0.7 g Tabla 2G, aún después de crecer Pleurotus ostreatus (2I) durante 1 mes el máximo valor de pérdida es de 1.0 g en paja de cebada, Tabla 2G.

En realidad el dato reportado en la literatura de pérdida de -- CO₂, no nos da una idea de qué porcentaje de material se perdió, es necesario transformar todo a gramos de carbono. Considerando que la lignina tiene un peso molecular de 2967 (dato calculado a partir de la Fig. 6), de este peso 1872 g son de carbono por tanto la lignina - aporta 63.09% de carbono.

Por otra parte, suponiendo que en los primeros diez días de crecimiento de Pleurotus ostreatus degrada hemicelulosa la cual está formada principalmente por xilanas y tomando como base tres unidades de xilosa, tenemos que 446 g de hemicelulosa contienen 180 g de carbono, es decir, la hemicelulosa aporta 40.2% de carbón. Los valores de lignina y hemicelulosa para paja de trigo, reportados experimentalmente, son de 12.8% y 38.6% respectivamente.

Tomando como base 100 g de paja de trigo tenemos que: 12.8g son de lignina de los cuales el 63.09% son de carbono es decir 8.075 g de carbono; 38.6 g son de hemicelulosa los cuales contienen 40.2% de carbón, es decir 15.51 g son de carbono; sumando todo el carbono nos dan 23.58 g de carbón degradables en diez días por cada 100 gramos de paja de trigo, por tanto:

100 g de paja de trigo _____ 23.58 g de carbón
5 g de paja de trigo _____ X

X = 1.179 g de carbono aportan lignina y hemicelulosa
/5 g de paja de trigo.

Se reportan:

1.92 g de CO₂ como pérdida.

El peso molecular del CO_2 es de 44; por tanto

44 g de CO_2 _____ 12 g de C.

1.92 g de CO_2 _____ X

X = 0.523 g de C se pierden como CO_2

como de 1.179 g de C son el 100% de C degradable a los diez días, -
0.5236 g de C son el 44.4%, es decir se pierde el 44.4% del carbón
degradable a los diez días en la literatura.

Llevando a cabo el mismo cálculo con nuestros resultados expe-
rimentales, obtenemos que se pierde 16.19% del carbón total degrada-
ble a los diez días.

Esta diferencia entre el dato de la literatura y el experimental
se puede deber a una de las siguientes causas ó a todas.

a) El valor de la presión usado para hacer los cálculos de --
pérdida de CO_2 no es el real.

b) Las condiciones de presión y humedad atmosféricas no se -
controlaron y no se sabe si estos factores influyen en la pérdida de --
material como CO_2 .

c) En la literatura (41), el inóculo se controló creciéndolo en
un medio líquido con harina de avena mientras que nuestro inóculo se
creció en agar dextrosa y papa en medio sólido.

d) Parte del peso del material, en nuestro experimento, lo --
aporta Pleurotus ostreatus, por tanto ese valor se debe restar lo cual
se hará en un análisis posterior.

Los datos de mg de azúcares reductores/ml., obtenidos des--
pués de hacer la prueba de hemicelulosa, se encuentran en la sección
de resultados; con el fin de obtener la mayor información posible se -
llevaron a cabo una serie de cálculos (ver apéndice, punto 5), obtenién-
dose la Tabla 3G, donde se observan los azúcares (hemicelulosa) rema-
nentes después de crecer Pleurotus ostreatus durante 15 y 30 días. La
paja de trigo contiene 0.386 g de hemicelulosa/g de paja, más que los
demás sustratos, el sustrato que menos hemicelulosa contiene es el de
bagacillo de caña 0.258 g/g de bagacillo. Las cepas 9a y 6a después
de la degradación en bagacillo de caña dieron más azúcares reductores
que el testigo 0.292 g/g de bagacillo y 0.272 g/g de bagacillo respec-
tivamente, se pensó en la posibilidad de que esto se deba a que estas

Tabla 3G.- Azúcares (hemicelulosa) presentes, antes (testigo), y después de la degradación por Pleurotus ostreatus durante 15 y 30 días.

sustrato Cepa	Azúcares red. (hemicelulosa)(15 días) g/g de material				Azúcares red. (hemicelulosa)(30 días) g/g de material			
	Rastrojo de Maíz	Paja de Trigo	Paja de Cebada	Bagacillo de Caña	Rastrojo de Maíz	Paja de Trigo	Paja de Cebada	Bagacillo de Caña
2I	0.270	0.364	0.368	0.234	0.212	0.240	0.206	0.194
2II	0.282	0.356	0.270	0.236				
2IV	0.266	0.332	0.262	0.204				
3a	0.284	0.340	0.260	0.248				
6a	0.280	0.328	0.270	0.272				
9a	0.256	0.338	0.258	0.292				
12a	0.294	0.328	0.238	0.226				
M ₁	0.272	0.316	0.204	0.226				
M ₄	0.270	0.348	0.208	0.252				
M ₁₇	0.270	0.316	0.204	0.236				
Testi go	0.300	0.386	0.280	0.258				

cepas agotaron la hemicelulosa del bagacillo y al hacer la hidrólisis - ácida para medir hemicelulosa lo que se hidrolizó realmente fué celulosa alterada, sin embargo el hecho de que estas cepas degradaran -- más azúcares que los demás nos lleva a pensar en que se perdió más material, y en la Tabla 2G, observamos que no fué así; por tanto este análisis se debe hacer conjuntamente al de degradación de lignina y crecimiento.

En rastrojo de maíz la cepa 12a dejó más azúcares que las demás: 0.294 g/g de rastrojo; en paja de cebada la cepa 6a 0.270 g/g de paja y en bagacillo de caña M₄ 0.252 g/g de bagacillo.

Hablando idealmente, la mejor cepa para delignificar sería aquella que no degradara absolutamente nada de azúcares y degradara por completo toda la lignina presente en el material lignocelulósico. Esto no es posible ya que dada la información de la literatura, los polímeros de lignina no sirven como sustrato de crecimiento para los hongos white-rot, a menos que obtenga una mutante, por tanto se tratará de escoger la cepa que menos degrade azúcares y que a su vez sea la que más lignina degrade.

