



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA DIGESTIBILIDAD  
*IN VITRO* DEL SUSTRATO RESIDUAL DE RASTROJO DE  
MAÍZ EMPLEADO PARA LA PRODUCCIÓN DE HONGOS  
GOURMET (*LENTINULA EDODES* Y *HERICIUM SP.*).**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**QUÍMICO DE ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**EDGAR GARCÍA OROZCO**

**DIRECTOR DE TESIS**

**DRA. CLAUDIA CECILIA MÁRQUEZ MOTA**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2019**





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Inés Miranda Martínez

**VOCAL:** Armando Conca Torres

**SECRETARIO:** Claudia Cecilia Márquez Mota

**1er. SUPLENTE:** Adriana Vega Pérez

**2° SUPLENTE:** Adriana Berenice Pérez Jiménez

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

Laboratorio de Bromatología, Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México.

## **ASESOR DEL TEMA:**

Dra. Claudia Cecilia Márquez Mota

## **SUPERVISOR TÉCNICO:**

Q.A. Águeda García Pérez

## **SUSTENTANTE:**

Edgar García Orozco

## **Agradecimientos**

Al Programa de Apoyo a la Innovación e Investigación Tecnológica (PAPIIT-UNAM) con el proyecto IA204219 por financiar este trabajo.

## Índice

<b>1. Introducción .....</b>	<b>8</b>
<hr/>	
1.1. Panorama en México del grano y rastrojo de maíz .....	8
1.2. Métodos más comunes para mejorar la calidad nutricional del rastrojo de maíz.....	10
1.3. Hongos comestibles de podredumbre blanca .....	10
1.4. Producción e importancia de los hongos comestibles en México .....	10
1.5. Aprovechamiento de los subproductos agrícolas a partir del cultivo de hongos comestibles .....	11
1.6. Acerca de <i>Lentinula edodes</i> y <i>Hericiium sp.</i> .....	12
<b>2. Justificación.....</b>	<b>15</b>
<hr/>	
<b>3. Hipótesis .....</b>	<b>15</b>
<hr/>	
<b>4. Objetivo general.....</b>	<b>15</b>
<hr/>	
<b>5. Objetivos específicos.....</b>	<b>15</b>
<hr/>	
<b>6. Materiales y métodos .....</b>	<b>16</b>
<hr/>	
6.1. Cultivo de hongos.....	16
6.2. Determinación de humedad por secado en estufa .....	19
6.3. Determinación de cenizas totales en seco.....	21

6.4. Determinación de lípidos por el método Soxhlet.....	23
6.5. Determinación del nitrógeno total por el método Kjeldahl para calcular el % de proteína cruda (PC).....	25
6.6. Determinación de fibra detergente neutro (FDN).....	29
6.7. Determinación de fibra detergente ácido (FDA).....	32
6.8. Determinación de lignina, celulosa y hemicelulosa .....	35
6.9. Digestibilidad <i>in vitro</i> de materia seca (DIVMS) .....	40
6.10. Fracciones de la proteína .....	43
6.11. Perfil de aminoácidos .....	50
6.12. Determinación del incremento o disminución de materia seca en porcentaje de cada metodología .....	51
6.13. Análisis estadístico .....	51
<b>7. Resultados y Discusión .....</b>	<b>52</b>
<hr/>	
7.1. Análisis de las determinaciones correspondientes a la composición del sustrato agotado.....	52
7.2. Digestibilidad <i>in vitro</i> de materia seca .....	59
7.3. Fracciones de la proteína.....	61
7.4. Perfil de aminoácidos .....	69
<b>8. Conclusiones .....</b>	<b>71</b>
<hr/>	
<b>9. Perspectiva.....</b>	<b>72</b>
<hr/>	
<b>10. Bibliografía .....</b>	<b>73</b>
<hr/>	

## 11. Apéndice.....78

---

11.1. Anexo 1. Técnica de muestreo por cuarteo .....	78
11.2. Anexo 2. Códigos universales de los aminoácidos .....	79

### Índice de figuras

---

Figura 1. Principales entidades productoras-Maíz grano.....	8
Figura 2. Principales entidades productoras-Maíz forrajero.....	9
Figura 3. Hongo shiitake.....	13
Figura 4. Melena de león ( <i>Hericium erinaceus</i> ).....	14
Figura 5. Sustrato agotado. Rastrojo de maíz invadido por <i>L. edodes</i> L5.....	17
Figura 6. Sustrato agotado. Rastrojo de maíz invadido por <i>L. edodes</i> L15.....	18
Figura 7. Determinación de humedad por secado en estufa.....	20
Figura 8. Determinación de cenizas totales en seco.....	22
Figura 9. Determinación de lípidos por el método de Soxhlet.....	24
Figura 10. Determinación del nitrógeno total como proteína cruda por el método Kjeldahl.....	28
Figura 11. Determinación % FDN.....	31
Figura 12. Determinación % FDA.....	34
Figura 13. Determinación del % Lignina.....	38
Figura 14. Determinación del % Celulosa.....	39
Figura 15. Determinación del % DIVMS.....	42
Figura 16. Determinación del NI (Fracciones B2, B3 y C).....	46
Figura 17. Determinación del NSD (Fracción B1).....	48
Figura 18. Esquema de técnica muestreo por cuarteo resumida.....	78
Figura 19. Códigos universales de los aminoácidos.....	79

## Índice de tablas

---

Tabla 1. Formulación del sustrato donde fructificaron las cepas.....	16
Tabla 2. Resultados obtenidos de la determinación del % Humedad, % Cenizas, % Grasa, % Proteína, % FDN, % FDA, % Celulosa, % Lignina y % Hemicelulosa de la muestra control y del sustrato agotado seco con las cepas <i>L. edodes</i> y <i>Hericiium</i> sp.....	53
Tabla 3. Resultados obtenidos de la suma de las fracciones de la proteína del control y del sustrato agotado seco con las cepas <i>L. edodes</i> L5 y <i>L. edodes</i> L15.....	62
Tabla 4. Resultados obtenidos de la suma de cada fracción de la proteína comparada con la proteína cruda correspondiente al estudio de la composición del control y del sustrato agotado seco con las cepas <i>L. edodes</i> L5 y <i>L. edodes</i> L15.....	63
Tabla 5. Resultados obtenidos de las fracciones de la proteína del control y del sustrato agotado seco con las cepas <i>L. edodes</i> L5 y <i>L. edodes</i> L15.....	63
Tabla 6. Concentración de aminoácidos ( $\mu$ M) obtenidos del perfil de aminoácidos del control y del sustrato agotado seco con las cepas <i>L. edodes</i> L5 y <i>L. edodes</i> L15.....	70

## Índice de gráficas

---

Gráfica 1. (A) Contenido de proteína, (B) Contenido de cenizas y (C) Contenido de lignina.....	55
Gráfica 2. (A) Contenido de FDN, (B) Contenido de FDA, (C) Contenido de celulosa y (D) Contenido de Hemicelulosa.....	57
Gráfica 3. Contenido de grasa.....	58
Gráfica 4. Determinación digestibilidad <i>in vitro</i> .....	59
Gráfica 5. Fracciones de la proteína-Fracción A.....	64
Gráfica 6. Fracciones de la proteína-Fracción B1.....	65
Gráfica 7. Fracciones de la proteína-Fracción B2.....	66
Gráfica 8. Fracciones de la proteína-Fracción B3.....	67
Gráfica 9. Fracciones de la proteína-Fracción C.....	68



## 1. Introducción

### 1.1. Panorama en México del grano y rastrojo de maíz

En México el cultivo más importante es el maíz, su presencia diaria en la mesa de las familias mexicanas es reflejo de ello, además la planta es una excelente alternativa para alimentación de ganado, es decir, el maíz y el rastrojo de maíz son productos agrícolas de gran importancia para la alimentación humana y animal. Se entiende como rastrojos a los subproductos derivados de las actividades agrícolas, y se les considera como la porción del cultivo cosechado (hojas, tallos, espigas y brácteas de la mazorca) que queda después de extraer el grano (Reyes *et al.*, 2013), es decir, el residuo de la cosecha.

En 2017, la producción de maíz alcanzó los 27.7 millones de toneladas, con un valor de 100 206 millones de pesos (SIAP, 2018). Las principales entidades productoras de maíz en México se muestran a continuación en la Figura 1.

Entidad federativa	Volumen (toneladas)		Variación (%) 2012-2017
	2012	2017	
<b>Total nacional</b>	<b>22,069,254</b>	<b>27,762,481</b>	<b>25.8</b>
Sinaloa	3,646,875	6,167,096	69.1
Jalisco	3,235,189	4,024,864	24.4
México	1,575,300	2,219,616	40.9
Michoacán	1,801,965	1,911,239	6.1
Guanajuato	1,217,706	1,642,835	34.9
Guerrero	1,304,133	1,357,557	4.1
Chiapas	1,404,680	1,296,940	-7.7
Veracruz	1,275,318	1,268,916	-0.5
Chihuahua	1,113,012	1,201,125	7.9
Puebla	1,002,278	1,027,726	2.5
Resto	4,492,799	5,644,568	25.6

Figura 1. Principales entidades productoras-Maíz grano. SIAP. (2018).  
Recuperado de <file:///E:/Tesis/Bibliografía/Libros/Atlas-Agroalimentario-2018.pdf>

Mientras que en el mismo año la producción de rastrojo de maíz alcanzó los 16.6 millones de toneladas, con un valor de 9 597 millones de pesos (SIAP, 2018). Las principales entidades productoras de rastrojo de maíz en México se muestran a continuación en la Figura 2.

Entidad federativa	Volumen (toneladas)		Variación (%) 2012-2017
	2012	2017	
<b>Total nacional</b>	<b>12,062,988</b>	<b>16,669,014</b>	<b>38.2</b>
Jalisco	2,592,469	5,745,139	122
Durango	2,339,554	2,318,292	-0.9
Zacatecas	1,057,976	1,845,932	74.5
Aguascalientes	1,107,132	1,433,917	29.5
México	949,420	1,167,075	22.9
Coahuila	664,091	1,063,718	60.2
Querétaro	688,894	726,298	5.4
Chihuahua	1,133,183	648,069	-42.8
Guanajuato	235,644	386,897	64.2
Puebla	249,780	336,781	34.8
Resto	1,044,845	996,897	-4.6

*Figura 2. Principales entidades productoras-Maíz forrajero. SIAP. (2018). Recuperado de <file:///E:/Tesis/Bibliografía/Libros/Atlas-Agroalimentario-2018.pdf>*

El principal residuo de las actividades agrícolas en México es el rastrojo de maíz, por arriba del rastrojo de sorgo con 3.5 millones y del rastrojo de avena con 9.6 millones de toneladas anuales (SIAP, 2018). El interés por la utilización de residuos agrícolas en la alimentación de rumiantes ha incrementado a nivel mundial en los últimos años, sin embargo, el rastrojo tiene bajo valor alimenticio y baja digestibilidad debido a su alto contenido de lignina, por lo tanto, para mejorar su valor nutrimental se deben buscar alternativas (Fuentes et al., 2006).

## 1.2. Métodos más comunes para mejorar la calidad nutricional del rastrojo de maíz

Estos métodos se clasifican en tres grupos: físicos, químicos y biológicos. Entre los métodos físicos está principalmente el picado, molienda y humectación con presión de vapor. Los químicos involucran el uso de sustancias alcalinas y finalmente los procesamientos biológicos consisten en el cultivo de hongos de podredumbre blanca que disminuyen el grado de lignificación de los esquilmos. La suplementación también es una forma efectiva para mejorar el aprovechamiento del rastrojo (Fuentes *et al.*, 2006).

## 1.3. Hongos comestibles de podredumbre blanca

Los hongos que descomponen la madera se clasifican en dos grupos, los hongos de podredumbre blanca y de podredumbre café, en función con su capacidad para degradar la lignina presente en la madera o en otros tejidos vegetales. Los hongos de la podredumbre blanca degradan lignina produciendo una zona blanca alrededor del micelio (la coloración es causada por enzimas secretadas extracelularmente), por otro lado, los hongos de la podredumbre café no degradan totalmente la lignina y por lo tanto no producen dicha coloración (Leonowicz *et al.*, 1999).

## 1.4. Producción e importancia de los hongos comestibles en México

En México, la producción de hongos comestibles inició en los años 30, con el cultivo de champiñón (*Agaricus bisporus*). En 1974 comenzó el cultivo de seta (*Pleurotus ostreatus*) y finalmente en 1984 el shiitake (*Lentinula edodes*). La producción nacional actual de hongos cultivados se estima en más de 55 mil toneladas. Más del 85% de la producción corresponde a champiñón, ~10% a seta y 0.1% a shiitake (INECOL, 2017). De hecho, México es uno de los países con la mayor variedad de hongos comestibles y es el primer productor en América Latina al generar el 80.8% de la producción, seguido por Brasil con el 7.7% y Colombia con el 5.2%. A nivel internacional México ocupa el décimo tercer lugar de los países productores. El sector agroalimentario específicamente de hongos comestibles, funcionales y medicinales tiene un valor aproximado de 4 000 millones de pesos anuales; genera

aproximadamente 25 mil empleos directos e indirectos; sobre todo en los estados del centro y sur del país. Cabe mencionar que en el cultivo de hongos se aprovechan diversos subproductos agrícolas, agroindustriales y forestales de más de 500 mil toneladas al año (CONACYT, 2016).

En México principalmente se ha aprovechado subproductos del campo, como los del maíz, sorgo, avena, cebada, trigo y aserrín provenientes de maderas de pino, encino, sajo e ilite, ya que son una fuente importante de nutrimentos para el crecimiento de los hongos, debido a que son capaces de descomponer y metabolizar de forma eficiente la materia orgánica, sin embargo, hay pocos estudios respecto a la utilización de rastrojo de maíz a nivel internacional, ya que se tiende a utilizar los subproductos agrícolas que más produce cada país, por ejemplo los de trigo en países al oriente (Romero *et al.*, 2014).

La importancia de la producción de hongos comestibles en México y en el mundo radica en el incremento de la demanda por parte de la población mundial debido al deleite culinario, al hecho de reconocer y valorar cada vez más las propiedades nutrimentales y medicinales en su consumo, así como en el aprovechamiento de los subproductos agrícolas que conlleva el cultivo de hongos (CONACYT, 2016).

#### 1.5. Aprovechamiento de los subproductos agrícolas a partir del cultivo de hongos comestibles

Como se mencionó anteriormente los hongos de podredumbre blanca tiene la capacidad de degradar la lignina presente en los esquilmos de maíz, sin embargo, después de su cultivo queda un residuo, que en la mayoría de los casos se desecha. Se estima que se producen cinco kilogramos de residuos por cada kilogramo de hongos cultivados (Correa *et al.*, 2016). El residuo obtenido de la producción puede ser una alternativa en la alimentación de ganado, ya que contiene lignina modificada o degradada, enzimas y micelio de hongos (Van *et al.*, 2015). Las enzimas y la composición dependen del sustrato utilizado y del mismo hongo. Las principales enzimas que producen los hongos de podredumbre blanca son lignocelulolíticas como: lacasas, peroxidasas de lignina y peroxidasas dependientes

de manganeso,  $\beta$ -glucosidasas, xilanasas y celulasas (Phan *et al.*, 2012). Se han encontrado estudios que demuestran que al alimentar ovinos con el residuo de producción de *Pleurotus sajor-caju* incrementa la digestibilidad de celulosa y grasa (Van *et al.*, 2015). También al alimentar cabras con este material aumenta la digestibilidad de la materia seca, materia orgánica y proteína cruda (Shrivastava *et al.*, 2012).

Con base a lo anterior el cultivo de hongos comestibles en rastrojo de maíz, es una buena alternativa para productores de setas, porque además de mejorar la digestibilidad de los residuos agrícolas para alimentación de rumiantes, los hongos pueden ser utilizados para autoconsumo o la venta, siendo una alternativa que promueve la sostenibilidad para la industria agrícola y la economía rural por sus bajos costos, además de ser amigable con el medio ambiente (Ding *et al.*, 2019).

#### 1.6. Acerca de *Lentinula edodes* y *Hericiium sp.*

\**Lentinula edodes* (Figura 3), también conocida como shiitake, es un hongo comestible de podredumbre blanca considerado como gourmet. Su origen es oriental y es la segunda especie más cultivada a nivel internacional con una producción de 180 mil toneladas, solo por debajo de los champiñones con 750 mil toneladas al año (Guzmán *et al.*, 2010). Su composición es principalmente proteínas y polisacáridos, brindándole un sabor único, que lo hacen enormemente popular principalmente entre los consumidores de Asia. *L. edodes* tiene la capacidad de secretar gran cantidad de enzimas lignocelulolíticas que degradan de manera eficiente la lignina y la celulosa, por lo tanto, estas enzimas tienen potencial en la transformación, blanqueo de fibras y remediación de biomasa. Además, cabe destacar las actividades inmunomoduladoras y anticancerígena de sus polisacáridos (Chen *et al.*, 2016), así como su alto valor nutrimental al ser un fuente de fibra, de vitaminas principalmente del complejo B, vitamina C y minerales (Jiang *et al.*, 2010).

Asia es el principal productor con más del 98.5% de la producción mundial (Chang, 2002). Los materiales empleados para su producción mayoritariamente son madera dura o su aserrín, los cuales representan hasta el 80% del total del sustrato empleado para su cultivo, por lo que el cultivo de *L edodes*, en los últimos años, se ha relacionado con un incremento en la tala de bosques. Actualmente, el cultivo de shiitake está creciendo en Australia, América, Europa y los países de América Latina, lo que indica la necesidad de proteger los recursos forestales, reducir el costo de producción y acortar su ciclo de cultivo reemplazando la madera o el aserrín con paja agrícola (en este caso con rastrojo de maíz) para el cultivo de la especie (Chen *et al.*, 2016).



*Figura 3. Hongo shiitake. Weller. K., (2006). Recuperado de [https://es.m.wikipedia.org/wiki/Archivo:Shiitake\\_mushroom.jpg](https://es.m.wikipedia.org/wiki/Archivo:Shiitake_mushroom.jpg)*

\**Hericium* sp. también es un hongo comestible de podredumbre blanca considerado como gourmet. Las especies de este género son blancas y carnosas. Los cuerpos fructíferos se asemejan a una masa suspendida ramificada. Esta estructura distintiva le ha valido a las especies de *Hericium* una variedad de nombres comunes: cabeza de mono, melena de león (Figura 4) y cabeza de oso por mencionar algunos. El cultivo de este hongo tiene una larga historia de uso en China y otros países orientales, principalmente por sus propiedades medicinales (Wang *et al.*, 2018).