Con el fin de analizar los resultados obtenidos después de hacer las pruebas de lignina; se hicieron una serie de cálculos (ver -- apéndice, punto 6), los resultados de estos cálculos se encuentran en la Tabla 4G, donde se observa que en rastrojo de maíz los valores de lignina son todos mayores que el valor obtenido en el testigo. Se pensó en la posibilidad de la existencia de una sustancia insoluble en etanol-benceno, interceptora en la prueba de lignina, pero en realidad no se cuenta con bases para demostrarlo.

En paja de cebada las cepas que más lignina degradaron fueron 2IV, de 0.194 g de lignina/g de paja que había originalmente quedaron 0.16 g de lignina/g de paja Tabla 4G, es decir 2IV degradó 0.034 g de lignina/g de paja de cebada y la 2I que dejó 0.158 g de lignina/g de paja, por tanto degradó 0.036 g de lignina/g de paja de cebada.

Paja de trigo es el sustrato que menos lignina contiene, 0.128 g de lignina/g de paja de trigo, la cepa que más lignina degradó fué la 2II, dejando 0.094 g de lignina/g de paja, es decir degradó 0.034 g de lignina/g de paja al igual que la mejor cepa en paja de cebada.

En bagacillo de caña, el sustrato con más lignina de todos los sustratos usados en este trabajo: 0.278 g de lignina/g de bagacillo de caña, la cepa que más lignina degradó fue la M₁₇ dejando 0.198 g de lignina/g de bagacillo y por tanto degradando 0.080 g de lignina/g de bagacillo. Después de 30 días la lignina en rastrojo de maíz dió un valor de 0.116 g de lignina/g de rastrojo. La cepa 2I al término de

Tabla 4G.- Lignina presente antes (testigo) y después de la degradación por Pleurotus ostrea tús durante 15 y 30 días.

sustrato	Lignina g/g de material (15 días)				Lignina g/g de material (30 días)			
	Rastrojo de Maíz	Paja de Cebada	Paja de Trigo	Bagacillo de Caña	Rastrojo de Maíz	Paja de Cebada	Paja de Trigo	Bagacillo de Caña
Cepa								
2I	0.158	0.166	0.096	0.242	0.116	0.128	0.082	0.212
2II	0.160	0.168	0.094	0.254				
2IV	0.160	0.160	0.100	0.258				
3a	0.158	0.192	0.102	0.246				
6a	0.148	0.192	0.112	0.252				
9a	0.152	0.180	0.124	0.266				
12a	0.158	0.182	0.120	0.244				
M ₁	0.150	0.158	0.098	0.244				
M ₄	0.144	0.178	0.118	0.238				
M ₁₇	0.144	0.190	0.120	0.198				
Testi go	0.141	0.194	0.128	0.278				

1 mes degradó 0.066 g de lignina/g de paja de cebada, 0.046 g de -- lignina/g de paja de trigo y 0.066 g de lignina/g de bagacillo de caña. Los valores anteriores se obtuvieron restando a los gramos de lignina /g de sustrato de los testigos los gramos de lignina/g de sustrato obtenidos después de crecer Pleurotus ostreatus durante 30 días. La atención la cepa M₁₇ que al término de 15 días degradó más lignina en bagacillo de caña que la cepa 2I al término de 30 días. Supuestamente, el sustrato que más azúcares contiene es la paja de trigo, es el que debería favorecer la degradación de lignina, dados los datos de la literatura (36) (ver generalidades, Cuadro 5), sin importar el contenido de lignina. Sin embargo, en el caso de la cepa M₁₇ en bagacillo de caña, es el sustrato que menos azúcares contiene de todos los sustratos y es el que más lignina contiene y en él fué donde se degradó más lignina. En base a este hecho no es posible afirmar que se están, contradiciendo los datos reportados en la literatura, puesto que -- entran en juego otros factores como:

a) El tipo de lignina en cuanto a monómeros y tipos de enlace, presente en el sustrato; no se sabe qué enzimas son necesarias para degradar lignina y aunque se supone se trata de un sistema no específico es posible que dadas las diferencias estructurales de las -- ligninas una misma cepa degrade mejor un tipo de lignina que otro.

b) La facilidad con que una cepa puede crecer en el sustrato.

En la Tabla 5G, se muestran los resultados después de medir el nitrógeno orgánico después de la degradación. Después de 30 días de crecimiento el porcentaje de nitrógeno orgánico disminuye en todos los casos. No se ha encontrado explicación a este hecho que también en la literatura se reporta (ver Fig. 13 en generalidades), como peso seco del micelio. Probablemente la célula se autoconsume.

Dados los resultados de este trabajo, no es posible elegir una cepa como la mejor delignificadora, ya que tanto la degradación de azúcares como de lignina dependen del sustrato en que se use la cepa. Por esta razón se hará la elección de una ó varias cepas para cada -- sustrato; por la dificultad que presenta el comparar todas las tablas se hicieron otros análisis que comprenden todos los resultados de un sustrato en el orden conveniente para elegir la cepa:

a) Peso del material después de crecer Pleurotus ostreatus, en primer lugar las cepas con las cuales hubo menos pérdida de material.

b) Gramos de azúcares reductores/g de sustrato (hemicelulosa), en primer lugar las cepas que degradan menos azúcares.

c) Gramos de lignina/g de sustrato, en primer lugar las cepas

Tabla 5G.- Crecimiento de Pleurotus ostreatus en cuatro sustratos sólidos durante 15 y 30 días.

sustrato Cepa	% de nitrógeno orgánico (15 días)				% de nitrógeno orgánico (30 días)			
	Rastrojo de Maíz	Paja de Cebada	Paja de Trigo	Bagacillo de Caña	Rastrojo de Maíz	Paja de Cebada	Paja de Trigo	Bagacillo de Caña
2I	1.29	1.87	2.32	1.17	1.12	1.03	1.06	0.90
2II	0.98	1.62	2.26	1.07				
2IV	1.68	1.12	2.39	1.14				
3a	1.35	1.16	2.23	1.13				
6a	1.06	1.64	2.04	1.06				
9a	1.71	1.44	2.69	1.04				
12a	0.85	1.22	2.70	1.10				
M ₁	0.43	1.64	1.49	1.15				
M ₄	1.03	0.98	2.62	1.07				
M ₁₇	0.73	1.60	3.21	1.15				

que degradan más lignina.

d) Porcentaje de nitrógeno orgánico; en primer lugar las cepas que más crecieron y por tanto las que dieron mayor porcentaje de nitrógeno orgánico.