Figura 4. Melena de león (*Hericium erinaceus*) Mushbank. (2018). Recuperado de <https://www.mushbank.com/lion-s-mane-hericium-erinaceus-live-culture-on-agar.html>

Son escasos los estudios relacionados sobre el aprovechamiento del residuo de la producción de los hongos comestibles *L. edodes* y *Hericium* sp. para alimentación de ganado, ya que el enfoque es primordialmente para su consumo debido a sus propiedades nutrimentales y medicinales, dejando a un lado el aprovechamiento del residuo de la producción.

## **2. Justificación**

En México, el principal producto de desecho de las actividades agrícolas es el rastrojo de maíz, el cual se emplea principalmente para la alimentación de rumiantes, lo que representa un problema, ya que el rastrojo debido a su alto grado de lignificación tiene un valor nutrimental bajo y baja digestibilidad, por lo tanto, el presente estudio busca alternativas para mejorar su valor nutrimental y digestibilidad.

## **3. Hipótesis**

Si se cultivan hongos gourmet sobre rastrojo de maíz, estos al ser potencialmente degradadores de lignina mejorarán la digestibilidad *in vitro* en rumiantes.

## **4. Objetivo general**

Determinar si la fructificación de los hongos gourmet (*Lentinula edodes* L5, *Lentinula edodes* L9, *Lentinula edodes* L15, *Lentinula edodes* LC y *Hericiium* sp.) sobre rastrojo de maíz mejora su valor nutrimental, así como la digestibilidad *in vitro* en ovinos.

## **5. Objetivos específicos**

A partir del residuo de la producción de los hongos *Lentinula edodes* y *Hericiium* sp utilizando como sustrato rastrojo de maíz:

- Determinar la humedad, cenizas, nitrógeno total, fibra detergente neutro, fibra detergente ácido, lignina, celulosa y hemicelulosa.
- Realizar las pruebas de digestibilidad *in vitro* de materia seca en ovinos.
- Realizar el análisis de las fracciones de la proteína.
- Determinar el perfil de aminoácidos.



## 6. Materiales y métodos

En el presente estudio se empleó el sustrato agotado, es decir, el rastrojo de maíz después de la fructificación de 5 cepas de hongos gourmet, cuatro del género *Lentinula* (*L. edodes* L5, *L. edodes* L9, *L. edodes* L15 y *L. edodes* LC) y uno del género *Hericiium* (*Hericiium* sp.) utilizando como muestra control el sustrato de rastrojo de maíz sin la fructificación de ningún hongo.

Las condiciones de trabajo correspondieron a la temperatura ambiente y presión de la Cd. de México (~25°C/585mmHg).

### 6.1. Cultivo de hongos

La elaboración e inoculación de los sustratos se llevó a cabo en Hongos el encinal ubicado en Av. Libertad 7, Centro, 52240 Chapultepec, Estado de México, mientras que la fructificación se llevó a cabo en el laboratorio 324 del conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM por el Dr. Hermilo Leal Lara y su equipo de trabajo.

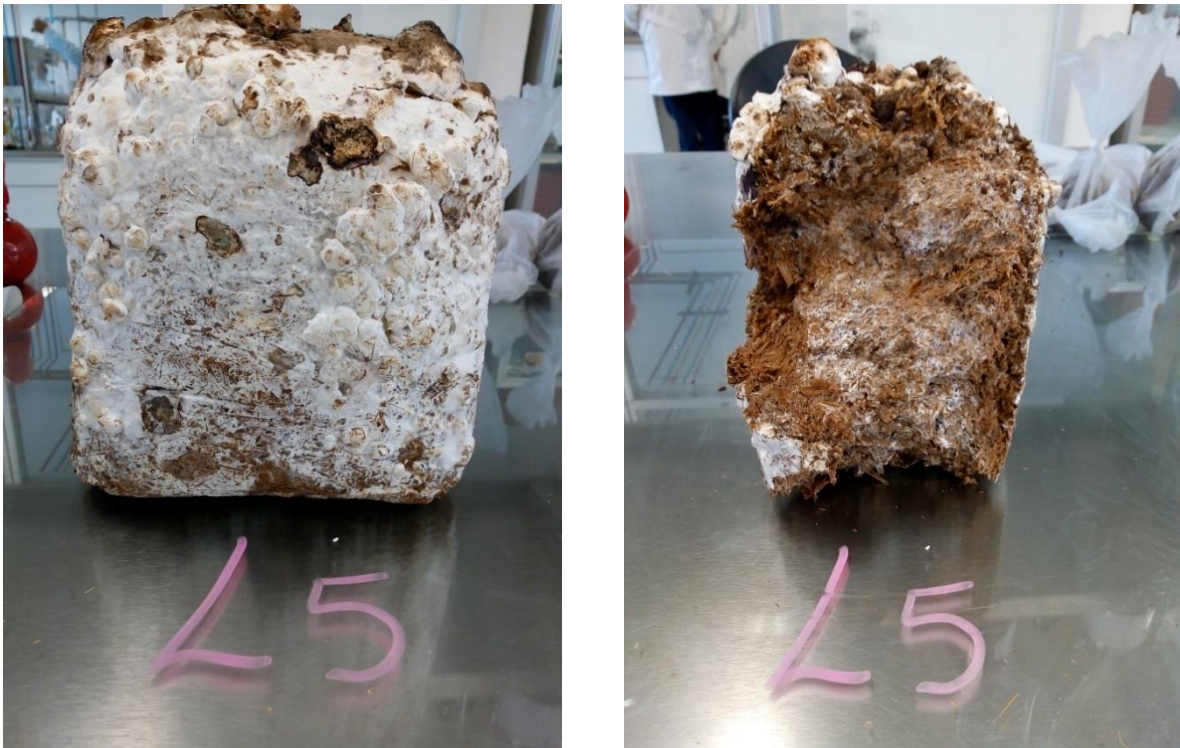
Las cepas fueron sembradas en medios de cultivo papa dextrosa y posteriormente fueron inoculados en semillas de trigo (a temperatura ambiente evitando cambios drásticos), una vez invadidas por el micelio (aproximadamente 2 semanas después) se mezclaron con una formulación de rastrojo de maíz en bolsas de polipropileno (misma temperatura durante 2 semanas más).

La formulación del sustrato de rastrojo de maíz se presenta en la Tabla 1.

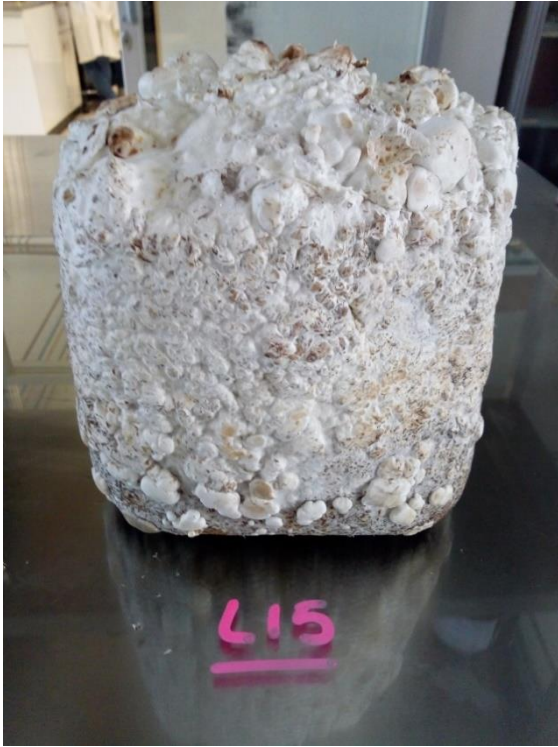
**Tabla 1. Formulación del sustrato donde fructificaron las cepas**

<i>Ingrediente</i>	<i>Composición (g/100g sustrato seco)</i>
<i>Rastrojo de maíz</i>	80
<i>Sorgo molido</i>	6
<i>Salvado</i>	4
<i>Gluten</i>	5
<i>CaCO<sub>3</sub></i>	4
<i>CaSO<sub>4</sub></i>	1
<i>Total</i>	100

Posteriormente las bolsas se colocaron en un cuarto de fructificación controlando rigurosamente la temperatura y la humedad (manteniendo a 25°C y con una humedad entre 75 y 90%) durante un periodo de 4 semanas. Transcurrido el periodo de tiempo se retiró la bolsa obteniendo así el sustrato agotado.



*Figura 5. Sustrato agotado. Rastrojo de maíz invadido por L. edodes L5*



*Figura 6. Sustrato agotado. Rastrojo de maíz invadido por L. edodes L15*

Finalmente, se tomó una muestra de sustrato agotado de cada cepa y se secaron, es decir, en el presente estudio se trabajó con el sustrato agotado seco.

El análisis de las determinaciones correspondientes a la composición del sustrato agotado se llevó a cabo en el Laboratorio de Bromatología, Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, el cual contempló la determinación de humedad, cenizas, nitrógeno total, fibra detergente neutro, fibra detergente ácido, lignina, celulosa y hemicelulosa.

## 6.2. Determinación de humedad por secado en estufa

### *Fundamento*

Este método se basa en la pérdida de peso de la muestra por evaporación del agua (Nollet, 1996). Cabe mencionar que en los alimentos el agua se encuentra en dos formas, como agua libre o agua ligada. La forma predominante es el agua libre y es la que se pierde durante este proceso, ya que está físicamente unida a la matriz del alimento y se libera con gran facilidad, mientras que el agua ligada se halla como agua de cristalización, ligada a las proteínas y/o hidratos de carbono, o bien, absorbida sobre la superficie de las partículas coloidales. (Hart, 1991).

Para realizar esta técnica se requiere que la muestra sea termoestable y que no contenga una cantidad importante de compuestos volátiles, como en este caso (Nollet, 1996).

### *Material*

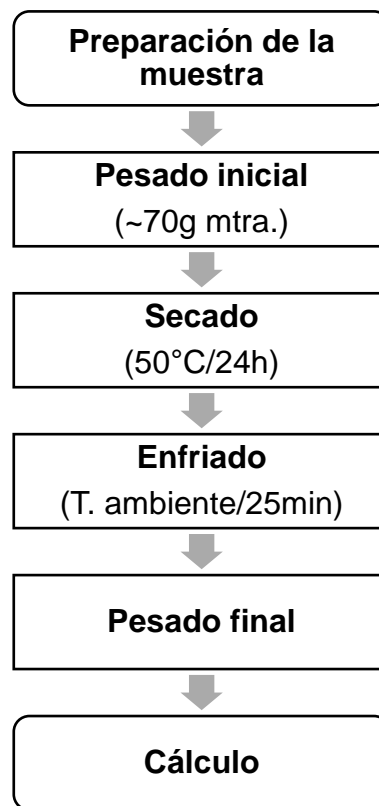
- Balanza de precisión EXPLORER OHAUS-E1B120
- Estufa FELISA FE-293AD
- Desecador
- Pesafiltros o charola de aluminio

### *Procedimiento*

La metodología fue con base a lo establecido por la Association of Official Analytical Chemists (A.O.A.C) 1990, con ligeras modificaciones. A partir de un lote de aproximadamente 250g, se aplicó el método de muestreo por cuarteo en 2 ocasiones para cada sustrato agotado hasta obtener una muestra final de

aproximadamente 70g (el cual se describe en el anexo 1). La muestra se colocó en charolas de aluminio perfectamente dispersas sin la formación de montículos y se pesó en la balanza de precisión. Posteriormente se secó la muestra en estufa 24h a 50°C. Se retiró de la estufa, se tapó y dejó enfriar a temperatura ambiente en un desecador 25min y pesó nuevamente. Finalmente se calculó el contenido de humedad, reportándolo como porcentaje (%).

A continuación, se resume la metodología en forma de diagrama de flujo para obtener el % de humedad.



*Figura 7. Determinación de humedad por secado en estufa*

*Cálculo*

$$\% \text{ Humedad} = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100$$

Donde:

P<sub>i</sub>: Peso en gramos de la muestra al inicio

P<sub>f</sub>: Peso en gramos de la muestra después del tratamiento térmico

Si se desea expresar como materia seca entonces se calcula la diferencia a 100 del % de humedad.

Posterior a este proceso las muestras se molieron en un molino THOMAS WILEY con criba de 1mm y se almacenaron en frascos de vidrio con cerrado hermético bien etiquetados. Cabe mencionar que la humedad no se determinó con la muestra molida, puesto que la fuerza mecánica ocasionaría un aumento de la temperatura y por ende un sesgo en la determinación.

### 6.3. Determinación de cenizas totales en seco

#### *Fundamento*

Este método se basa en la oxidación de la materia orgánica de un alimento en ausencia de flama a una temperatura que fluctúa entre los 550-600°C, y se entiende como cenizas al residuo inorgánico que queda después de la calcinación. El % de cenizas totales se determina por gravimetría (Nollet, 1996).

#### *Material*

- Balanza analítica KERN ALS 120-4
- Mufla FELISA FE-360
- Campana de extracción BG CE-170
- Desecador
- Crisoles de porcelana

#### *Procedimiento*

La metodología fue con base a lo establecido por la A.O.A.C 1990, con ligeras modificaciones. Se colocó a peso constante cada crisol 24h en estufa a 50°C. Posteriormente se pesó 1g de muestra en cada crisol (la muestra no sobrepasó la mitad del crisol) previamente pesado. En este caso no se calentó en mechero puesto que la muestra ya estaba seca y por lo tanto tenía muy poca humedad. En

seguida se introdujo a la mufla 24h a 500°C cuidando que la temperatura no fluctuara. Se encendió la campana al producirse humo hasta que este fue nulo. Se obtuvo unas cenizas blancas o ligeramente grises y homogéneas. Se enfrió a temperatura ambiente en el desecador 25min y pesó nuevamente. Finalmente se calculó el contenido de cenizas, reportándolo como %.

A continuación, se resume la metodología en forma de diagrama de flujo para obtener el % de cenizas.

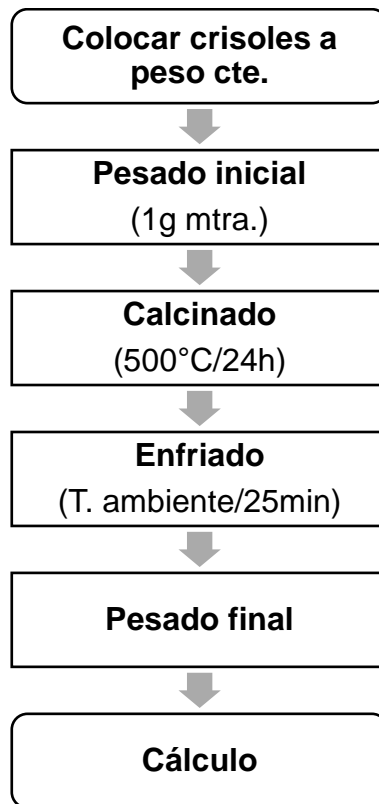


Figura 8. Determinación de cenizas totales en seco

*Cálculo*

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{Pf - Pi}{m} \times 100$$

Donde:

Pf: Peso en gramos del crisol con la muestra después de calcinar

Pi: Peso en gramos del crisol a peso constante

m: Peso en gramos de la muestra seca

#### 6.4. Determinación de lípidos por el método Soxhlet

##### *Fundamento*

Este método se basa en la extracción de lípidos de un alimento al ponerse en contacto con disolventes orgánicos y ser solubilizados, por lo tanto, los lípidos se cuantifican por pérdida de peso de la muestra (Nielsen, 1998).

##### *Material y reactivos*

- Equipo de extracción Soxhlet GERHARDT EV16
- Cartuchos de celulosa de 3.5cm de largo por 1.5cm de diámetro
- Estufa FELISA FE-293AD
- Balanza analítica KERN ALS 120-4
- Desecador
- Éter etílico

##### *Procedimiento*

La metodología fue con base a lo establecido por la A.O.A.C 1990, con ligeras modificaciones. Se colocó a peso constante cada cartucho de celulosa y cada matraz bola de fondo plano con piedras de ebullición en la estufa a 50°C por 24h. Se pesó 2g de muestra sobre un papel, se enrolló y colocó en el cartucho de celulosa, posteriormente se introdujo en el extractor (se aprovechó el espacio del extractor corriendo hasta 3 muestras a la vez). Paralelamente se agregó dos cargas del disolvente (éter etílico) al matraz con las piedras de ebullición y conectó el matraz con el extractor en el que se encontraba el cartucho con la muestra, se conectó éste al refrigerante y comenzó con calentamiento suave en la parrilla. Una vez extraído todos los lípidos (aproximadamente 4h después), se apagó el equipo y retiró el cartucho con la muestra desengrasada, se secó en la estufa a 50°C por 24h, se enfrió a temperatura ambiente en el desecador 25min y pesó nuevamente. Finalmente se calculó el contenido de lípidos, reportándolo como %.



A continuación, se resume la metodología en forma de diagrama de flujo para obtener el % de lípidos.

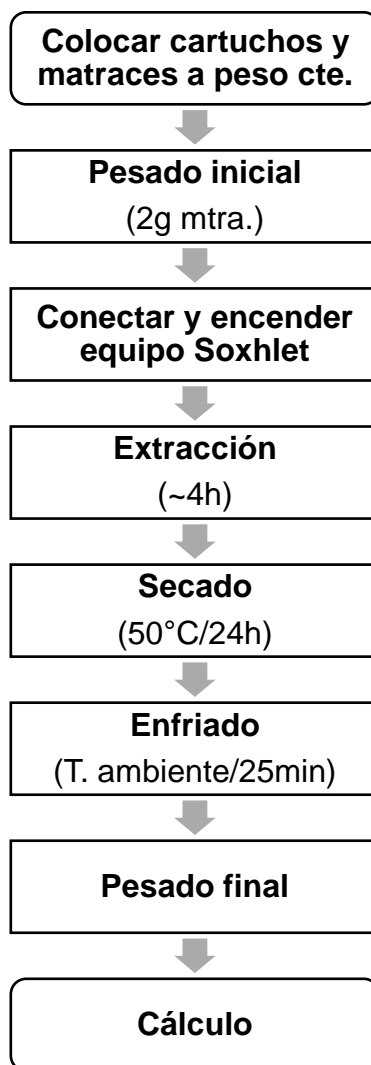


Figura 9. Determinación de lípidos por el método de Soxhlet

Cálculo

$$\% \text{ Lípidos} = 100 - \left( \frac{P_f - P_i}{m} \times 100 \right)$$

Donde:

Pf: Peso en gramos del cartucho de celulosa más muestra desengrasada seca

Pi: Peso en gramos del cartucho de celulosa a peso constante

m: Peso en gramos de la muestra seca

## 6.5. Determinación del nitrógeno total por el método Kjeldahl para calcular el % de proteína cruda (PC)

### *Fundamento*

Este método se basa en la cuantificación de la materia nitrogenada total, es decir, incluye tanto el nitrógeno no proteínico como el de las proteínas contenida en los alimentos, mediante la descomposición de la materia orgánica. El método consta de las siguientes etapas (Pearson, 1993):

### *Digestión*

Consiste en la oxidación de la materia orgánica en medio ácido por la acción de ácido sulfúrico concentrado en ebullición y un catalizador (aumenta el punto de ebullición del ácido sulfúrico acelerando la reacción), lo que conduce a la formación de dióxido de carbono, dióxido de azufre y sulfato de amonio.

### *Destilación*

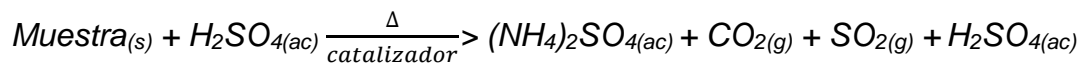
A la muestra que contiene sulfato de amonio se le adiciona una disolución alcalina de hidróxido de sodio lo que produce la liberación de amoníaco en forma de gas. Posteriormente el amoniaco se condensa y es fijado con una disolución de ácido bórico (que contiene una mezcla de indicadores de pH) como borato de amonio.

### *Titulación*

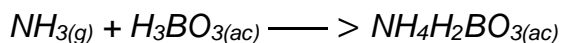
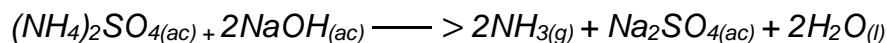
La disolución de borato de amonio se titula con una disolución de ácido clorhídrico, produciendo cloruro de amonio y nuevamente ácido bórico. Finalmente se determina el nitrógeno total considerando el volumen gastado de ácido clorhídrico y la estequiometría de toda la reacción.

Las reacciones químicas de esta metodología se muestran a continuación.

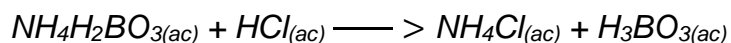
## Digestión



## Destilación



## Titulación



## Material y reactivos

- Digestor TECATOR
- Destilador BUCHI KJELFLEX K-360
- Tubos de digestión TECATOR de 100mL
- Disolución de NaOH al 32%
- Ácido sulfúrico concentrado
- Disolución de HCl 0.1N valorada
- Agua destilada
- Mezcla catalizadora <sup>a</sup>
- Disolución de ácido bórico al 4% con indicadores<sup>b</sup>

a: Mezcla de sulfato de potasio (200g), sulfato de cobre pentahidratado (20g) y selenio metálico (5g)

b: Ácido bórico al 4% (1L), verde de bromocresol (10mL) y rojo de metilo (7mL)

Nota: El destilador se programó para inyectar durante 5s 70mL de agua destilada, 50mL de NAOH y 30mL de disolución de ácido bórico con indicadores.

### *Procedimiento*

La metodología fue con base a lo establecido por la A.O.A.C 1990, con ligeras modificaciones. Se pesó 1g de muestra e introdujo en un tubo de Kjeldahl, se agregó 1g de mezcla catalizadora y 20mL de ácido sulfúrico concentrado. Se encendió el digestor y precalentó a la temperatura de 400°C. Se colocaron los tubos en el portatubos del equipo Kjeldahl. Se puso la unidad de evacuación de gases con las juntas colocadas sobre los tubos de digestión y activó la trampa de succión de gases antes de que se produjeran estos. Posteriormente se calentó hasta total destrucción de la materia orgánica, es decir, hasta que el líquido negro marrón se visualizó a una coloración verde esmeralda transparente (aproximadamente 1h después). Una vez finalizada la digestión, sin retirar la unidad de evacuación de gases se dejó enfriar. Después del enfriamiento, se colocó en el destilador un matraz Erlenmeyer de 250mL junto con un tubo de digestión y se procedió a la destilación (con los reactivos y cantidades correspondientes mencionadas en materiales y métodos). La disolución de ácido bórico tiene un color rosado intenso debido al vire del rojo de metilo al tener un bajo pH, el cual cambia a color verdoso por la acción del verde de bromocresol al neutralizarse después de la destilación con hidróxido de sodio. Posteriormente se tituló la disolución del matraz obtenida con una disolución de HCl 0.1N normalizada hasta recuperar un vire a color rosado intenso. Cabe mencionar que se corrió un blanco (determinación sin muestra), el cual se consideró para llevar a cabo el cálculo del contenido de PC, reportándolo como %.

A continuación, se resume la metodología en forma de diagrama de flujo para obtener el % de PC.

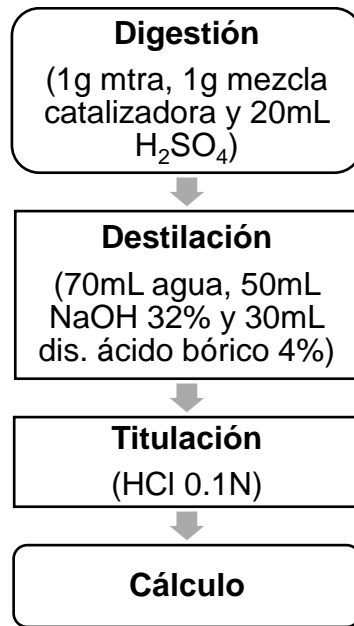


Figura 10. Determinación del nitrógeno total como PC por el método Kjeldahl

#### Cálculo

$$\% \text{ Nitrógeno} = \frac{(A-B) \times N \times meq}{m} \times 100$$

Donde:

A: mL de HCl gastado en la titulación de la muestra

B: mL de HCl gastado en la titulación sin muestra (blanco)

N: Normalidad del ácido clorhídrico (0.1)

meq: miliequivalentes de nitrógeno (0.014)

m: Peso en gramos de la muestra seca

El método Kjeldahl determina la cantidad de nitrógeno total, por lo tanto, se utiliza un factor de conversión para estimar la cantidad en % de PC. La mayoría de las proteínas tienen una cantidad aproximada de 16% de nitrógeno. Obteniendo así el valor de 6.25 como factor general de conversión.

Factor general

$$F = \frac{100g \text{ proteína}}{16g \text{ nitrógeno}} = 6.25$$

Por lo que el % de nitrógeno calculado se multiplica por dicho factor, obteniendo finalmente el % de PC.

$$\% \text{ PC} = \% \text{ Nitrógeno} \times F$$

## 6.6. Determinación de fibra detergente neutro (FDN)

### *Fundamento*

El tratamiento permite la obtención de un residuo fibroso (FDN) que es el principal componente de las paredes celulares de los vegetales: celulosa, hemicelulosa y lignina. Para ello se utiliza una disolución detergente neutro que disuelve algunos contenidos celulares de las plantas (proteínas, hidratos de carbono y lípidos). Cada componente de la disolución cumple con un objetivo específico, por ejemplo, el detergente es utilizado para solubilizar las proteínas y los lípidos por su acción tensoactiva formando micelas, el sulfito de sodio también ayuda a remover parte de alguna materia nitrogenada, el EDTA permite quelar calcio y remover pectinas a la temperatura de ebullición, el trietilenglicol ayuda a remover alguna materia no fibrosa de los alimentos concentrados y la amilasa termoestable se usa para remover el almidón (en este caso no se utilizó debido a que la cantidad de almidón era despreciable). La FDN se determina gravimétricamente como el residuo de la extracción (Van Soest *et al.*, 1991).

### *Material y reactivos*

- Balanza analítica KERN ALS 120-4
- Equipo de vacío para filtración con trampa correspondiente (adaptable a embudo Buchner)
- Equipo para baño María en aceite
- Canicas
- Desecador
- Papel filtro WHATMAN
- Tubos de ensaye

- Aceite (el de su preferencia en lugar de agua para baño María)
- Agua destilada
- Acetona RA
- Disolución detergente neutro<sup>a</sup>

a: Lauril sulfato de sodio (30g), ácido etilendiaminotetraacético sal disódica (18.61g), borato de sodio decahidratado (6.81g), fosfato de sodio dibásico anhídrido (4.56g) y 10mL de trietilenglicol. Aforado a 1L con agua destilada. Mantener aproximadamente 24h en agitación para disolver. Verificar que la disolución tenga un pH entre 6.9 y 7.1 (de no estar en este intervalo ajustar con HCl o NaOH).

### *Procedimiento*

La metodología fue con base a lo establecido por Van Soest 1991, con ligeras modificaciones. Se secó papel filtro a 50°C por 24h hasta peso constante. Se pesó 0.25g de muestra y depositó en los tubos de ensaye. Se adicionó 25mL de disolución detergente neutro (se recomienda agregar la disolución detergente neutro paulatinamente, es decir, 5mL cada 10min) y se puso a digerir a baño María 60min a 100°C con aceite en lugar de agua, ya que esta se evaporaría. Al comenzar la ebullición, se cubrió la boca de los tubos de ensaye con canicas frías (actuando como refrigerante). Posteriormente se decantó el contenido en el embudo con el papel filtro y se procedió a aplicar un mínimo de vacío. Se enjuagó el tubo de ensaye con agua destilada caliente para recuperar toda la muestra. Se lavó dos veces el residuo con aproximadamente 30mL de la misma agua permitiendo que se enjuague por dos minutos cada vez, lo mismo con 30mL de acetona. Se secó la muestra con vacío y se removió del embudo. Después se secó el papel filtro en estufa a 50°C por 24h, se enfrió a temperatura ambiente en el desecador 25min y pesó nuevamente. Finalmente se calculó el contenido de FDN, reportándolo como %.

A continuación, se resume la metodología en forma de diagrama de flujo para obtener el % de FDN.

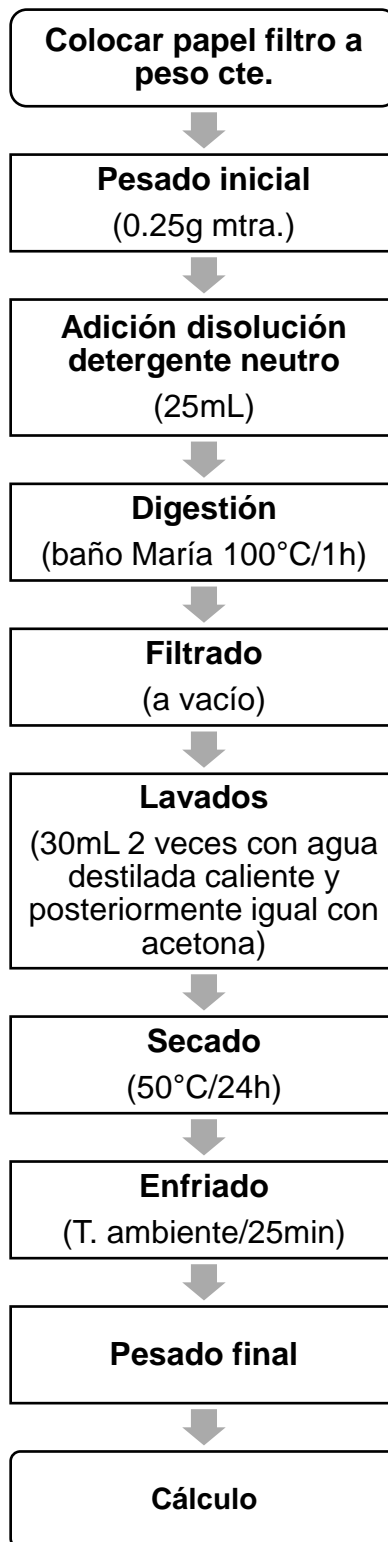


Figura 11. Determinación % FDN



### Cálculo

$$\% \text{ FDN} = \frac{PM-P}{m} \times 100$$

Donde:

PM: Peso en gramos del papel filtro seco con muestra después del tratamiento

P: Peso en gramos del papel filtro seco

m: Peso en gramos de la muestra seca

### 6.7. Determinación de fibra detergente ácido (FDA)

#### *Fundamento*

El tratamiento permite la obtención de un residuo fibroso (FDA) compuesto de celulosa y lignina, además de una porción de cenizas ácido-insolubles y silicatos. Para ello se utiliza una disolución detergente que disuelve los materiales solubles celulares en medio ácido, particularmente la hemicelulosa. La FDA se determina gravimétricamente como el residuo de la extracción (Van Soest *et al.*, 1991).

#### *Material y reactivos*

- Balanza analítica KERN ALS 120-4
- Equipo de vacío para filtración con trampa correspondiente (adaptable a embudo Buchner)
- Equipo para baño María en aceite
- Canicas
- Desecador
- Papel filtro WHATMAN
- Tubos de ensaye
- Aceite (el de su preferencia en lugar de agua para baño María).
- Agua destilada
- Acetona RA
- Disolución detergente ácido<sup>a</sup>

a: Cetil trimetil bromuro de amonio (20g) y ácido sulfúrico 1N (27mL). Aforado a 1L con agua destilada.

### *Procedimiento*

La metodología fue con base a lo establecido por Van Soest 1991, con ligeras modificaciones. Se secó papel filtro a 50°C por 24h hasta peso constante. Se pesó 0.25g de muestra y depositó en los tubos de ensaye. Se adicionó 25mL de disolución detergente ácido (se recomienda agregar la disolución detergente ácido paulatinamente, es decir, 5mL cada 10min) y se puso a digerir a baño María 60min a 100°C con aceite en lugar de agua, ya que esta se evaporaría. Al comenzar la ebullición, se cubrió la boca de los tubos de ensaye con canicas frías (actuando como refrigerante). Posteriormente se decantó cuidadosamente el contenido en el embudo con el papel filtro y se procedió a aplicar un mínimo de vacío. Se enjuagó el tubo de ensaye con agua destilada caliente para recuperar todo el residuo. Se lavó dos veces el residuo con aproximadamente 30mL de la misma agua, permitiendo que se enjuague por dos minutos cada vez. También dos veces con 30mL de acetona dos minutos entre cada enjuague.

Se secó la muestra con vacío y removió del embudo. Después se secó el papel filtro en estufa a 50°C por 24h, se enfrió a temperatura ambiente en el desecador 25min y pesó nuevamente. Finalmente se calculó el contenido de FDA, reportándola como %.

A continuación, se resume la metodología en forma de diagrama de flujo para obtener el % de FDA.

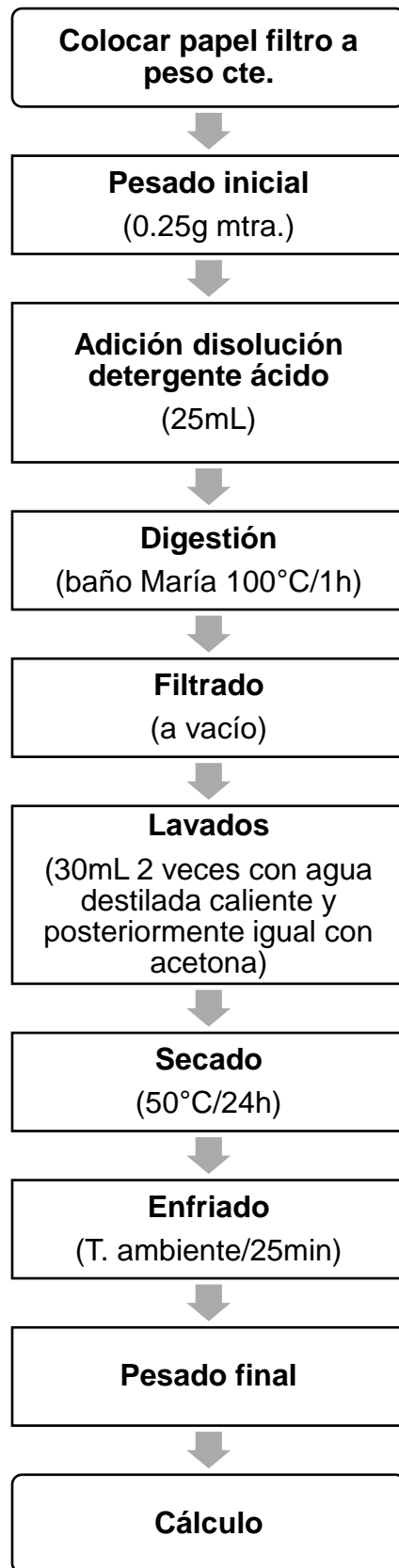


Figura 12. Determinación % FDA

### *Cálculo*

$$\% \text{ FDA} = \frac{PM-P}{m} \times 100$$

Donde:

PM: Peso en gramos del papel filtro seco con muestra después del tratamiento

P: Peso en gramos del papel filtro seco

m: Peso en gramos de la muestra seca

### 6.8. Determinación de lignina, celulosa y hemicelulosa

#### *Fundamento*

A partir del residuo fibroso del método de FDA (lignina y celulosa) se pretende solubilizar la lignina a través de su oxidación. La lignina se oxida con una disolución de permanganato de potasio amortiguada con ácido acético y sales (como catalizadores). El permanganato reducido a óxidos de manganeso, la lignina oxidada y las sales se remueven con una disolución desmineralizadora (alcohol, ácido oxálico y ácido clorhídrico). Finalmente, con alcohol y acetona se termina por eliminar los residuos solubles, permaneciendo la celulosa y los minerales insolubles. El contenido de lignina se determina por diferencia entre el peso de la muestra de la FDA y el residuo de esta determinación que representa el contenido de celulosa (Van Soest *et al.*, 1991).