Los resultados reordenados para rastrojo de maíz se presentan en la Tabla 6G, donde se puede observar que las cepas M_4 y M_{17} -- fueron las que más lignina de rastrojo de maíz degradaron, pero a su vez también fueron las que más hemicelulosa degradaron, se encuentran en sexto lugar; la pérdida de material con estas dos cepas se encuentra en un valor medio de 10%, en un rango de 6-14%.

Las cepas 9a y 2IV fueron las que mejor crecieron y las que -- más hemicelulosa degradaron pero fueron las que menos lignina degradaron, están en cuarto y octavo lugar respectivamente.

Si se quiere delignificar rastrojo de maíz se recomiendan las -- cepas M_4 y M_{17} .

La cepa 12a es la que menos degrada azúcares pero no es de -- las que mejor degrada lignina, está en 5o. lugar.

En la Tabla 6G, falta la columna de porcentaje de pérdida -- respecto a lignina, ésta no fué posible calcularla porque todos los casos presentaron mayor cantidad de g de lignina/g de rastrojo que el -- testigo.

Las cepas M_1 y 2IV fueron las que más lignina de paja de -- cebada degradaron Tabla 7G; de estas dos cepas la cepa M_1 fue una de -- las que más azúcares degradó, octavo lugar. Las cepas 2I y 2II -- degradaron lignina de paja de cebada, 14.4% y 13.4%, respectivamente y -- fueron de las que menos degradaron azúcares, segundo y primer lugar, -- respectivamente.

La cepa 6a degrada pocos azúcares, primer lugar, pero es la -- cepa que menos lignina degrada, noveno lugar.

Si se quiere delignificar paja de cebada con la menor pérdida -- de azúcares posible, las cepas 2I, 2II y 2IV son las más apropiadas.

Las cepas que degradaron más lignina de bagacillo de caña fue-- ron la M_{17} y M_4 , Tabla 8G. Respecto a la degradación de azúcares, -- las cepas M_4 y M_{17} quedaron en tercer y quinto lugar respectivamente. -- De estas dos cepas, la cepa M_{17} creció mejor en bagacillo de caña, -- segundo lugar, que la cepa M_4 , sexto lugar. Las cepas 9a y 6a fueron -- las que más azúcares degradaron y a su vez las que menos crecieron

Tabla 6G.- Comparación de las diez cepas de Pleurotus ostreatus en rastrojo de maíz.

Orden	Material remanente		Hemicelulosa remanente		Lignina remanente		Crecimiento %N			
	Cepa	g/g de material % de pérdida	Cepa	g/g de material % de pérdida	Cepa	g/g de material % de pérdida	Cepa	% de nitrógeno		
1o.	3a	0.94	6	12a	0.294	2	M ₄ M ₁₇	0.144 0.144	9a	1.71
2o.	2II	0.92	8	3a	0.284	5.3	6a	0.148	2IV	1.68
3o.	6a	0.92								
3o.	12a	0.91	9	2II	0.282	6	M ₁	0.150	3a	1.35
	2I	0.91	9							
4o.	M ₁	0.90	10	6a	0.280	6.6	9a	0.152	2I	1.29
	M ₄	0.90	10							
	M ₁₇	0.90	10							
5o.	2IV	0.89	11	M ₁	0.272	9.3	12a	0.158	M ₄	1.03
6o.	9a	0.86	14	M ₁₇	0.270	10.0	3a	0.158	6a	1.06
				M ₄	0.270	10.0	2I	0.158		
				2I	0.270	10.0				
7o.				2IV	0.268	11.3	2II	0.160	2II	0.98
8o.				9a	0.256	14.6	2IV	0.160	12a	0.85
9o.									M ₁₇	0.73
10o.									M ₁	0.43

Tabla 7G.- Comparación de las diez cepas de Pleurotus ostreatus en paja de cebada.

Orden	Material remanente			Hemicelulosa remanente			Lignina remanente			Crecimiento	
	Cepa	g/g de material	% de pérdida	Cepa	g/g de material	% de pérdida	Cepa	g/g de material	% de pérdida	Cepa	% de nitrógeno
1o.	2I	0.94	6	6a	0.270	3.5	M ₁	0.158	18.5	2I	1.87
	2II	0.94	6	2II	0.270	3.5					
2o.	6a	0.93	7	2I	0.268	4.2	2IV	0.160	17.5	6a	1.64
	9a	0.93	7							M ₁	1.64
	M ₄	0.93	7								
3o.	3a	0.92	8	2IV	0.262	6.4	2I	0.166	14.4	2II	1.62
4o.	12a	0.91	9	3a	0.260	7.1	2II	0.168	13.4	M ₁₇	1.60
	M ₁	0.91	9								
	M ₁₇	0.91	9								
5o.	2IV	0.90	10	9a	0.258	7.8	M ₄	0.178	8.2	9a	1.44
6o.				12a	0.238	15.0	9a	0.180	7.2	12a	1.22
7o.				M ₄	0.208	25.7	12a	0.182	6.1	3a	1.16
8o.				M ₁	0.204	27.1	M ₁₇	0.180	2.0	2IV	1.12
				M ₁₇	0.204	27.1					
9o.							3a	0.192	1.0	M ₄	0.98
							6a	0.192	1.0		

Tabla 8G.- Comparación de las diez cepas de Pleurotus ostreatus en bagacillo de caña.

Orden	Material remanente			Hemicelulosa remanente			Lignina remanente			Crecimiento	
	Cepa	g/g de material	% de pérdida	Cepa	g/g de material	% de pérdida	Cepa	g/g de material	% de pérdida	Cepa	% de nitrógeno
1o.	2I	0.94	6	9a	0.292	-	M ₁₇	0.158	42.4	2I	1.17
	2II	0.94	6								
	9a	0.94	6								
2o.	2IV	0.92	8	6a	0.272	-	M ₄	0.238	14.4	M ₁	1.15
	6a	0.92	8							M ₁₇	1.15
	12a	0.92	8								
	M ₄	0.92	8								
3o.	3a	0.90	10	M ₄	0.252	2.36	2I	0.242	12.9	2IV	1.14
	M ₁	0.90	10								
	M ₁₇	0.90	10								
4o.				3a	0.248	3.8	12a	0.244	12.2	3a	1.13
							M ₁	0.244	12.2		
5o.				2II	0.236	8.5	3a	0.246	11.5	12a	1.10
				M ₁₇	0.236						
6o.				2I	0.234	9.2	6a	0.252	9.2	M ₄	1.07
										2II	1.07
7o.				12a	0.226	12.4	2II	0.254	8.6		
				M ₁	0.226	12.4					
8o.				2IV	0.204	20.9	2IV	0.258	7.1	6a	1.06
9o.							9a	0.266	4.3	9a	1.04

en bagacillo de caña Tabla 8G. La cepa M₁₇ se recomienda para delignificar bagacillo de caña.