#### *Material y reactivos*

- Balanza analítica KERN ALS 120-4
- Equipo de vacío para filtración con trampa correspondiente (adaptable a crisoles Gooch de vidrio de 30mL)
- Barillas de agitación de 4cm
- Desecador
- Alcohol etílico al 80%

- Disolución saturada de permanganato de potasio <sup>a</sup>
- Disolución amortiguadora de lignina <sup>b</sup>
- Disolución desmineralizadora <sup>c</sup>

a: Permanganato de potasio (50g) y aforar a 1L de agua destilada, en agitación constante y protegida de la luz.

b: Nitrato férrico nonahidratado (6g) y nitrato de plata (0.15g) en 100mL de agua destilada. Combinar esta mezcla con 500mL de ácido acético glacial y 5g de acetato de potasio. Finalmente agregar 400mL de alcohol butílico terciario y homogenizar. He de considerar que el alcohol se presenta en forma de gel por lo que deberá calentarse en baño María a 26°C, para obtenerlo en estado líquido.

c: Ácido oxálico deshidratado (50g) en 700mL de alcohol etílico al 95%. Agregar 50mL de ácido clorhídrico concentrado y 250mL de agua destilada y homogenizar.

Nota: la disolución satura de permanganato de potasio se mezcla con la disolución amortiguadora de lignina en una relación 2:1 por volumen (disolución combinada de permanganato).

### *Procedimiento*

La metodología fue con base a lo establecido por Van Soest 1991, con ligeras modificaciones.

### *Determinación de lignina*

Obtener peso del crisol con el residuo de FDA y colocar el crisol en un recipiente de vidrio o de peltre de poca profundidad que tenga aproximadamente una capa de 2-3cm de espesor de agua fría. La fibra dentro de los crisoles no debe mojarse. Se agregó a los crisoles aproximadamente 20mL de la disolución combinada de permanganato de potasio (revisar nota de materiales y reactivos) sin llenarlos demasiado. Con la varilla de vidrio se agitó cuidadosamente cada 5min durante 90min a temperatura ambiente el contenido para deshacer los grumos y bañar a las partículas que se adhirieran a las paredes internas del crisol con la disolución de permanganato. Se colocó los crisoles en el equipo de filtración a vacío y filtró. Se situó los crisoles en una bandeja de vidrio o porcelana y a cada uno se le adicionó hasta la mitad la disolución desmineralizadora y dejó actuar durante 5 minutos (este procedimiento se repitió hasta obtener un color blanco de la fibra).

Posteriormente se llenó y lavó los crisoles dos veces con alcohol etílico al 80% y finalmente dos veces con acetona. Se aplicó el vacío nuevamente hasta la sequedad y se secaron los crisoles con muestra a 50°C por 24h, se dejó enfriar a temperatura ambiente en el desecador 25min y pesó.

#### Determinación de celulosa

Se incineró la muestra procedente de la determinación de lignina a 500°C por 24°C. Se dejó enfriar a temperatura ambiente en un secador 25min y pesó.

#### Determinación de hemicelulosa

El porcentaje de hemicelulosa de las muestras se obtuvo a partir de la diferencia entre la FDN menos la FDA, considerando que la FDN representa el contenido de lignina, celulosa y hemicelulosa y la FDA únicamente lignina y celulosa.

A continuación, se resume las metodologías en forma de diagrama de flujo para obtener el % de lignina y celulosa.

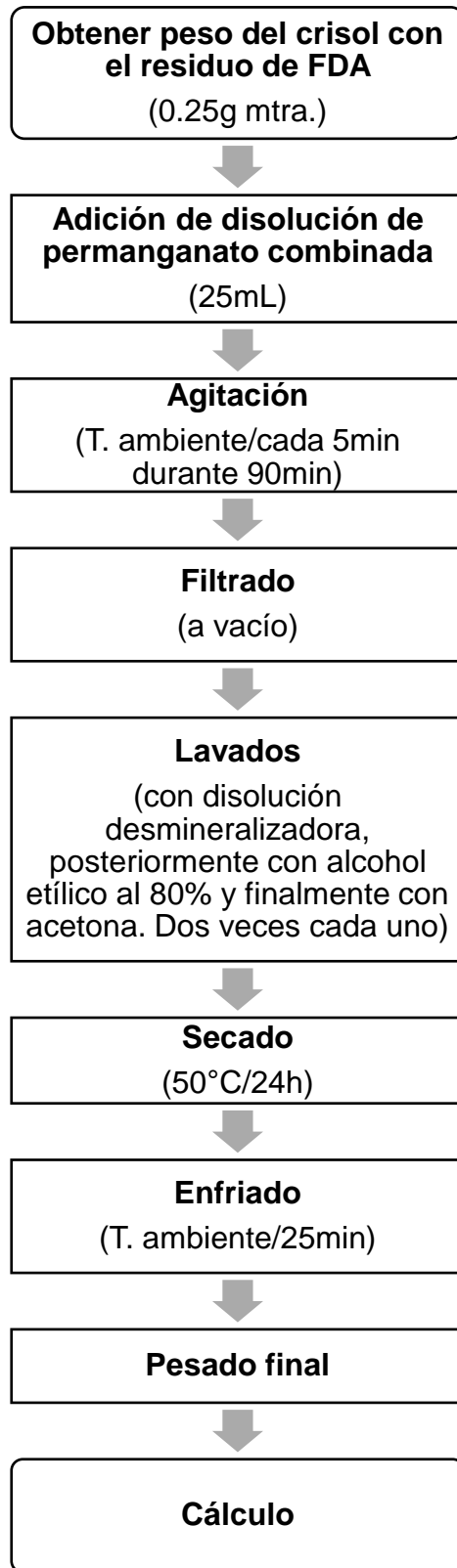


Figura 13. Determinación del % Lignina

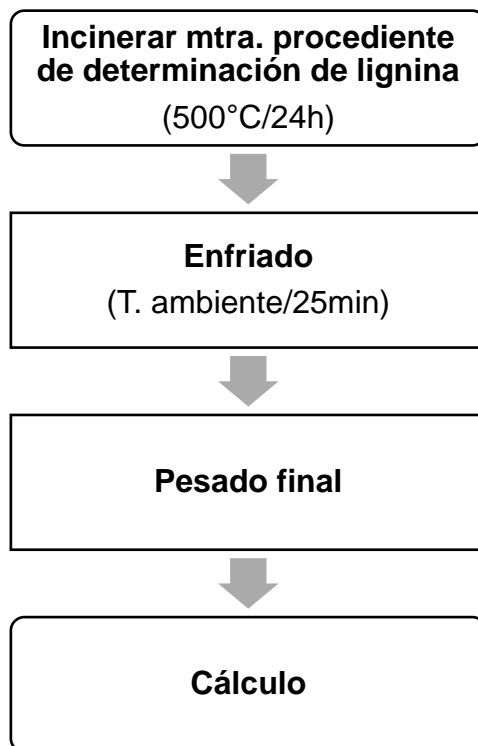


Figura 14. Determinación del % Celulosa

#### Cálculo

##### Determinación de lignina

$$\% \text{ Lignina} = \frac{P1 - P2}{P3} \times 100$$

Donde:

P1: Peso en gramos del crisol y de la fibra seca (FDA)

P2: Peso en gramos del crisol después de la oxidación con permanganato (celulosa)

P3: Peso en gramos de la muestra seca utilizada en el método de FDA

##### Determinación de celulosa

$$\% \text{ Celulosa} = \frac{P2 - P4}{P3} \times 100$$

Donde:

P2: Peso en gramos del crisol después de la oxidación con permanganato (celulosa)

P3: Peso en gramos de la muestra seca utilizada en el método de FDA

P4: Peso en gramos del crisol con las cenizas (principalmente silicio)



### Determinación de hemicelulosa

$$\% \text{ Hemicelulosa} = \% \text{ FDN} - \% \text{ FDA}$$

Donde:

% FDN: porcentaje de la fibra detergente neutro

% FDA: porcentaje de la fibra detergente ácido

### 6.9. Digestibilidad *in vitro* de materia seca (DIVMS)

Los estudios de fermentación *in vitro* se llevaron a cabo en el Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal (CEIPSA) ubicado en Avenida Cruz Blanca No. 486, en San Miguel Topilejo, Delegación Tlalpan, C.P. 14500, CDMX. Y en el laboratorio de nutrición del Departamento Nutrición Animal y Bioquímica (DNAB).

#### *Fundamento*

La técnica consiste en simular las condiciones de digestión propias del rumen de los animales de manera *in vitro* para determinar la digestibilidad de la materia seca de un alimento, la cual expresa la cantidad de nutrimentos sólidos que después de ser ingeridos se digieren y absorben a lo largo del tracto digestivo (Tilley & Terry, 1963).

#### *Material y reactivos*

- Molino THOMAS WILEY con cribas de 1mm
- Jeringas de 25mL
- Tubos FALCON de 50mL tapados con tapones con una válvula BUNSEN acondicionada
- Baño de agua con agitación THERMO SCIENTIFIC
- Centrífuga BEAR centrifuge-C2204
- Tanque de gas CO<sub>2</sub>
- Papel filtro WHATMAN

- Disolución amortiguadora de Mcdougall<sup>a</sup>
- Disolución de pepsina ácida<sup>b</sup>

a: Disolución 1= Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> anhídrido (3.7g), NaHCO<sub>3</sub> (9.8g) y agua desionizada a 40°C (1L). Disolución 2= NaCl (4.7g), KCl (5.7g), CaCl<sub>2</sub> (0.4g), MgCl<sub>2</sub> (0.6g) y agua destilada (100mL). La disolución amortiguadora se prepara adicionando 10mL de la disolución 2 a 1L de la disolución 1.

b: Pepsina 1:10 000 (2g), HCl (6.6mL) y agua destilada (1L).

### *Procedimiento*

La metodología fue con base a lo establecido por Tilley & Terry 1963. Para ello se tomaron muestras de líquido ruminal de un par de ovejas canuladas alimentadas con dieta base (ensilado de maíz y paja de avena). Se filtró rápidamente a través de 6 capas de gasas recolectándolo en un frasco de vidrio ámbar. Se conservó caliente (~40°C) y tapado. Se adicionó 250mL de líquido ruminal por cada litro de amortiguador a 40°C. Se homogenizó durante 15min y durante ese tiempo se le burbujeó CO<sub>2</sub>.

Se realizaron dos muestras adicionales:

- Blanco: únicamente líquido ruminal y disolución amortiguadora
- Estándar: muestra de alfalfa con líquido ruminal y disolución amortiguadora

Se pesaron 0.25g de muestra previamente molida y seca en los tubos FALCON y se adicionó a cada tubo 25mL del amortiguador con líquido ruminal y se taparon con las válvulas BUNSEN. Posteriormente se incubaron los tubos en el baño a 39°C por 48h con agitación ligera durante las primeras 6h de incubación. A las 48h se centrifugaron a 3000rpm por 10min y decantó en otros tubos FALCON tratando de evitar la pérdida de muestra. A los tubos con muestra se les adicionó 25mL de la disolución de pepsina a 40°C, se taparon e incubaron nuevamente a 39°C por 48h. Después de la incubación se filtraron. Se lavaron con agua destilada 2 veces. Se secaron a 55°C por 24h y pesaron. Finalmente se calculó el % DIVMS.

A continuación, se resume la metodología en forma de diagrama de flujo para obtener el % de DIVMS.

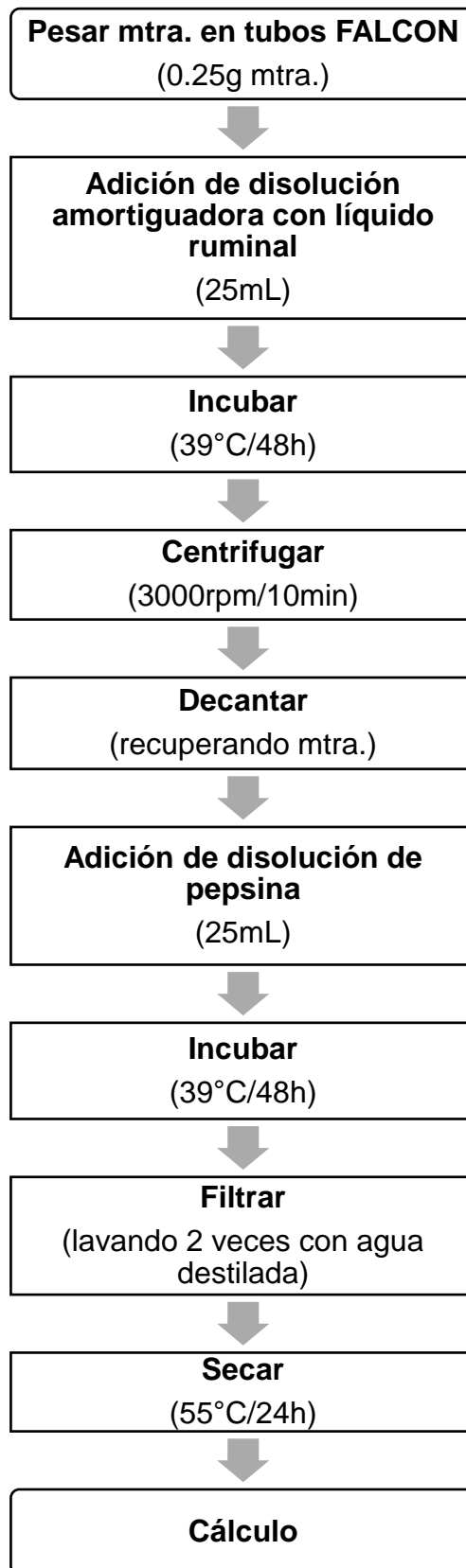


Figura 15. Determinación del % DIVMS

### *Cálculo*

$$\% \text{ DIVMS} = \frac{m - (R - B)}{m} \times 100$$

Donde:

R: Residuo en gramos de la muestra

B: Peso en gramos del blanco

m: Peso en gramos de la muestra seca

### 6.10. Fracciones de la proteína

El análisis se llevó a cabo en el Laboratorio de Bromatología, Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México.

#### *Fundamento*

Esta técnica divide el contenido de nitrógeno en tres fracciones: nitrógeno no proteínico o Fracción A, nitrógeno de proteína digerible o Fracción B y nitrógeno de proteína indigerible o Fracción C. En función a los distintos niveles de degradación que tiene el sistema digestivo del rumiante y la velocidad de fermentación de los microorganismos del rumen la Fracción B se subdivide en tres fracciones: B1, B2 y B3 (Krishnamoorthy *et al.*, 1982).

La cuantificación de nitrógeno de cada fracción se determina con base a su solubilidad:

- A y B1= nitrógeno soluble
- B2, B3 y C = nitrógeno insoluble

## *Material y reactivos*

### *Nitrógeno insoluble o Fracción B2, B3 y C*

- Balanza analítica KERN ALS 120-4
- Tubos de ensaye de 16x150mm
- Equipo de vacío para filtración con trampa correspondiente (adaptable a embudo Buchner)
- Estufa FELISA FE-293AD
- Agitador vortex THERMO SCIENTIFIC
- Disolución de alcohol terbutílico al 10%
- Disolución buffer<sup>a</sup>

a: Fosfato de sodio tetrahidratado (12.2g), Borato de sodio decahidratado (8.91g) por cada 1L de disolución. Verificar pH=6.8.

### *Nitrógeno soluble digerible o Fracción B1*

- Platina de calentamiento
- Disolución de sulfato de cobre pentahidratado al 6%
- Disolución de hidróxido de sodio al 1.25 m/v
- Disolución de ácido clorhídrico al 50 v/v

### *Nitrógeno insoluble ligada a FDN o Fracción B3 y C*

- Revisar material y reactivos de FDN.

### *Nitrógeno insoluble ligada a FDA o Fracción C*

- Revisar material y reactivos de FDA.

### *Procedimiento*

La metodología fue con base a lo establecido por Krishnamoorthy *et al.*, 1982.

### *Nitrógeno insoluble (NI)*

Se pesó 0.5 g de muestra previamente seca y molida, se colocó en tubos de ensaye, en seguida se adicionó 5mL de alcohol terbutílico al 10% y 5mL de disolución amortiguadora de borato/fosfato a pH= 6.8, con un equipo VORTEX se agitó cada cinco minutos durante una hora (la agitación y el pH favorecen la separación de las proteínas de la muestra que son solubles en alcohol). Posteriormente se filtró y lavó con una mezcla de 250mL de agua destilada y 50mL del buffer borato/fosfato. Es importante conservar el sobrenadante para la siguiente determinación. Finalmente se prosiguió a determinar el % PC por el método Kjeldahl al papel filtro con el residuo insoluble.

A continuación, se resume la metodología en forma de diagrama de flujo para obtener el % de NI.

.

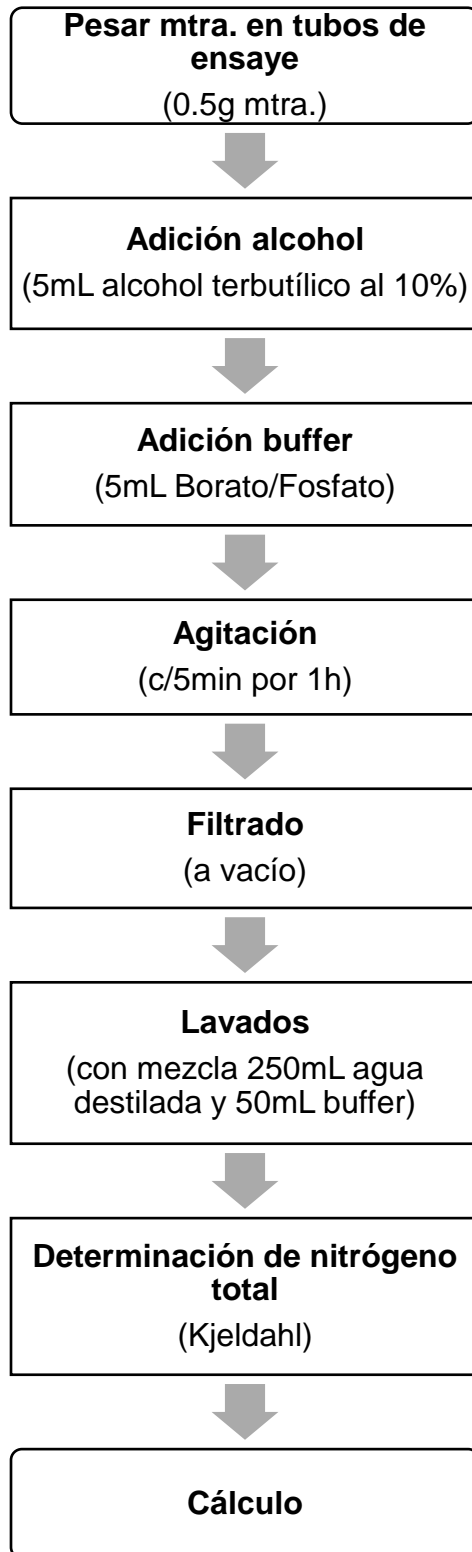


Figura 16. Determinación del NI (Fracción B2, B3 y C)

### Nitrógeno soluble digerible (NSD)

Se recuperaron 70mL de sobrenadante de la determinación de nitrógeno insoluble con una probeta de 100mL. El sobrenadante se vació en vasos de precipitado de 250mL, y se calentaron en una platina de calentamiento. Después se adicionó 1mL de HCl al 50% cuando comenzó a ebulir y se mantuvo en esta condición durante 10min (debido a la disminución del pH las proteínas que son solubles en alcohol a un pH de 6.8 se desnaturalizan). Posteriormente se agregaron 25mL de  $\text{CuSO}_4$  al 6% y se mantuvo ebuliendo 10min más (el cobre disuelto forma sales insolubles con las formas aniónicas de la proteína). Se agregó lo necesario de NaOH al 1.25% hasta que se observó el precipitado de las proteínas solubles (ya que se aumenta el pH y por ende se alcanza el punto isoeléctrico de las proteínas). Finalmente se dejó reposar por 24h y transcurrido ese tiempo, se filtró y lavó con agua destilada. Al papel filtro con el residuo soluble se le determinó el % PC por el método Kjeldahl.

A continuación, se resume la metodología en forma de diagrama de flujo para obtener el % de NSD.

.



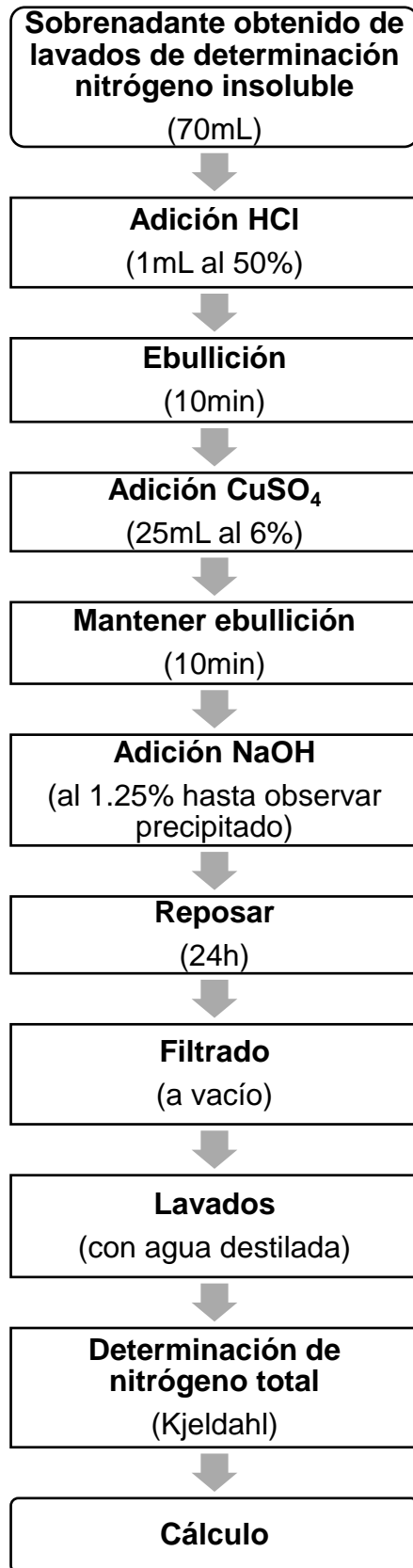


Figura 17. Determinación NSD (Fracción B1)

### Nitrógeno insoluble ligada a FDN (NFDN) y a FDA (NFDA)

Revisar procedimiento de las determinaciones de FDN y FDA.

El papel filtro con el residuo obtenido de estas dos determinaciones se les determinó el nitrógeno total por el método de Kjeldahl, con el fin de estimar la cantidad de proteína que se encuentra ligada en cada respectiva fibra.

### *Cálculo para determinar cada fracción*

#### Fracción A

$$\% \text{ Fracción A} = \% \text{ NT} - \% \text{ NI} - \% \text{ NSD}$$

Donde:

NT: Nitrógeno total (A, B1, B2, B3 y C)

NI: Nitrógeno insoluble (B2, B3 y C)

NSD: Nitrógeno soluble digerible (B1)

#### Fracción B1

$$\% \text{ Fracción B1} = \% \text{ NSD}$$

Donde:

NSD: Nitrógeno soluble digerible (B1)

#### Fracción B2

$$\% \text{ Fracción B2} = \% \text{ NI} - \% \text{ NFDN}$$

Donde:

NI: Nitrógeno insoluble (B2, B3 y C)

NFDN: Nitrógeno ligado a FDN (B3 y C)

### Fracción B3

$$\% \text{ Fracción B3} = \% \text{ NFDN} - \% \text{ NFDA}$$

Donde:

NFDN: Nitrógeno ligado a FDN (B3 y C)

NFDA: Nitrógeno ligado a FDA (C)

### Fracción C

$$\% \text{ Fracción C} = \% \text{ NFDA}$$

Donde:

NFDA: Nitrógeno ligado a FDA (C)

### 6.11. Perfil de aminoácidos

El estudio se llevó a cabo en el departamento de fisiología de la nutrición del Instituto Nacional de Nutrición “Salvador Zubirán”.

#### *Fundamento*

Determinación de la concentración de los 20 aminoácidos que conforman las proteínas, mediante HPLC (High Performance Liquid Chromatography).

#### *Material y reactivos*

- Balanza analítica KERN ALS 120-4
- Sistema de HPLC Agilent 1260 Infinity acoplado a una bomba binaria (Agilent G1312B) y un muestreador automático robótico (Agilent G1367B). Con una columna analítica Agilent ZORBAX Eclipse AAA 4.6x150mm, 5 micras acoplado a un detector de fluorescencia a 340nm de excitación y 450nm de emisión (Agilent G1321B).
- Disolución HCl 0.1M

### *Procedimiento*

Se pesaron directamente en frascos ámbar de 4cm de largo 400mg de muestra. A cada frasco se le adicionó 4mL HCl 0.1M y se cerraron con tapones de rosca, además se sellaron con láminas de Parafilm y posteriormente se enviaron al departamento de fisiología de la nutrición del Instituto Nacional de Nutrición “Salvador Zubirán” para llevar a cabo el perfil de aminoácidos de las muestras.

#### 6.12. Determinación del incremento o disminución de materia seca en porcentaje de cada metodología

La determinación de la pérdida o ganancia en porcentaje de cada metodología se hizo en función a la muestra control, considerándose los gramos iniciales de esta como el 100%, y simplemente se hizo la equivalencia en porcentaje de la diferencia en gramos que aumentó o disminuyó el sustrato agotado con cada cepa.

#### 6.13. Análisis estadístico

Los resultados de las determinaciones correspondientes a la composición del sustrato agotado (n=4), la DIVMS (n=7), las fracciones de la proteína (n=3) y el perfil de aminoácidos (n=3) se reportaron como el promedio  $\pm$  la desviación estándar (DE).

En todas las determinaciones se llevó a cabo el análisis estadístico por análisis de varianza (ANOVA) y comparación de medias (Tukey) al 95% de confianza, utilizando el programa GrapdPad Prism 5.

## 7. Resultados y Discusión

### 7.1. Análisis de las determinaciones correspondientes a la composición del sustrato agotado

De manera global en la Tabla 2 se presentan los resultados relacionados con la composición química de las muestras, como se observa hubo un cambio considerable en la composición del sustrato agotado respecto a la muestra control (sustrato de rastrojo de maíz sin inocular), hecho que se esperaba puesto que se sabe que los hongos de podredumbre blanca son capaces de degradar la biomasa lignocelulósica (Ding, 2019), por ejemplo se ha encontrado que el sustrato paja de trigo después del cultivo de *Pleurotus ostreatus* presentó un aumento en el contenido de nitrógeno y una reducción en la concentración de algunos minerales (Varnero *et al.*, 2010).

**Tabla 2. Resultados obtenidos de la determinación del % Humedad, % Cenizas, % Grasa, % Proteína, % FDN, % FDA, % Celulosa, % Lignina y % Hemicelulosa de la muestra control y del sustrato agotado seco con las cepas *L. edodes* y *Hericiium* sp.**

Cepa de hongo	% Humedad	% Cenizas	% Grasa	% Proteína	% FDN	% FDA	% Celulosa	% Lignina	% Hemicelulosa
<i>L. edodes</i> L5	2.4± 0.2 <sup>c</sup>	19.3± 1.0 <sup>a</sup>	5.2± 0.4 <sup>b</sup>	10.7± 0.7 <sup>c</sup>	45.5± 2.8 <sup>c</sup>	38.1± 0.3 <sup>bc</sup>	17.6± 1.1 <sup>c</sup>	15.3± 0.9 <sup>b</sup>	7.4±2.5 <sup>cd</sup>
<i>L. edodes</i> L9	3.6± 0.1 <sup>a</sup>	20.0± 0.3 <sup>a</sup>	7.3± 0.0 <sup>a</sup>	11.6± 0.1 <sup>b</sup>	45.3± 3.4 <sup>c</sup>	37.3± 0.3 <sup>c</sup>	16.6± 0.6 <sup>c</sup>	15.8± 0.5 <sup>ab</sup>	8.0± 3.6 <sup>cd</sup>
<i>L. edodes</i> LC	2.9± 0.1 <sup>bc</sup>	17.8± 0.1 <sup>b</sup>	5.1± 0.1 <sup>b</sup>	12.6± 0.2 <sup>a</sup>	52.5± 1.0 <sup>b</sup>	39.8± 0.2 <sup>b</sup>	20.3± 0.4 <sup>b</sup>	15.3± 0.4 <sup>b</sup>	12.7± 0.8 <sup>bc</sup>
<i>L. edodes</i> L15	3.1± 0.2 <sup>b</sup>	19.6± 0.4 <sup>a</sup>	3.6± 0.2 <sup>c</sup>	11.2± 0.2 <sup>bc</sup>	42.1± 0.4 <sup>c</sup>	39.5± 1.5 <sup>b</sup>	18.0± 2.0 <sup>bc</sup>	16.9± 0.1 <sup>a</sup>	2.6± 1.5 <sup>d</sup>
<i>Hericiium</i> sp	2.5± 0.2 <sup>c</sup>	16.7± 0.6 <sup>c</sup>	3.2± 0.2 <sup>c</sup>	8.8± 0.3 <sup>d</sup>	57.2± 1.4 <sup>b</sup>	39.7± 0.7 <sup>b</sup>	20.5± 0.5 <sup>b</sup>	14.8± 0.4 <sup>b</sup>	17.5± 2.1 <sup>ab</sup>
Control	4.1± 0.2 <sup>a</sup>	12.4± 0.2 <sup>d</sup>	5.5± 0.3 <sup>b</sup>	7.4± 0.1 <sup>e</sup>	64.1± 2.9 <sup>a</sup>	43.5± 1.6 <sup>a</sup>	29.2± 1.0 <sup>a</sup>	11.6± 1.3 <sup>c</sup>	21.6± 4.9 <sup>a</sup>

Los valores son los promedios ± la DE, n=4 por muestra. Las diferencias estadísticas se indican con letras diferentes (a>b>c>d>e), P<0.05.

Comparando los resultados de las muestras de sustrato agotado contra la muestra control se observó un incremento significativo ( $P < 0.05$ ) con todas las cepas en el % de cenizas, % PC y % de lignina.

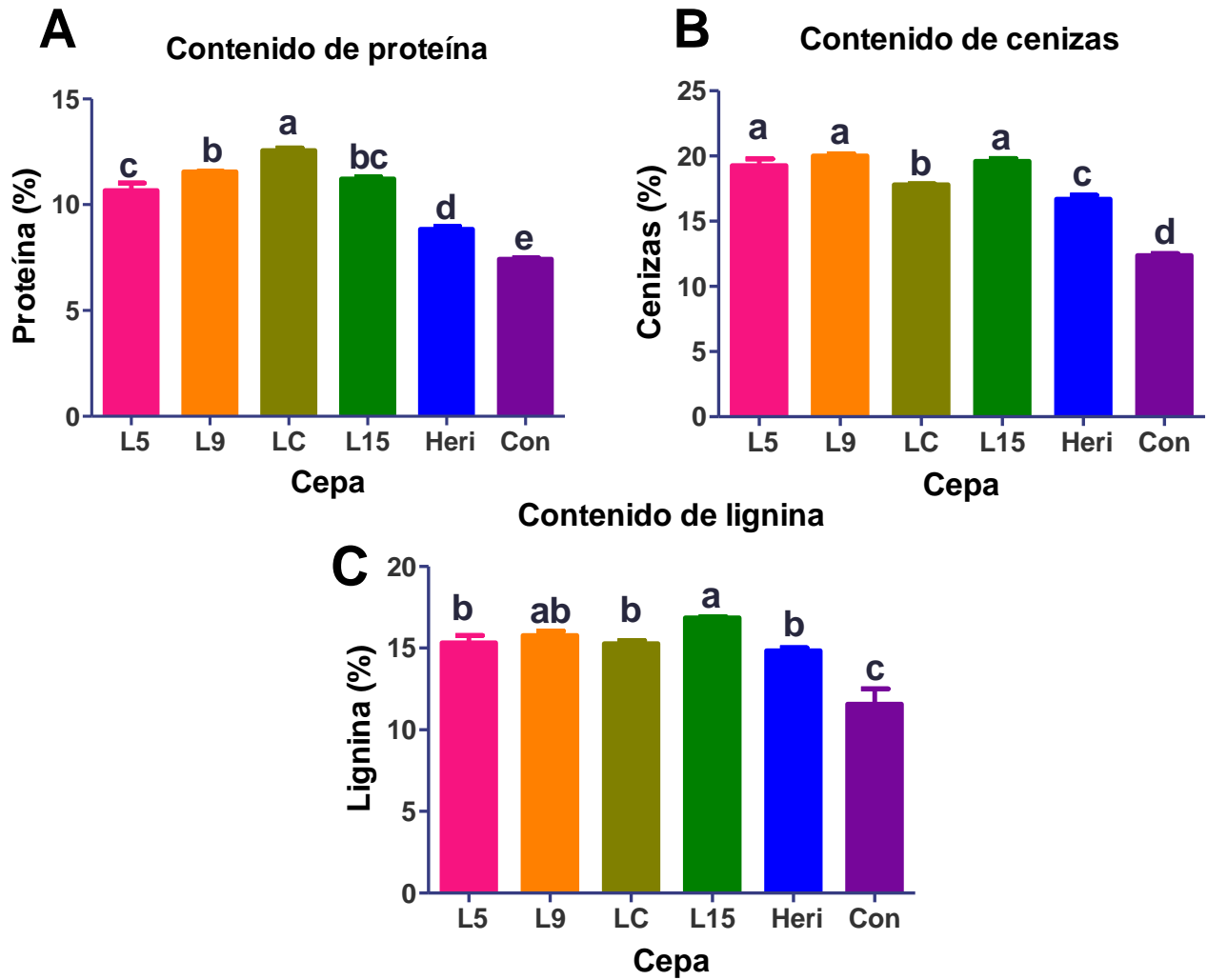
El incremento en el % de lignina se adjudicó a que los hongos para proliferar durante su incubación comenzaron de manera selectiva con el consumo de los polímeros de celulosa y hemicelulosa, lo que aparentemente aumentó el contenido de lignina, pero en realidad la lignina sólo se concentró al perder la materia orgánica de celulosa y hemicelulosa. En otros estudios se ha visto un fenómeno similar, es decir, en lugar de obtener una disminución en el % de lignina hubo un incremento, argumentando que podría deberse a que los hongos de podredumbre blanca consumieron una cantidad relativamente alta de nutrientes fácilmente accesibles y digeribles en lugar de lignina para su crecimiento durante el período temprano. El mismo estudio reporta un aumento significativo del contenido de lignina (utilizando como sustrato paja de trigo) durante la primera semana de fructificación con *Pleurotus ostreatus*. (Niu *et al.*, 2018).

A pesar del incremento significativo en el % de lignina se obtuvo un aumento en el % DIVMS como se esperaba, lo cual se detalla más adelante.

El hecho de incrementar en cuanto al % de cenizas y de PC se adjudicó a que la fructificación del hongo en el rastrojo de maíz dejó un residuo rico en minerales y nitrógeno propio del micelio (Van *et al.*, 2015).

El incremento en el % PC varió desde un 15.9% para el caso de *Hericiium* sp. hasta un 70.3% para el caso de *L. edodes* LC.

A continuación, se presenta de forma más detallada los componentes que aumentaron en relación con el control (Gráfica 1).



Gráfica 1. (A) Contenido de proteína, (B) Contenido de cenizas y (C) Contenido de lignina

Los valores son los promedios  $\pm$  la DE,  $n=4$  por muestra. Las diferencias estadísticas se indican con letras diferentes ( $a>b>c>d>e$ ),  $P<0.05$ . L5: *Lentinula edodes* L5, L9: *Lentinula edodes* L9, LC: *Lentinula edodes* LC, L15: *Lentinula edodes* L15, Heri: *Hericium* sp. y Con: control.