Observamos que no se encuentra calculado el porcentaje de pérdida de hemicelulosa para las cepas 9a y 6a, no se calcularon porque los valores obtenidos fueron mayores que los obtenidos en el testigo. Esto probablemente se deba a que estas dos cepas modificaron la celulosa de bagacillo de caña en tal forma que, por medio de las condiciones usadas en la determinación de hemicelulosa, la celulosa modificada se transformó en azúcares reductores dando así un valor mayor -- de D.O. que el testigo.

Las cepas 2I y 2II degradaron más lignina de paja de trigo que las demás, Tabla 9G, también fueron las cepas con las que hubo menos pérdida de material y menos pérdida de azúcares, aunque no fueron las que mejor crecieron, sexto y séptimo lugar respectivamente, Tabla 9G.

La cepa que mejor creció en paja de trigo fue la M₁₇ y a su vez fué la que más hemicelulosa degradó, sin embargo fué de las que menos lignina degradaron, octavo lugar, Tabla 9G.

En caso de querer delignificar paja de trigo se recomiendan las cepas 2I y 2II.

Tabla 9G.- Comparación de las diez cepas de Pleurotus ostreatus en paja de trigo.

Orden	Material remanente			Hemicelulosa remanente			Lignina remanente			Crecimiento	
	Cepa	g/g de material	% de pérdida	Cepa	g/g de material	% de pérdida	Cepa	g/g de material	% de pérdida	Cepa	% de nitrógeno
1o.	2I	0.94	6	2I	0.364	5.6	2II	0.94	26.5	M ₁₇	3.21
2o.	2II	0.94	6	2II	0.356	7.7	2I	0.096	25.0	12a	2.70
3o.	3a	0.92	8	M ₄	0.348	9.8	M ₁	0.098	23.4	9a	2.69
	6a	0.92	8								
	9a	0.92	8								
	M ₄	0.92	8								
4o.	2IV	0.90	10	3a	0.340	11.9	2IV	0.100	21.9	M ₄	2.62
	12a	0.90	10								
	M ₁	0.90	10								
	M ₁₇	0.90	10								
5o.				9a	0.338	12.4	3a	0.102	20.3	2IV	2.39
6o.				2IV	0.332	13.9	6a	0.112	12.5	2I	2.32
7o.				6a	0.328	14.9	M ₄	0.118	7.8	2II	2.26
				12a	0.328	14.9					
8o.				M ₁	0.316	18.1	12a	0.120	6.2	3a	2.23
				M ₁₇	0.316	18.1	M ₁₇	0.120	6.2		
10o.							9a	0.124	3.1	6a	2.04
										M ₁	1.49

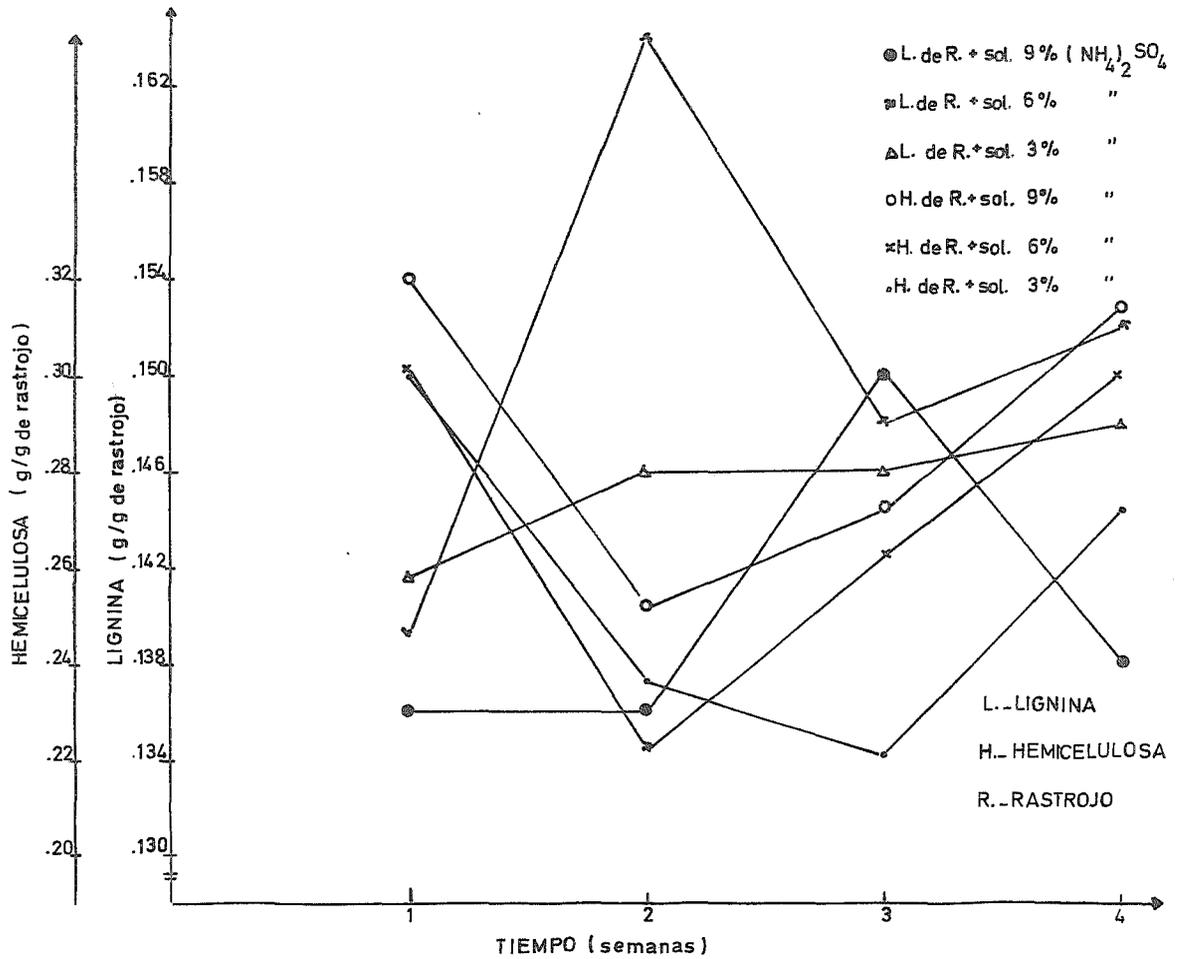
IV. CRECIMIENTO DE *Pleurotus ostreatus* DURANTE 30 DIAS EN MEDIO SOLIDO CON RASTROJO DE MAIZ Y TRES CONCENTRACIONES DIFERENTES DE SULFATO DE AMONIO.