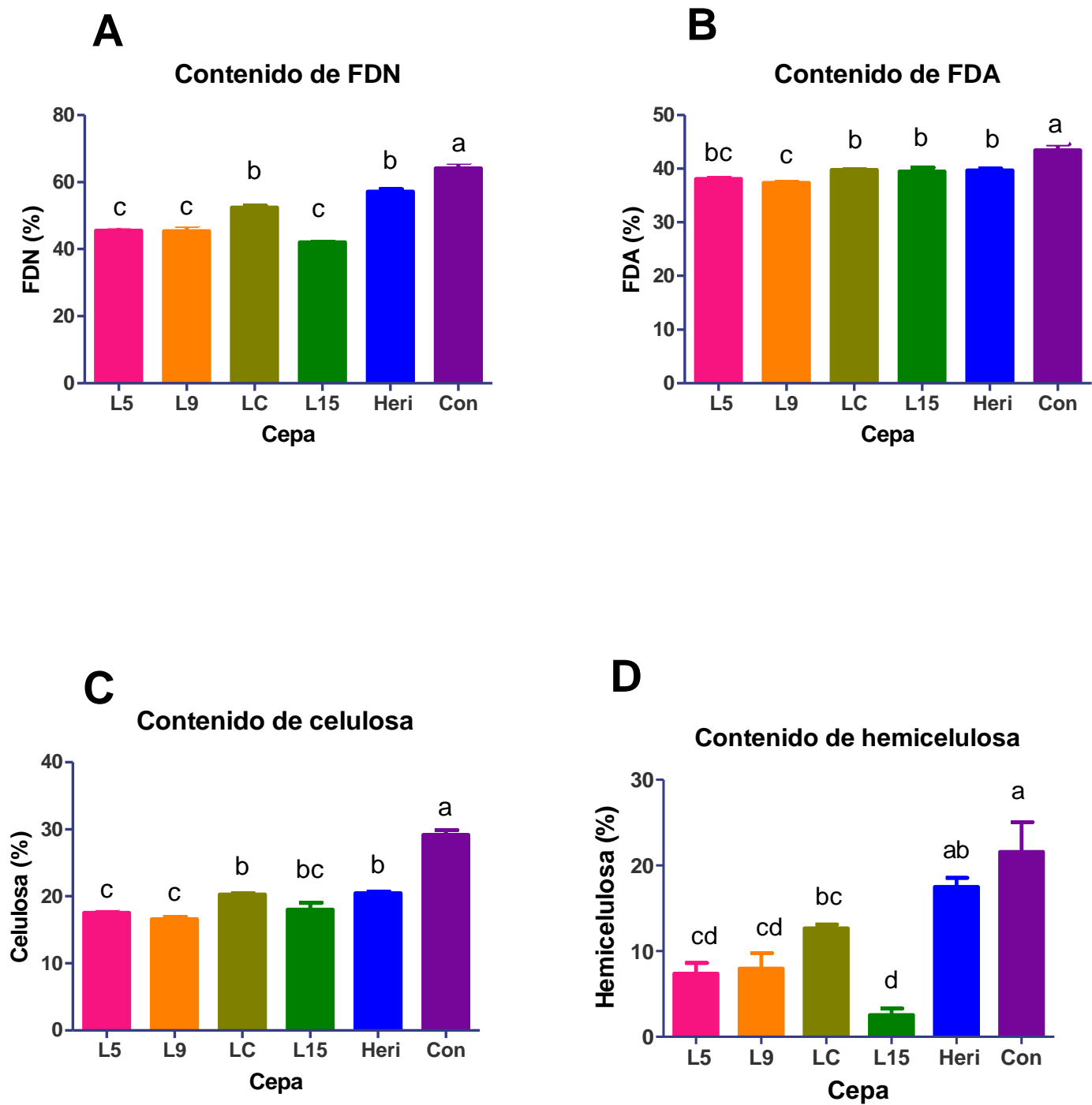


Por otro lado, como se esperaba el % FDN, % FDA, % Celulosa y % Hemicelulosa disminuyó significativamente ( $P < 0.05$ ) respecto a la muestra control (con todas las cepas excepto *Hericium* sp. en el contenido de hemicelulosa). La fibra neutra proviene de restos de pared celular vegetal, la cual está compuesta primordialmente de celulosa, hemicelulosa y lignina, en el caso de la fibra ácida sólo celulosa y lignina, hecho que coincide con los resultados obtenidos, puesto que el % FDN fue mayor respecto al % FDA (Van Soest *et al.*, 1991).

La disminución se adjudicó a que el hongo de manera selectiva utilizó como fuente de energía el carbono proveniente de los polímeros de celulosa y hemicelulosa, ya que tiene enzimas lignocelulolíticas (Phan *et al.*, 2012). La baja en el contenido FDN osciló de un 10.8% para el caso de *Hericium* sp. hasta un 34.3% para el caso de *L. edodes* L15, resultados que coincidieron con el contenido de hemicelulosa, es decir, la cepa con mayor disminución del % Hemicelulosa fue *L. edodes* L15 con un 88.0% y la cepa con menor disminución fue *Hericium* sp. con un 19.0%, aunque esta última no fue significativa.

Para el caso en el contenido de celulosa hubo una disminución de un 29.8% con *Hericium* sp. hasta un 43.2% con *L. edodes* L9.

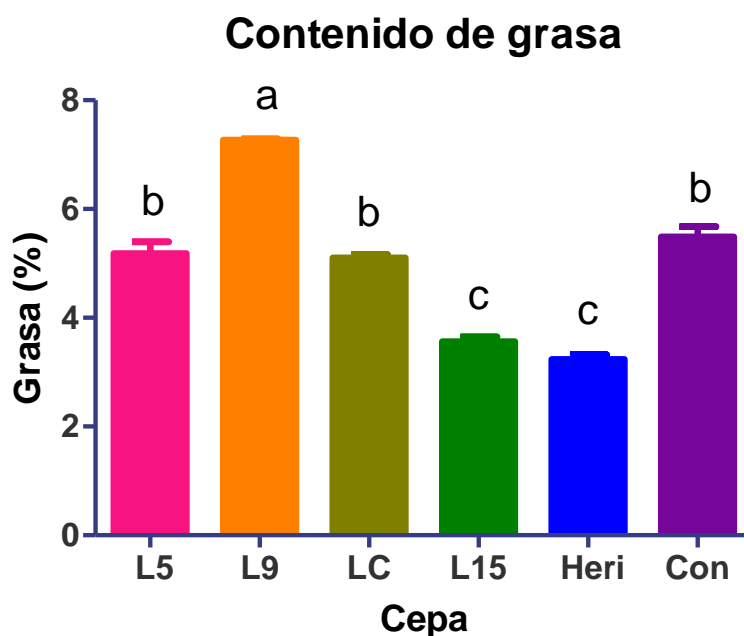
A continuación, se presenta de forma más detallada los componentes que disminuyeron en relación con el control (Gráfica 2).



Gráfica 2. (A) Contenido de FDN, (B) Contenido de FDA, (C) Contenido de celulosa y (D) Contenido de Hemicelulosa

Los valores son los promedios  $\pm$  la DE, n=4 por muestra. Las diferencias estadísticas se indican con letras diferentes (a>b>c>d), P<0.05. L5: *Lentinula edodes* L5, L9: *Lentinula edodes* L9, LC: *Lentinula edodes* LC, L15: *Lentinula edodes* L15, Heri: *Hericium* sp. y Con: control.

Como se observa en la Gráfica 3, en el caso del contenido de grasa únicamente *Lentinula edodes* L9 presentó un aumento significativo ( $P < 0.05$ ) del 32.7%. Este hecho se atribuyó a un incremento en la concentración de metabolitos tales como ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados propios de la síntesis de algunos hongos de podredumbre blanca como el caso del shiitake (Keller, 2005). Por otro lado, hubo dos cepas que disminuyeron significativamente ( $P < 0.05$ ) respecto a la muestra control, fue el caso de *Lentinula edodes* L15 y *Hericiium* sp. con una disminución del 34.5% y 41.8% respectivamente. Estudios reportan que la proporción de grasa en los cuerpos fructíferos de los hongos puede variar de 1.75 a 15.5% (Hong, 1988), por lo que el contenido obtenido de grasa en este estudio se encuentra dentro de los rangos normales.

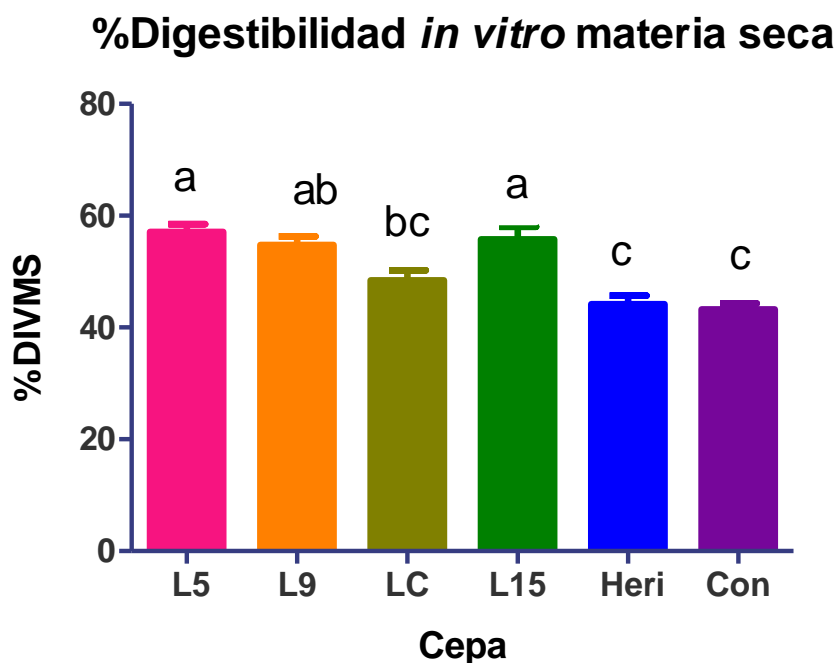


**Gráfica 3. Contenido de grasa**

Los valores son los promedios  $\pm$  la DE,  $n=4$  por muestra. Las diferencias estadísticas se indican con letras diferentes ( $a > b > c$ ),  $P < 0.05$ . L5: *Lentinula edodes* L5, L9: *Lentinula edodes* L9, LC: *Lentinula edodes* LC, L15: *Lentinula edodes* L15, Heri: *Hericiium* sp. y Con: control.

## 7.2. Digestibilidad *in vitro* de materia seca

Como se observa en la Gráfica 4, al comparar la prueba de digestibilidad *in vitro* del control (43.2%) contra los sustratos agotados con las cepas de *L. edodes* L5 (57.1%), *L. edodes* L9 (54.7%), *L. edodes* LC (48.4%), *L. edodes* L15 (55.8%) y *Hericiium* sp. (44.1%) hubo un incremento para todos los tratamientos del % DIVMS, sin embargo, el análisis estadístico indicó que el aumento fue significativo ( $P < 0.05$ ) únicamente con *L. edodes* L5, *L. edodes* L15 y *L. edodes* L9, mientras que *L. edodes* LC y *Hericiium* sp. no incrementaron significativamente ( $P < 0.05$ ). Las dos cepas con las que se presentó un mayor aumento fueron *L. edodes* L5 con un 32.2% y *L. edodes* L15 con un 29.2%.



**Gráfica 4. Determinación digestibilidad *in vitro***

Los valores son los promedios  $\pm$  la DE,  $n=7$  por muestra. Las diferencias estadísticas se indican con letras diferentes ( $a > b > c$ ),  $P < 0.05$ . L5: *Lentinula edodes* L5, L9: *Lentinula edodes* L9, LC: *Lentinula edodes* LC, L15: *Lentinula edodes* L15, Heri: *Hericiium* sp, Con: control y DIVMS: Digestibilidad *in vitro* de materia seca.

Cabe mencionar que el valor del estándar representa un parámetro importante para asegurar que la determinación fue llevada a cabo correctamente, puesto que el valor del % DIVMS está reportado en la literatura y tiene un valor de 62% aproximadamente (Tilley y Terry, 1963), en este caso se obtuvo un valor de 67.2%.

Los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado en la literatura en donde se ha indicado que el cultivo de hongos de podredumbre blanca incrementa la digestibilidad de los sustratos empleados para alimentación ruminal, por ejemplo, cuando se alimentaron cabras con este material incrementó la digestibilidad de la materia seca, materia orgánica y PC (Shrivastava *et al.*, 2012). También al alimentar ovinos con el residuo de producción de *Pleurotus sajor-caju* hubo un incremento en la digestibilidad de celulosa y grasa (Van *et al.*, 2015). En este punto cabe enfatizar que en México se utilizan residuos del campo para la producción de hongos, como los del maíz, sorgo, avena, cebada, trigo y aserrín provenientes de maderas de pino, encino, sajo e ilite, ya que son una fuente importante de nutrimentos para los hongos comestibles, debido a que son capaces de descomponer y metabolizar eficientemente la materia orgánica (Romero *et al.*, 2014), sin embargo, a nivel internacional los estudios existentes se han enfocado en el mejoramiento de otros rastrojos, ya que se tiende a utilizar los residuos agrícolas que más produce cada país, por ejemplo los de trigo en países al oriente, por lo tanto, son limitados los estudios a nivel mundial donde se cultivan hongos en rastrojo de maíz.

Por otro lado, a nivel genético estudios reportan que el genoma de *Lentinula edodes* contiene genes que codifican para síntesis de enzimas degradadoras de lignina (Chen *et al.*, 2016), además, se han encontrado estudios que demuestran que *L. edodes* sintetiza enzimas lignocelulolíticas de manera selectiva, donde se han cuantificado aproximadamente 600 unidades enzimáticas (U) de xilanasas después de la invasión en rastrojo de maíz (el mecanismo de acción de dicha enzima es hidrolizar el monosacárido xilosa presente en los polímeros de hemicelulosa) y aproximadamente 10.5U de celulasas (el mecanismo de acción de esta enzima es hidrolizar directamente el polímero de celulosa), contra una escasa actividad

enzimática aproximada de 2.4U para el caso de lacasas (Ding et al., 2019), lo que coincidió con una notable disminución en el contenido de celulosa y hemicelulosa, por lo tanto, corrobora la selectividad de *L. edodes* por ambos polímeros, lo que ocasionó el aparente aumento en el contenido de lignina, ya que esta sólo se concentró y a pesar de ello mejoró la digestibilidad como se mencionó anteriormente.

Relacionando los resultados correspondientes a la composición del sustrato agotado con el % DIVMS, cabe destacar que todas las cepas mostraron un aporte en el valor nutricional del rastrojo de maíz, en función al incremento significativo ( $P < 0.05$ ) en la cantidad de proteína y cenizas después de la fructificación de los hongos, por lo tanto, las cepas que son una buena alternativa para mejorar el valor nutricional y la digestibilidad de rastrojo de maíz en la alimentación de rumiantes son *L. edodes* L5 y *L. edodes* L15 y *L. edodes* L9. Sin bien *L. edodes* LC y *Hericiium* sp. no presentaron un aumento en la digestibilidad *in vitro*, el hecho de invadir y crecer sobre rastrojo de maíz les sigue brindando un potencial para producción.

Finalmente, sólo se eligió a las dos cepas con mayor incremento en el % DIVMS (*L. edodes* L5 y *L. edodes* L15) y se prosiguió a realizar las demás determinaciones.

### 7.3. Fracciones de la proteína

Los microorganismos predominantes del rumen son bacterias, protozoarios y hongos anaerobios, estos mantienen una relación simbiótica con el huésped, ya que dependen de las condiciones fisiológicas del rumiante para su existencia y a su vez, el rumiante depende de los microorganismos debido a que son esenciales para la digestión y fermentación de las grandes cantidades de alimentos fibrosos que consumen, de otra forma, no podrían utilizarla eficazmente. El rumiante proporciona un hábitat idóneo a los microorganismos y es capaz de cubrir sus propias necesidades nutritivas al utilizar los productos finales de la fermentación microbiana y actividades simbióticas, por lo tanto, los animales rumiantes gozan la capacidad única de subsistir a través de la síntesis de proteína microbiana en el interior del

rumen, sin disponer de una fuente de proteína dietética, es decir, los rumiantes tienen la capacidad de sobrevivir sin recibir aminoácidos esenciales de la dieta, al ser sintetizados por los microorganismos del rumen, sin embargo, los expertos del tema recomiendan suplementar la proteína con la dieta para garantizar un crecimiento rápido y una producción elevada en los animales domésticos (Churh *et al.*, 2003).

Cabe mencionar que la proteína microbiana más la proteína de la dieta que no se alcanza a degradar en rumen (también llamada proteína sobrepasante), proporcionan al intestino delgado proteína para ser digerida y absorbida. Se estima que 60-80% es proteína microbiana, 11-17% proteína sobrepasante y 5-10% nitrógeno no proteínico (Shimada, 2018).

Como se observa en la Tabla 3, hubo un incremento en el total de las fracciones de la proteína con ambas cepas (*L. edodes* L5 y *L. edodes* L15) respecto a la muestra control, lo que indicó un enriquecimiento en la cantidad de proteína del sustrato, hecho que coincide con los resultados obtenidos de la determinación de la PC por el método de Kjeldahl, es decir, el sustrato agotado es una buena alternativa para la dieta de los rumiantes, ya que incrementó el contenido de proteína.

**Tabla 3. Resultados obtenidos de la suma de las fracciones de la proteína del control y del sustrato agotado seco con las cepas *L. edodes* L5 y *L. edodes* L15**

<i>Cepa de hongo</i>	<i>Proteína cruda</i>
<i>L. edodes</i> L5	10.5± 0.0 <sup>a</sup>
<i>L. edodes</i> L15	11.7± 0.1 <sup>a</sup>
<i>Control</i>	7.5± 0.1 <sup>b</sup>

Los valores son los promedios ± la DE, n=3 por muestra. Las diferencias estadísticas se indican con letras diferentes (a>b),

P<0.05

Para garantizar que la determinación fue llevada a cabo correctamente se comparó el contenido de la suma de las fracciones de la proteína con la PC obtenida del estudio correspondiente a la composición del sustrato agotado (Tabla 4). Al realizar el análisis estadístico no se encontró diferencia significativa ( $P < 0.05$ ), lo que indicó que las técnicas fueron llevadas a cabo correctamente.