En trabajos previos se ha mencionado la posible relación de la degradación de lignina con el metabolismo del nitrógeno (36) (37), por esta razón se decidió hacer un experimento variando las concentraciones de sulfato de amonio, para lo cual se eligió la cepa 2I y el rastrojo de maíz.

Graficando los resultados de la Tabla 11F (sección de resultados) se obtuvo la Gráfica 6G, donde se observa que cuando se usan soluciones de sulfato de amonio al 6 y 9% (p/v) la hemicelulosa es degradada hasta alcanzar 0.22 g/g de rastrojo y 0.236 g/g de rastrojo respectivamente, a las 2 semanas de crecimiento, después de este tiempo se obtuvieron valores más altos.

Cuando se usó una solución al 3% (p/v) de sulfato de amonio el valor mínimo se obtuvo después de 3 semanas de crecimiento: 0.210 g/g de rastrojo. Este hecho nos hace pensar que cuando se tienen -- concentraciones menores de nitrógeno, *Pleurotus ostreatus* (2I), degrada hemicelulosa con menor velocidad, sin embargo se observó visualmente mayor crecimiento a menor concentración de nitrógeno. Si el micelio es más abundante en el rastrojo donde se usó solución al 3% es ilógico pensar que *Pleurotus ostreatus*, en este caso, está degradando menos azúcares, por tanto se supone que está consumiendo azúcares de celulosa con mayor rapidez que en los casos donde se usaron soluciones de sulfato de amonio al 6 y 9%. Desafortunadamente no nos fué posible determinar el porcentaje de nitrógeno orgánico con las condiciones del método usado, ya que al hacer la determinación -- dió valores mayores de % de nitrógeno en las muestras donde visualmente se observaron crecimientos bajos. Es muy probable que esto se deba a una diálisis insuficiente.

En cuando a degradación de lignina, el análisis dió resultados más altos después de la degradación al igual que en los experimentos a 15 días, por lo cual no nos es posible llegar a una conclusión.



Gráfica 6G.- Degradación de rastrojo de maíz por Pleurotus ostreatus usando tres diferentes concentraciones de sulfato de amonio.

H. CONCLUSIONES.

Las diez cepas de Pleurotus ostreatus crecieron en cultivo sumergido usando glucosa como fuente de carbono y energía, pero demostraron diferencias en la eficiencia de utilización. La forma de crecimiento fué en pelets pero el peso seco fue variable debido a diferencias en el número y tamaño de los mismos.

Las cepas que mejor crecieron en glucosa en cultivo sumergido fueron las 2I, 2II y 2IV, con la cepa 2I se obtuvo 20% de conversión.

La velocidad específica de crecimiento para la cepa 2I fué de 0.0075 hr^{-1} (promedio de tres corridas).

Pleurotus ostreatus presenta dificultades en su manejo metodológico y por tanto en la obtención de resultados reproducibles.

Las cepas 2I, 2II, 2IV, 3a y 6a tuvieron menor actividad celulolítica (0.105 - 0.155 mg glucosa/ml/hora), que las cepas 12a, M_1 , M_4 y M_{17} (0.250 - 0.322 mg glucosa/ml/hora), en medio líquido con bagacillo de caña delignificado como fuente de carbono. No fué posible medir actividad específica debido a problemas metodológicos.

Pleurotus ostreatus es capaz de degradar holocelulosa y lignina de paja de trigo, paja de cebada, bagacillo de caña y rastrojo de maíz en medio sólido sin agitación.

Las cepas 2I, 2II, 2IV y M_{17} dan mejores inóculos que las cepas 3a, 6a, 9a, 12a, M_1 y M_4 en tubos inclinados de agar dextrosa y papa, después de 9 días de crecimiento.

No es posible elegir una cepa como la mejor cepa degradadora de lignina dado que el comportamiento de las cepas depende del sustrato lignocelulósico en que se encuentren. Para los casos particulares de paja de trigo, paja de cebada, bagacillo de caña y rastrojo de maíz se eligieron las siguientes cepas con base en dos criterios: su capacidad para degradar lignina y el consumo mínimo de azúcares (hemice-lulosa).

M_4 y M_{17} para rastrojo de maíz.

M_4 y M_{17} para bagacillo de caña.

2I y 2II para paja de cebada.

2I y 2II para paja de trigo.

Las cepas para rastrojo de maíz se eligieron con los mismos criterios que se usaron en la elección de las cepas para los demás su^utratos, sin embargo no es posible afirmar con seguridad que dichas cepas sean las mejores para rastrojo de maíz, dado que en todos los ca

Los la cantidad de lignina remanente resultó ser mayor que en el tes-
tigo.

El sulfato de amonio en concentraciones de 0.12 g/g de mate--
rial y de 0.18 g/g de material inhibe el crecimiento de Pleurotus os-
treatus en medio sólido con rastrojo de maíz como fuente de carbono.

I. APENDICE.

Al multiplicar el porcentaje obtenido - en el punto c) por $\frac{c}{100}$, donde c son - los gramos de material después de cre- cer Pleurotus ostreatus durante 15 días se obtienen los g de azúcares reducto- res/matraz y al dividir entre 5 se tendrán los gramos de azúcares reducto- res/g de material.