**Tabla 4. Resultados obtenidos de la suma de cada fracción de la proteína comparada con la proteína cruda correspondiente al estudio de la composición del control y del sustrato agotado seco con las cepas *L. edodes* L5 y *L. edodes* L15**

<i>Cepa de hongo</i>	<i>*Proteína cruda</i>	<i>+Proteína cruda</i>
<i>L. edodes</i> L5	10.5± 0.0	10.7± 0.7
<i>L. edodes</i> L15	11.7± 0.1	11.2± 0.2
<i>Control</i>	7.5± 0.1	7.4± 0.1

Los valores son los promedios ± la DE. \*Proteína cruda del total de la suma de las fracciones n=3 y +Proteína cruda del estudio correspondiente a la composición del sustrato agotado n=4.

Los resultados obtenidos de cada fracción de la proteína se muestran tabulados a continuación (Tabla 5).

**Tabla 5. Resultados obtenidos de las fracciones de la proteína del control y del sustrato agotado seco con las cepas *L. edodes* L5 y *L. edodes* L15**

<i>Cepa de hongo</i>	<i>Fracción A</i>	<i>Fracción B1</i>	<i>Fracción B2</i>	<i>Fracción B3</i>	<i>Fracción C</i>
<i>L. edodes</i> L5	1.9± 0.2 <sup>ab</sup>	1.7± 0.1 <sup>a</sup>	3.4± 0.2 <sup>b</sup>	2.4± 0.5 <sup>a</sup>	1.2± 0.2 <sup>b</sup>
<i>L. edodes</i> L15	2.3± 0.4 <sup>a</sup>	1.8± 0.2 <sup>a</sup>	4.4± 0.3 <sup>a</sup>	0.7± 0.0 <sup>b</sup>	2.4± 0.0 <sup>a</sup>
<i>Control</i>	1.2± 0.1 <sup>b</sup>	1.0± 0.0 <sup>b</sup>	2.9± 0.0 <sup>b</sup>	1.5± 0.1 <sup>ab</sup>	1.0± 0.1 <sup>b</sup>

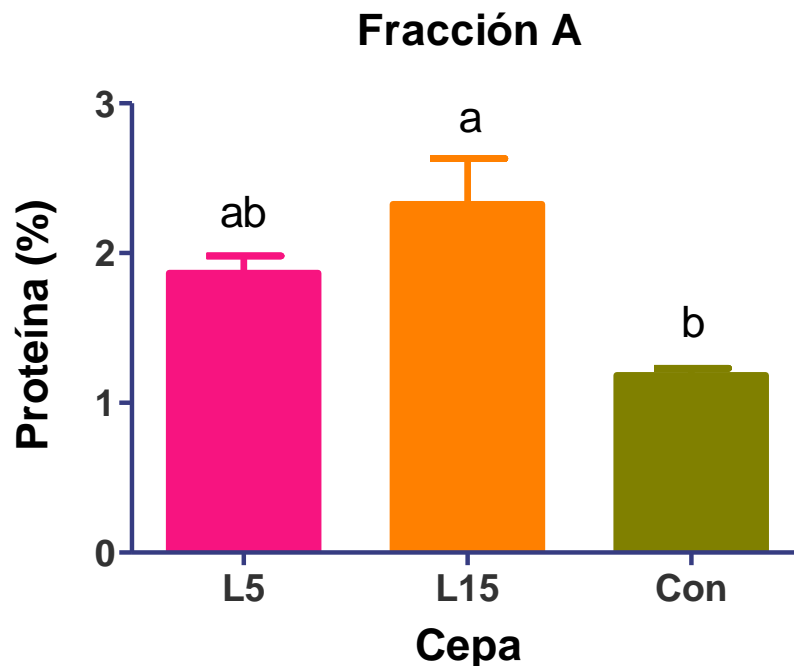
Los valores son los promedios ± la DE, n= 3 por muestra. Las diferencias estadísticas se indican con letras diferentes (a>b),  $P < 0.05$ .



### Nitrógeno no proteínico (Fracción A)

El nitrógeno no proteínico se encuentra principalmente en forma de urea, nitratos, nitritos y ácidos nucleicos (estos son solubles y fácilmente convertidos en amonio por las bacterias del rumen), el cual en ausencia de una fuente de nitrógeno puede ser nuevamente transformado en urea por el hígado, o bien, las bacterias pueden utilizar el amonio para sintetizar proteínas de alto valor nutricional al ser una fuente importante de aminoácidos para el rumiante (Shimada, 2018).

Como se observa en la Gráfica 5, hubo un incremento significativo ( $P < 0.05$ ) para el caso de *L. edodes* L15 del 91.7% respecto a la muestra control, lo que indicó que hay una mayor fuente de nitrógeno no proteínico utilizable por la microbiota ruminal, transformándolo en amonio y llevando a cabo síntesis de proteínas, o si se requiere una fuente de nitrógeno entonces ser reutilizado como urea.



*Gráfica 5. Fracciones de la proteína-Fracción A*

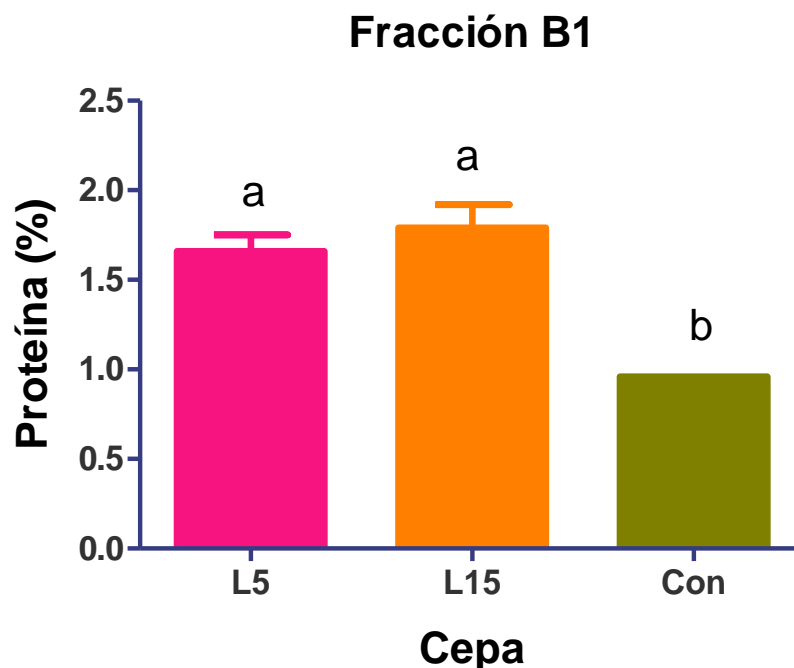
Los valores son los promedios  $\pm$  la DE,  $n=3$  por muestra. Las diferencias estadísticas se indican con letras diferentes ( $a > b$ ),  $P < 0.05$ . L5: *Lentinula edodes* L5, L15: *Lentinula edodes* L15 y Con: control.

## Nitrógeno de proteína digerible (Fracción B)

### Fracción B1

Esta fracción es proteína rápidamente degradable en rumen debido a la acción enzimática de origen microbiano, hidrolizándose en oligopéptidos o aminoácidos, los cuales pueden ser transformados hasta amonio y si es necesario en urea por el hígado, o bien, las bacterias y protozoarios pueden utilizar los oligopéptidos o aminoácidos para síntesis de proteínas (Shimada, 2018).

Como se observa en la Gráfica 6 hubo un incremento significativo ( $P < 0.05$ ) con ambas cepas (*L. edodes* L5 y *L. edodes* L15) respecto a la muestra control, 70% y 80% respectivamente, lo que indicó que la fructificación de los hongos sobre rastrojo de maíz incrementa de manera importante la fracción de la proteína de más alto potencial de degradación por el rumiante.



Gráfica 6. Fracciones de la proteína-Fracción B1

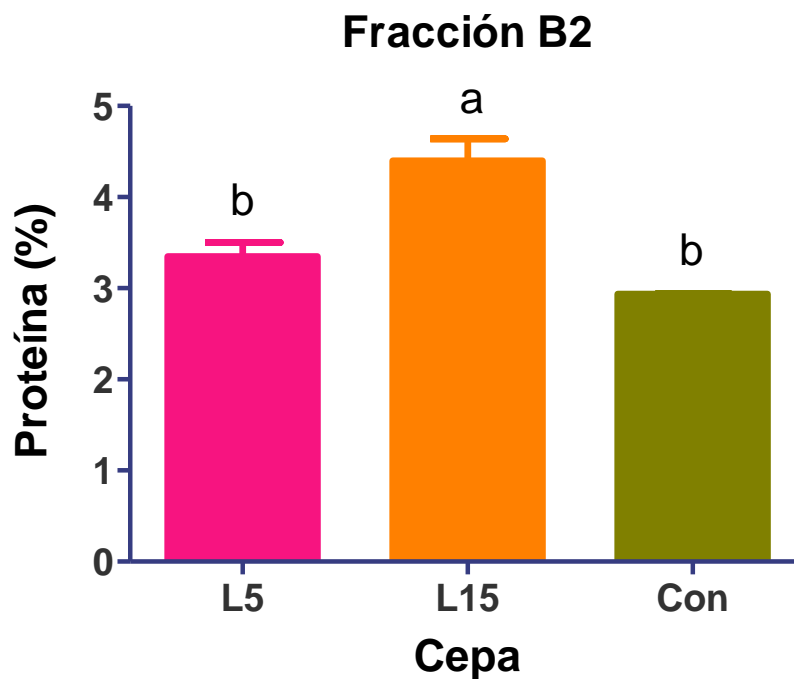
Los valores son los promedios  $\pm$  la DE,  $n=3$  por muestra. Las diferencias estadísticas se indican con letras diferentes ( $a > b$ ),

$P < 0.05$ . L5: *Lentinula edodes* L5, L15: *Lentinula edodes* L15 y Con: control.

### Fracción B2

La degradación de esta fracción de la proteína es más lenta respecto a la Fracción B1 (Shimada, 2018).

Como se observa en la Gráfica 7, hubo un incremento significativo ( $P < 0.05$ ) para el caso de la cepa *L. edodes* L15 del 51.7% respecto a la muestra control, lo que indicó que la fructificación de este hongo sobre rastrojo de maíz incrementa de manera importante otra fracción de la proteína con alto potencial de degradación por el rumiante.



*Gráfica 7. Fracciones de la proteína-Fracción B2*

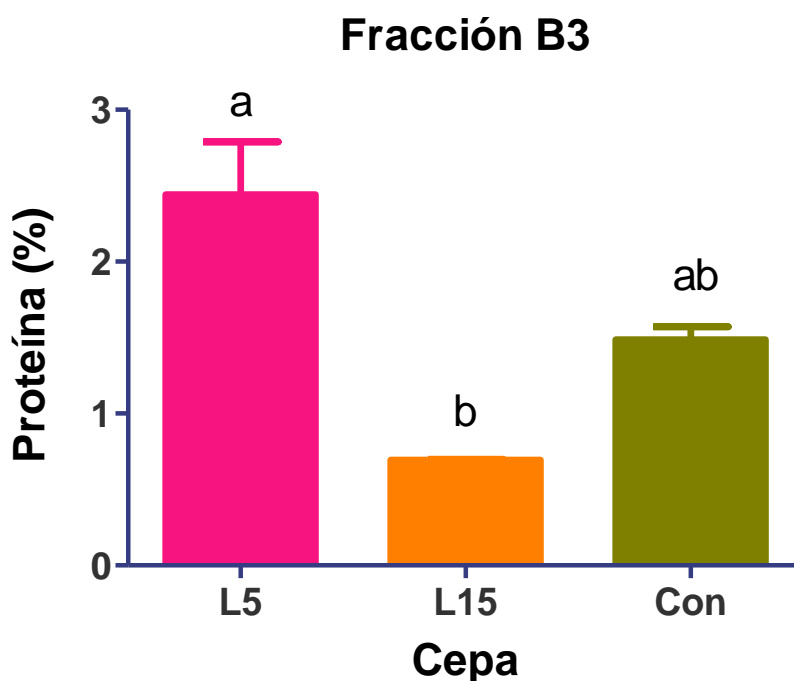
Los valores son los promedios  $\pm$  la DE,  $n=3$  por muestra. Las diferencias estadísticas se indican con letras diferentes ( $a > b$ ),

$P < 0.05$ . L5: *Lentinula edodes* L5, L15: *Lentinula edodes* L15 y Con: control.

### Fracción B3

Esta fracción involucra proteína insoluble en disolución detergente neutro. De la proteína digerible es la menos aprovechable, debido a que se encuentra ligada a la FDN en la pared celular vegetal (Van Soest *et al*, 1991), pero ante la acción del HCl en abomaso, el medio alcalino del duodeno y por las sales biliares del rumiante, se separa de la FDN actuando como proteína de sobrepaso y posteriormente puede ser absorbida en el intestino delgado, proporcionando ciertos aminoácidos necesarios (Church & Pond, 2010).

Como se observa en la Gráfica 8, hubo un aumento para el caso de *L. edodes* L5 (60%) mientras que *L. edodes* L15 disminuyó (53.3%) respecto a la muestra control, aunque no de manera significativa ( $P < 0.05$ ), lo que indicó que la fructificación de los hongos sobre rastrojo de maíz no incrementa ni disminuye de manera importante la fracción de la proteína más lentamente degradable por el rumiante.



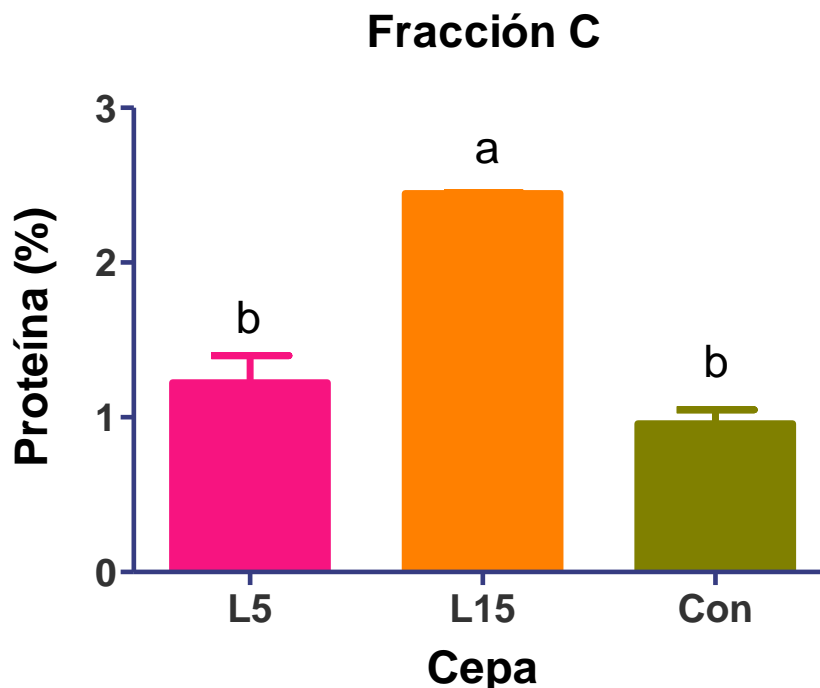
*Gráfica 8. Fracciones de la proteína-Fracción B3*

Los valores son los promedios  $\pm$  la DE,  $n=3$  por muestra. Las diferencias estadísticas se indican con letras diferentes ( $a > b$ ),  $P < 0.05$ . L5: *Lentinula edodes* L5, L15: *Lentinula edodes* L15 y Con: control.

### Nitrógeno de proteína indigerible (Fracción C)

Finalmente, la Fracción C hace referencia a proteína que es insoluble en disolución ácido detergente. A diferencia de las demás fracciones esta no puede ser degradada por las bacterias del rumen ni digerida en intestino, ya que se encuentra ligada principalmente a la FDA covalentemente unida a lignina, o bien, la proteína puede llevar a cabo reacciones tipo Maillard cuando algunos forrajes reciben tratamiento térmico, por ejemplo: molido en motor de rodillos, deshidratación mecánica artificial, etc., por lo tanto, esta fracción no es aprovechable por el rumiante (Sniffen *et al*, 1992).

Como se observa en la Gráfica 9, hubo un incremento significativo ( $P < 0.05$ ) para el caso de la cepa *L. edodes* L15, de más del doble, lo que indicó que la fructificación de este hongo sobre rastrojo de maíz también está incrementando proteína no aprovechable por el rumiante, ya que está ligada covalentemente a lignina o llevando a cabo reacciones tipo Maillard.



*Gráfica 9. Fracciones de la proteína-Fracción C*

Los valores son los promedios  $\pm$  la DE,  $n=3$  por muestra. Las diferencias estadísticas se indican con letras diferentes ( $a > b$ ),

$P < 0.05$ . L5: *Lentinula edodes* L5, L15: *Lentinula edodes* L15 y Con: control.

Grosso modo, ambas cepas presentaron un incremento significativo ( $P < 0.05$ ) respecto a la muestra control de la fracción de la proteína degradable o aprovechable por el rumiante, mientras que sólo *L. edodes* L15 mostró incremento significativo ( $P < 0.05$ ) de la fracción correspondiente a nitrógeno no proteínico, el cual también es utilizable por la microbiota ruminal para transformarlo en amonio y si se requiere ser transformado nuevamente a urea, o bien para síntesis de proteína microbiana, sin embargo, esta cepa a diferencia de *L. edodes* L5 presentó un aumento significativo ( $P < 0.05$ ) de proteína no aprovechable, es decir, después de la fructificación de ambos hongos sobre rastrojo de maíz hubo un incremento de las fracciones de la proteína importantes para el metabolismo del rumen de los animales. Estos resultados concuerdan y se complementan con los resultados obtenidos de las pruebas de digestibilidad *in vitro*, ya que el % DIVMS aumentó.

#### 7.4. Perfil de aminoácidos

Como se mencionó anteriormente, la síntesis de aminoácidos por los microorganismos del rumen no es suficiente para satisfacer las necesidades de aminoácidos para un crecimiento rápido y una producción elevada en los animales domésticos. Además, en comparación con la proteína proveniente de la dieta, la proteína bruta microbiana (PBM) posee un valor biológico (VB) bajo. El VB de la PBM es de 66 a 87 en una escala de 100 como valor ideal según se ha reportado (Church *et al.*, 2003), hecho que indica la importancia de la suplementación con proteína de la dieta.