6.- Cálculo de:
lignina g/g de material

a) En este caso se usaron 200 mg de muestra, por tanto, para obtener los - porcentajes:

$$\begin{array}{r} a \text{ mg} \underline{\hspace{2cm}} 200 \text{ mg} \\ X \underline{\hspace{2cm}} 100 \text{ mg} \end{array}$$

por lo cual los pesos obtenidos se mul- tiplicaron por el factor 0.5.

b) Con el porcentaje de lignina se pro- cedió a calcular los gramos de lignina /5 g de material

$$\begin{array}{r} X \text{ mg} \underline{\hspace{2cm}} 100 \text{ mg} \\ Y \underline{\hspace{2cm}} b \text{ mg} \end{array}$$

donde b son los gramos de material que quedan después de crecer Pleurotus os- treatus durante 15 días.

7.- Cálculo de:
actividad celulolítica

a) Se lee la densidad óptica en la cur- va estándar, Fig. 2I, obteniendo así -- los mg de glucosa/ml.

b) A cada tubo se le resta el valor ob- tenido en el blanco.

c) La actividad se determinó al térmi- no de una hora, por tanto se reporta en mg glucosa/ml/hora.

8.- Determinación de
peso seco

Se hicieron experimentos a diferentes -- temperaturas y tiempos para encontrar las condiciones adecuadas para determi- nar el peso seco del micelio.

Tabla II.- Análisis de bagacillo de caña y paja de cebada por métodos TAPPI.

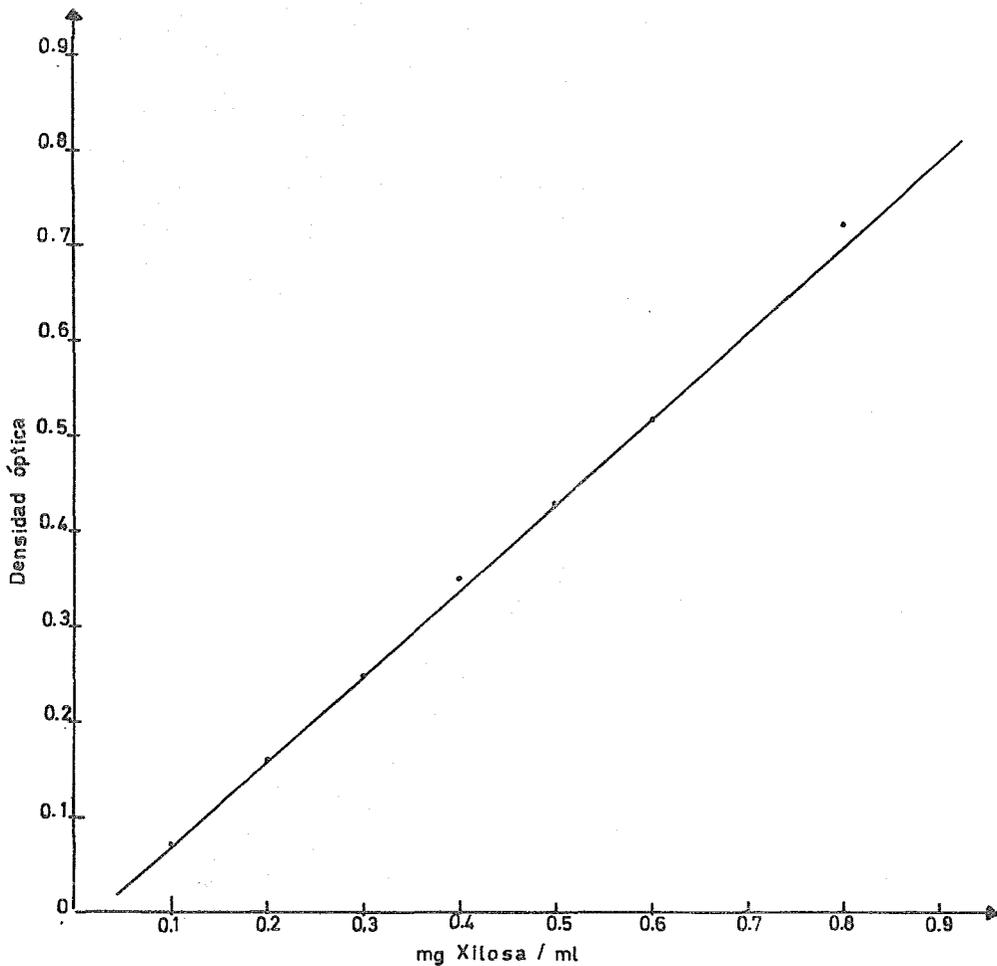
Bagacillo de caña	
Componente	% de muestra húmeda
Holocelulosa	59.5
Hemicelulosa	24.0
Solubles en etanol-benceno	6.74
Lignina	30.22
Humedad	2.20
Cenizas	13.10
Paja de cebada	
Holocelulosa	59.5
Hemicelulosa	13.9
Solubles en etanol-benceno	3.12
Lignina	22.68
Humedad	4.56
Cenizas	8.81

Tabla 2I.- Producción de deshechos agrícolas en México.

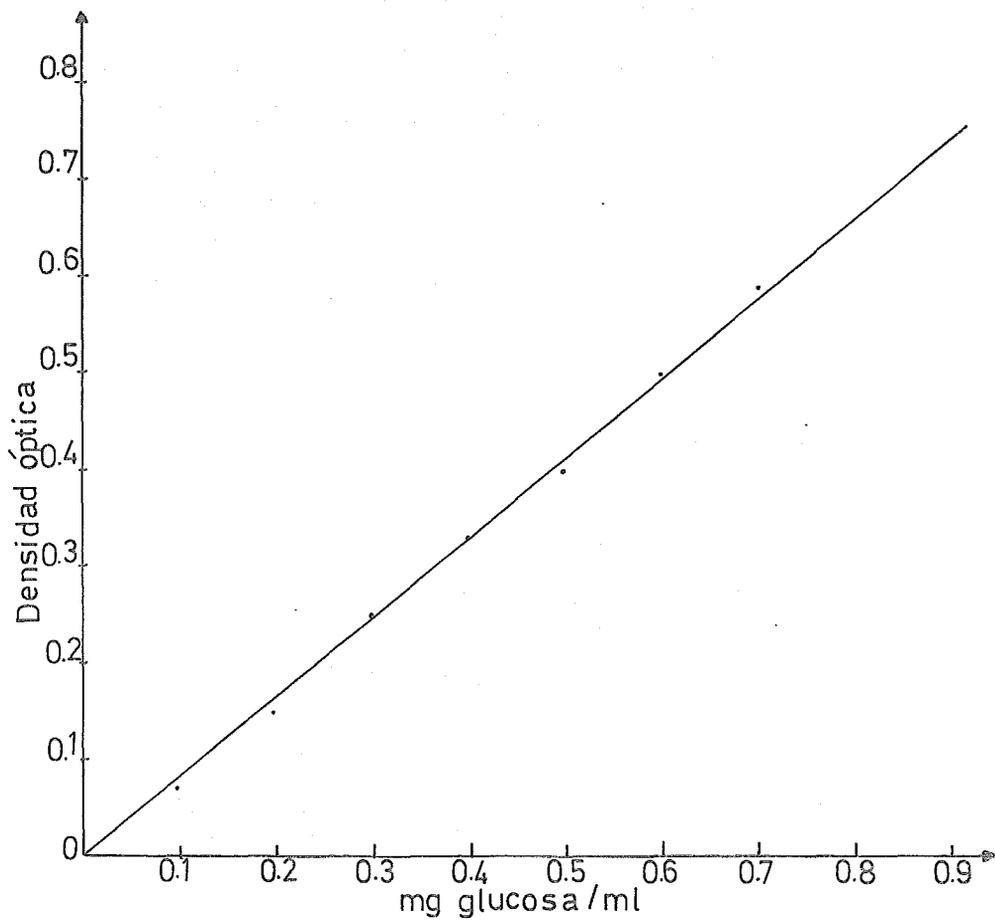
Producción de deshechos
(toneladas)

Año	Caña de Azúcar	Cebada	Trigo
1971	14,721,815	35,143	508,984
1972	14,513,396	40,309	502,907
1973	14,787,564	51,007	581,143
1974	15,074,615	32,551	775,224
1975	16,128,257	57,733	777,904
1976	14,123,948	71,399	934,997

Los porcentajes de desperdicio de cada -- cultivo usados para calcular la producción de deshechos fueron los siguientes: de trigo 27.8%, de cebada 12.89% y de caña de azúcar 45%.



Graf. 11. - Curva estándar de azúcares reductores (xilosa), 550 nm.



Graf. 21. - Curva estándar de azúcares reductores (glucosa), 550 nm.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- J. C. Senez (1976), Microbiología General, Alhambra, Madrid, págs. 303-305.
- 2.- L. Weinstein (1975), Antimicrobial Agents en The Pharmacological Bases of Therapeutics, L. S. Goodman, A. Gilman, ed. Macmillan, New York, págs. 1130-1131.
- 3.- W. W. Forrest, D. J. Walker (1971), The Generation and - - Utilization of Energy During Growth en Advances in Microbial Physiology, 5, págs. 213-279.
- 4.- H. Záhner, W. K. Maas (1972), Biology of Antibiotics, - - - Springer Verlag, New York, págs. 52.
- 5.- A. L. Demain (1971), Overproduction of Microbial Metabolites and Enzymes Due to Alteration of Regulation en Advances in - Engineering, Vol. 1, T. K. Ghose, A. Fiechter, ed. Springer Verlag, Berlín, págs. 113-139.
- 6.- S. Aiba, A. E. Humphry, N. F. Millis (1973), Biochemical Engineering, Academic Press, Tokyo, págs. 128-140.
- 7.- A. Cantarow, B. Schupartz (1967), Bioquímica, 4a. edición Interamericana, Madrid, págs. 16-18.
- 8.- A. L. Lehninger (1972), Bioquímica, 2a. edición, Omega, Madrid, págs. 246-247.
- 9.- Encyclopedia of Science and Technology, Vol. 5, (1960), Mc - Graw-Hill, New York.
- 10.- G. Viniestra González (1977), Consideraciones Económicas sobre el Aprovechamiento de los Desperdicios Agrícolas, Ganaderos y Agroindustriales en Apuntes del curso de Biotecnología para el Aprovechamiento de los Desperdicios Orgánicos. UAM Iztapalapa, D. F., Noviembre.
- 11.- J. M. Pautrau (1966), By-Products of the Cane Sugar Industry Elsevier Publishing Company.
- 12.- Encyclopedia of Science and Technology, (1960), Vol. 2, Mc -- Graw-Hill, New York, págs. 620-626.
- 13.- M. Alexander (1961), Introduction to Soil Microbiology, John -- Wiley & Sons, Inc., New York.

- 14.- T. K. Ghose ed. (1978), Bioconversion of Cellulosic Substances into Energy Chemicals and Microbial Protein, (proviene de un Simposium en Nueva Delhi, India, 1977).
- 15.- E. B. Cowling, T. K. Kirk (1976), Properties of Cellulose -- and Lignocellulosic Materials as Substrates for Enzymatic -- Conversion en Biotechnology & Bioengineering, Symp. No. 6, -- John Wiley & Sons, Inc., New York, págs. 95-123.
- 16.- T. K. Kirk, W. J. Connors, J. G. Zeikus. Advances in -- Understanding the Microbial Degradation of Lignin en The -- Structure Biosynthesis and Degradation of Wood, Vol. II -- -- Plenum Press, New York, ed., Loewus and V. C. Runeckles, págs. 369-394.
- 17.- A. G. Walton, J. Blackwell (1973), Biopolymers, American -- Press, New York, págs. 466-474.
- 18.- K. Esau (1972), Anatomía Vegetal. Omega, Barcelona, págs. 50-82.
- 19.- T. K. Kirk (1971), Effects of Microorganisms on Lignin en -- Annual Review of Phytopathology, Vol, págs. 185-210.
- 20.- G. de Stevens, F. F. Nard (1951), Investigations on Lignin -- and Lignification VIII. Isolation and Characterization of Bagasse Native Lignin en Journal of American Chemical Society, Vol. -- 73, págs. 4622-4625.
- 21.- Métodos TAPPI. T12 OS-75, T 211 OS-58, T222 OS-74, T223 OS-78, T203 OS-74.
- 22.- E. B. Cowling (1963), Structural Features of Cellulose that -- Influence its Susceptibility to Enzymatic Hydrolysis en Advances in Enzymatic Hydrolysis of Cellulose and Related Materials, -- E. T. Reese, ed., Macmillan, London, págs. 1-31.
- 23.- A. J. Baker (1973), Effect of Lignin on the in vitro Digestibility of Wood Pulp en Journal of Animal Science, Vol. 36 No. 4, págs. 768-771.
- 24.- R. F. H. Dekker, G. N. Richards (1973), Effect of Delignification on the in vitro Rumens Digestion of Polysaccharides of Bagasse en Journal of Science and Food Agriculture, 24, págs. 375-379.

- 25.- A. J. Baker, M. A. Millett, L. D. Satter (1975), Wood and Wood Based Residues in Animal Feeds en Cellulose Technology Research, A. F. Turbak, ed., Symposium, serie 10 ACS Washington, D. C., págs. 75-105.
- 26.- R. W. Mellenberger, L. D. Satter, M. A. Millett, J. Baker (1970), An in vitro Technique for Estimating Digestibility of Treated and Untreated Wood en Journal of Animal Science, Vol. 30, No. 4, págs. 1005-1011.
- 27.- T. K. Kirk, W. E. Moore (1972), Removing Lignin From - - Wood with White-rot Fungi and Digestibility of Resulting Wood en Wood and Fiber, Vol. 4, No. 2, págs. 72-79.
- 28.- T. K. Kirk, W. J. Connors, J. G. Zeikus, Advances in - - Understanding the Microbiological Degradation of Lignin en -- The Structure Biosynthesis and Degradation of Wood, Vol. 11, F. Loews, V. C. Runckles, Plenum Press, New York.
- 29.- T. K. Kirk, E. Adler (1970), Acta Chem. Scand., 24, págs. 3379-3390
- 30.- T. K. Kirk, H. H. Yang, P. Keyser (1978), The Chemistry and Physiology of the Fungal Degradation of Lignin en Development in Industrial Microbiology, Vol. 19, págs. 51-61.
- 31.- P. Ander, K. E. Eriksson(1976), The Importance of Phenol - Oxidase Activity in Lignin Degradation by the White-rot Fungus Sporotrichum pulverulentum en Arch. Microbiology, 109, págs. 1-8.
- 32.- V. Westermark, K. E. Eriksson. Celobiose: Quinone Oxido - reductase a New Wood - Degrading Enzyme from White-rot -- Fungi. Acta Chem. Scand., 28, págs. 209-214.
- 33.- T. K. Kirk (1975), Lignin - Degrading Enzyme System en -- Biotechnology & Bioengineering, Symp. No. 5, págs. 139-150.
- 34.- T. Hiroi, K. E. Eriksson, B. Stenlund(1976), Microbiological Degradation of Lignin Part 2, Influence of Cellulose Upon the Degradation of Calcium Lignosulfonate of Various Molecular -- Sizes by the White-rot Fungus Pleurotus ostreatus en Svensk -- papperstidning, No. 5, págs. 162-166.
- 35.- T. K. Kirk, W. J. Connors, R. D. Bleam, W. F. Hackett, J. G. Zeikus (1975), Preparation and Microbial Decomposition of Synthetic ¹⁴C Lignins en Biochemistry, Vol. 72, No. 7, -- págs. 2515-2519.

- 36.- T. K. Kirk, E. Shultz, W. J. Connors, L. F. Lorenz, J.G. Zeikus (1978), Influence of Culture Parameters on Lignin - - Metabolism by Phanerochaete chrysosporium en Arch. Microbiol. 117, págs. 277-285.
- 37.- P. Keyser, T. K. Kirk, J. G. Zeikus (1978), Ligninolytic - - Enzyme System of Phanerochaete chrysosporium: Synthesized - in the Absence of Lignin in Response to Nitrogen Starvation en Journal of Bacteriology, Vol. 135, No. 3, págs. 790-797.
- 38.- M. A. Millett, A. J. Baker, W. C. Feist, R. W. Mellenberger (1970), Modifying Wood to Increase its in vitro Digestibility en Journal of Animal Science, Vol. 31, No. 4, págs. 781 - 788.
- 39.- G. Guzmán (1977), Investigación de los Hongos, Limusa, México pág. 122.
- 40.- N. Yoyama, K. Ogawa (1974), Comparative Studies on Cellulolytic and Oxidizing Enzyme Activities of Edible and Inedible -- Wood Rotters, en Mushroom Science IX, part I, Tokyo, págs. 715-759.
- 41.- L. A. Lindesfelser, R. W. Detroy, J. M. Ramstack, K. A. Worden (1979), Biological Modification of the Lignin and Cellulose Components of Wheat Straw by Pleurotus ostreatus., Soc. Industrial Microbiology (en impresión)
- 42.- M. J. Effland (1977), Modified Procedure to Determine Acid - Insoluble Lignin in Wood and Pulp en TAPPI, Vol. 60 No. 10, págs. 143-144
- 43.- A. Sreenivasan, V. Sadasivan (1939), Estimation of Nitrogen -- by the Kjeldahl Method. Nature of the Action of Selenium en - Ind. Eng. Chem., (Anal. Ed.), 11, 314.
- 44.- R. P. Poincelot, P. R. Day (1972), Simple Dye Release Assay for Determining Cellulolytic Activity of Fungi en Applied Microbiology, Vol. 23, No. 5, págs. 875-879.
- 45.- H. Kazuza, J. Zenjiro (1975), Studies on the Growth of Pleurotus ostreatus en Mushroom Science IX, International Conference (Japón).
- 46.- G. L. Miller (1959), Use of the Nitrosalicylic Acid Reagent -- for Determination of Reducing Sugar en Analytical Chemistry, Vol. 31, No. 3, págs. 426-428.

- 47.- T. K. Kirk Comunicación personal en Curso Latinoamericano sobre Fermentación de sustratos sólidos del 2 al 20 de octubre de 1978. Centro de Investigación del IPN.
- 48.- T. Kaneshiro (1977), Lignocellulosic Agricultural Wastes Degraded by Pleurotus ostreatus en Industrial Microbiology, Vol. 18, págs. 591-597.
- 49.- R. Quintero (1980), Ingeniería Bioquímica: Teoría y Aplicación Alhambra, México.
- 50.- Holocellulose in Wood (1951), Método Estándar TAPPI T9 m-51.
- 51.- Dr. Han, Comunicación Personal en I Curso Avanzado de Biotecnología del 29 de octubre al 2 de noviembre de 1979, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.
- 52.- Archivo, Dirección General de Economía Agrícola, SARH. -- Cultivos y Frutales 1978, Serie Estadística y Valorización.