Como se observa en la Tabla 6, hubo una gran variación en la concentración de aminoácidos respecto a la muestra control, por ejemplo, algunos aminoácidos disminuyeron significativamente ( $P < 0.05$ ) y por otro lado algunos aumentaron significativamente ( $P < 0.05$ ), lo que indicó que los hongos utilizaron ciertos aminoácidos como fuente de nitrógeno y otros aminoácidos fueron sintetizados por ellos como es el caso notorio de la metionina.

**Tabla 6. Concentración de aminoácidos ( $\mu\text{M}$ ) obtenidos del perfil de aminoácidos del control y del sustrato agotado seco con las cepas *L. edodes* L5 y *L. edodes* L15**

<i>Aminoácido</i>	<i>L. edodes</i> L5	<i>L. edodes</i> L15	<i>Control</i>
<i>Asp</i>	76.8 $\pm$ 1.1 <sup>b</sup>	37.4 $\pm$ 1.9 <sup>c</sup>	300.4 $\pm$ 6.2 <sup>a</sup>
<i>Glu</i>	109.1 $\pm$ 17.5 <sup>b</sup>	149.3 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>	87.6 $\pm$ 1.2 <sup>b</sup>
<i>Asn</i>	6.1 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>	5.4 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	3.0 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>
<i>Ser</i>	40.7 $\pm$ 3.6 <sup>a</sup>	14.9 $\pm$ 1.5 <sup>b</sup>	15.4 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>
<i>Gln</i>	63.3 $\pm$ 4.4	57.8 $\pm$ 0.1	66.3 $\pm$ 1.2
<i>His</i>	14.6 $\pm$ 1.8 <sup>a</sup>	13.9 $\pm$ 1.4 <sup>a</sup>	8.4 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>
<i>Gly</i>	41.8 $\pm$ 7.3 <sup>b</sup>	41.5 $\pm$ 0.7 <sup>b</sup>	67.8 $\pm$ 2.5 <sup>a</sup>
<i>Thr</i>	108.7 $\pm$ 13.3 <sup>a</sup>	82.4 $\pm$ 9.7 <sup>ab</sup>	58.7 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>
<i>Arg</i>	93.2 $\pm$ 21.3	71.1 $\pm$ 12.3	73.3 $\pm$ 2.5
<i>Ala</i>	184.2 $\pm$ 15.0 <sup>c</sup>	283.5 $\pm$ 13.1 <sup>b</sup>	382.9 $\pm$ 8.2 <sup>a</sup>
<i>Tyr</i>	39.1 $\pm$ 7.0 <sup>b</sup>	66.2 $\pm$ 21.2 <sup>ab</sup>	89.9 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>
<i>Val</i>	70.4 $\pm$ 3.2 <sup>c</sup>	82.9 $\pm$ 0.9 <sup>b</sup>	95.8 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>
<i>Met</i>	23.7 $\pm$ 5.7 <sup>a</sup>	14.1 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>	0.0 $\pm$ 0.0 <sup>b</sup>
<i>Trp</i>	5.2 $\pm$ 2.7	6.4 $\pm$ 0.1	3.3 $\pm$ 0.7
<i>Phe</i>	36.4 $\pm$ 4.1 <sup>a</sup>	28.5 $\pm$ 0.6 <sup>b</sup>	28.6 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>
<i>Ile</i>	48.4 $\pm$ 2.6 <sup>b</sup>	57.9 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	60.1 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>
<i>Leu</i>	100.5 $\pm$ 7.2 <sup>a</sup>	92.3 $\pm$ 1.2 <sup>ab</sup>	87.7 $\pm$ 1.2 <sup>b</sup>
<i>Lys</i>	31.4 $\pm$ 7.6 <sup>a</sup>	17.5 $\pm$ 4.9 <sup>ab</sup>	14.0 $\pm$ 2.0 <sup>b</sup>
<i>Pro</i>	89.3 $\pm$ 2.7 <sup>b</sup>	115.6 $\pm$ 24.2 <sup>b</sup>	372.8 $\pm$ 15.1 <sup>a</sup>

Los valores son los promedios  $\pm$  la DE, n= 3 por muestra. Las diferencias estadísticas se indican con letras diferentes (a>b>c-), P<0.05.

La nomenclatura de los aminoácidos se muestra en el anexo 2.

La proteína microbiana tiende a ser rica en lisina y treonina, con un contenido marginal de treonina en relación con las necesidades de los animales para mantenimiento y crecimiento (Church *et al.*, 2003); como se observa en la Tabla 6, la concentración de lisina y treonina aumentó significativamente ( $P < 0.05$ ) respecto a la muestra control con la cepa *L. edodes* L5, más del doble para el caso de lisina y un 85.2% en treonina.

Resulta difícil calcular las necesidades de aminoácidos esenciales según una base cuantitativa debido a la intervención de la fermentación ruminal entre la ingesta de la dieta y su llegada al duodeno, y la variación de las necesidades debido a la utilización de aminoácidos para diversas funciones, por ejemplo el crecimiento de la lana en corderos responde a un aumento de los aminoácidos que contienen azufre (Church *et al.*, 2003), como se observa en la Tabla 6, la muestra control no presentó cuantificación de metionina, pero los sustratos agotados con las cepas de *L. edodes* L15 y *L. edodes* L5 incrementaron significativamente ( $P < 0.05$ ) de  $0.0\mu\text{M}$  a  $14.1\mu\text{M}$  y  $23.7\mu\text{M}$  respectivamente.

Con base a lo mencionado, el enriquecimiento de aminoácidos debido a la acción de los hongos sobre el rastrojo de maíz tiene potencial como una forma de suplementar la fuente de proteína inherente del rumen por la acción microbiana.

## **8. Conclusiones**

- En general todas las cepas incrementaron el contenido de proteína, cenizas y lignina, por otro lado, disminuyeron en el contenido de FDN, FDA, celulosa y hemicelulosa. Para el caso del contenido de grasa sólo con *L. edodes* LC aumentó, mientras que con *L. edodes* L15 y *Hericiium* sp. disminuyó respecto a la muestra control.



- Las cepas con las que se obtuvo un incremento significativo en la digestibilidad de rastrojo de maíz fueron *L. edodes* L5, *L. edodes* L15 y *L. edodes* L9. Si bien *L. edodes* LC y *Hericiium* sp. no presentaron un potencial para alimentación ruminal, el hecho de invadir y crecer sobre rastrojo de maíz les sigue brindando un potencial para producción.
- El sustrato agotado por las cepas *L. edodes* L5 y *L. edodes* L15 presentaron fracciones de la proteína importantes para el metabolismo de los rumiantes. Además, la síntesis de aminoácidos de los hongos sobre el rastrojo de maíz tiene potencial como una forma de suplementar la fuente de proteína microbiana con proteína del sustrato agotado por estas mismas cepas para alimentación de rumiantes.
- El cultivo de hongos gourmet en sustratos de rastrojo de maíz, es una buena alternativa para productores de setas, ya sea para autoconsumo y/o la venta, además, el sustrato agotado (especialmente con los hongos *L. edodes* L5 y *L. edodes* L15) tiene potencial para alimentación ruminal, ya que aumentó el valor nutricional (en función al incremento de PC, los resultados de las fracciones de la proteína y el análisis de perfil de aminoácidos) y la digestibilidad de rastrojo de maíz.

## 9. Perspectiva

Ayudar a los productores de hongos en México, a través de la implementación de un sustrato considerado como el principal residuo agrícola en el país (rastrojo de maíz) como medio de fructificación de hongos comestibles (en este caso de shiitake y *Hericiium*) reduciendo los costos de la producción, al sustituir las maderas o aserrines finos por el rastrojo de maíz. Además, aprovechar el residuo de la fructificación de los hongos para el área de nutrición y alimentación animal, específicamente rumiantes, ya que la aplicación de este método biológico aumentó el contenido y el valor de la proteína, y así mismo, incrementó la digestibilidad del sustrato.

Es decir, se busca obtener convenios con:

- Productores agrícolas mexicanos para aprovechar el residuo de rastrojo de maíz.
- Productores de hongos comestibles mexicanos para abaratar el proceso.
- Y con ganaderos mexicanos utilizando el residuo de la producción de los hongos como alternativa para la alimentación de rumiantes, ya que incrementa la cantidad de proteína y digestibilidad del rastrojo.
- Cabe mencionar que este proceso es amigable con el medio ambiente debido a que no se necesita una fuente de energía derivada del petróleo, no se producen residuos tóxicos y se evita la tala de árboles para la producción de los hongos.

## 10. Bibliografía

- Association of Official Analytical Chemists. (1990). 26/11/19, De Official Methods of Analysis, Sitio web: <https://law.resource.org/pub/us/cfr/ibr/002/aoac.methods.1.1990.pdf>.
- Chang, S. (2002). Past and present trends in the production of *Lentinula edodes* in Asia. Proceed. IV International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products. Pp. 1-8.
- Chen, L., Gong, Y., Cai, Y., Liu, W., Zhou, Y. y Xiao, Y. (2016). Genome Sequence of the Edible Cultivated Mushroom *Lentinula edodes* (Shiitake) Reveals Insights into Lignocellulose Degradation. PLoS ONE 11(8): e0160336.doi:10.1371/journal.pone.0160336.
- Church, D. (2003). The Ruminant Animal: Digestive Physiology and Nutrition. España: ACRIBIA.
- Church y Pond. (2010). Fundamentos de Nutrición y alimentación de animales. España: ACRIBIA.
- CONACYT. (2016). Demandas 2016-01, 31/08/2019, de Gobierno de la República, Sitio web: <https://www.conacyt.gob.mx/index.php/el-conacyt/convocatorias-y-resultados-conacyt/convocatorias->

[fordecyt/convocatorias-cerradasfordecyt/fordecyt-2016-01/11010-fordecyt-demandas-2016-01/file](http://fordecyt/convocatorias-cerradasfordecyt/fordecyt-2016-01/11010-fordecyt-demandas-2016-01/file)

- Correa, R., Da Silva, B., Castoldi, R., Kato, C., Sa-Nakanishi, A. y Peralta, R., (2016). Spent mushroom substrate of *Pleurotus pulmonarius*: a source of easily hydrolyzable lignocellulose. *Folia Microbiol*, 61(5): 439-48.
- Ding, C., Wang, X., y Li, M. (2019). Evaluation of six white-rot fungal pretreatments on corn stover for the production of cellulolytic and ligninolytic enzymes, reducing sugars, and ethanol *Applied Microbiology and Biotechnology* <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09884-y>.
- Figura 1. Top 10 en volumen de producción. Principales entidades productoras-Maíz grano. SIAP. (2018). Recuperado de <file:///E:/Tesis/Bibliografía/Libros/Atlas-Agroalimentario-2018.pdf>
- Figura 2. Top 10 en volumen de producción. Principales entidades productoras-Maíz forrajero. SIAP. (2018). Recuperado de <file:///E:/Tesis/Bibliografía/Libros/Atlas-Agroalimentario-2018.pdf>
- Figura 3. Hongo shiitake. Weller. K., (2006). Recuperado de [https://es.m.wikipedia.org/wiki/Archivo:Shiitake\\_mushroom.jpg](https://es.m.wikipedia.org/wiki/Archivo:Shiitake_mushroom.jpg)
- Figura 4. Melena de león (*Hericium erinaceus*) Mushbank. (2018). Recuperado de <https://www.mushbank.com/lion-s-mane-hericium-erinaceus-live-culture-on-agar.html>
- Figura 18. Esquema de técnica muestreo por cuarteo resumida. Recuperado de [http://www.bvsde.paho.org/cursoa\\_mrsm/e/capitulo3.html](http://www.bvsde.paho.org/cursoa_mrsm/e/capitulo3.html)
- Figura 19. Códigos universales de los aminoácidos. Recuperado de [http://bioinformatica.uab.es/genetica/pr7/codi%20aa\\_sp.htm](http://bioinformatica.uab.es/genetica/pr7/codi%20aa_sp.htm)
- Fuentes, J., Magaña, C., Suárez, L., Peña, R., Rodríguez, S. y Ortiz de la Rosa, B. (2006). Análisis químico y digestibilidad *in vitro* de rastrojo de maíz (*Zea mays*). *Agronomía mesoamericana*. 12(2): 189-192.
- Guzmán, G., Mata, G. y Salmones, D. (2010). El cultivo de los hongos comestibles: con especial atención a especies tropicales y subtropicales en esquilmos y residuos agroindustriales. México, D.F., MX: Instituto Politécnico

Nacional. Recuperado de  
<http://site.ebrary.com/lib/biblioutnsp/reader.action?docID=10365713#>

- Hart, F. (1991). *Análisis moderno de los alimentos*; Zaragoza España: Acribia.
- Hong, J. (1988). Composition of organic fatty acid in *Pleurotus ostreatus*, *Lentinus edodes* and *Agaricus bisporus*. *Korean J. Food Sci. Technol.* 20: 100-105.
- INECOL. (2017). Cultivo de hongos comestibles. 30/09/2019, de SEGOB y CONACYT, Sitio web: <https://www.inecol.mx/inecol/index.php/es/2017-06-26-16-35-48/17-ciencia-hoy/484-cultiva-hongos-comestibles#>
- Jiang, T., Wang, Q., Xu, S., Jahangir, M. y Ying, T. (2010). Structure and composition changes in the cell wall in relation to texture of shiitake mushrooms (*Lentinula edodes*) stored in modified atmosphere packaging. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* n/a–n/a. doi:10.1002/jsfa.3876
- Keller, N., (2005). Fungal secondary metabolism from biochemistry to genomics. *Nature Reviews Microbiology.* 3: 937-47.
- Krishnamoorthy, U., Muscato, T., Sniffen, C. y Van Soest, P. (1982). Nitrogen Fractions in Selected Feedstuffs. *Journal of Dairy Science.* 65(2): 217–225.
- Leonowicz, A., Matuszewska, A., Luterek, J., Ziegenhagen, D., Wojtae-Wasilewska, M., Cho, N., Hofrichter, M. y Rogalski, J. (1999). Biodegradation of lignin by White rot fungi. *Fungal Genetics and Biology.* 27:175-185.
- Nielsen, S. (1998). *Food Analysis Second Edition*; An Aspen Publication, Gaithersburg, Maryland.
- Niu, D., Zuo, S., Jiang, D., Tian, P., Zheng, M. y Xu, X. (2018). Treatment using white rot fungi changed the chemical composition of wheat straw and enhanced digestion by rumen microbiota *in vitro*. *Animal Feed Science and Technology.* 237: 46-54.
- Nollert, L. (1996). *Handbook of food analysis*. New York.M. Dekker.

- Osmel, L., *etal.* (2011). Degradación biológica de contaminantes orgánicos persistentes por hongos de la podredumbre blanco. CENIC Ciencias Bilógicas. 42(2): 1-5.
- Pearson, D. (1993). Técnicas de laboratorio para el análisis de alimentos. S.A. Zaragoza. España: Acribia.
- Phan, C. y Sabaratnam, V. (2012). Potential uses of spent mushroom substrate and its associated lignocellulosic enzymes. *Apply Microbiol Biotechnol.* 96(4): 863-73.
- Quijandría, S. (2016). El Cuarteo—Un Muestreo Representativo. 08/07/2019, de R-Chemical, Sitio web: <https://www.r-chemical.com/el-cuarteo-un-muestreo-representativo/>
- Reyes, L., Camacho, T. y Guevara, F. (Coords.). (2013). Rastrojos: manejo, uso y mercado en el centro y sur de México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Libro Técnico Núm. 7. Aguascalientes, México: Pabellón de Arteaga.
- Romero, O. y López, J. (2014). El cultivo del hongo Shiitake en México. 30/09/2019, de Saberes y ciencia, Sitio web: <http://saberesyciencias.com.mx/2014/04/01/el-cultivo-del-hongo-shiitake-en-mexico/>
- SIAP. (2018). Atlas Agroalimentario 2012-2018, Ciudad de México.
- Shiffen, C. J., Russell, J., O'Connor, J., Fox, D. y Van Soest, P. (1992). A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets. 1. Ruminant fermentation. *J. Anim. Sci.* 70: 3351-3561 <https://doi.org/1992.70113562x>
- Shimada, M. (2018). *Nutrición Animal*. México: Trillas.
- Shrivastava, B., Nandal, P., Sharma, A., Jain, K., Khasa, Y. y Das, T. (2012). Solid state bioconversion of wheat straw into digestible and nutritive ruminant feed by *Ganoderma* sp. rckk02. *Bioresour Technol.* 107: 347-51.
- Tilley and Terry. (1963). A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. 105-112.

- Van, K., Sonnenberg, A., Baars, J., Hendriks, W. y Cone, J. (2015). Fungal treated lignocellulosic biomass as ruminant feed ingredient: a review. *Biotechnology Advances* 33(1):191-202.
- Van, S., Robertson, J. y Lewin, B. (1991). Methods for fiber, neutral detergent fiber and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Science* 74: 3583-97.
- Varnero, M., Quiroz, M. y Álvarez, C. (2010). Utilización de Residuos Forestales Lignocelulósicos para Producción del Hongo Ostra (*Pleurotus ostreatus*). *Información Tecnológica* 21(2): 13-20.
- Wang, X., Zhang, D., Yin, J., Nie, S. y Xie, M. (2018). Recent developments in *Hericium erinaceus* polysaccharides: extraction, purification, structural characteristics and biological activities. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*.

## 11. Apéndice

### 11.1. Anexo 1. Técnica de muestreo por cuarteo

En Química, la Técnica del Cuarteo tiene gran utilidad, en especial para tomar una muestra representativa pequeña a partir de una muestra grande y poco homogénea. Se utiliza con mayor frecuencia para polvos o sólidos granulados.

El procedimiento para desarrollar “El Cuarteo” consiste en:

- Verter la muestra mayor en forma de cono sobre una superficie limpia.
- Aplanar el cono de tal forma que quede como un montículo sin punta.
- Dividir el montículo en 4 partes iguales con ayuda de una regleta o espátula.
- Descartar dos de las cuartas partes que se oponen diametralmente.
- Tomar los dos cuartos que quedan, los cuales constituyen la “muestra final”.
- Si la muestra final sigue siendo grande, puede repetir el procedimiento descrito hasta llegar al tamaño de muestra ideal (Quijandría, S., 2016).

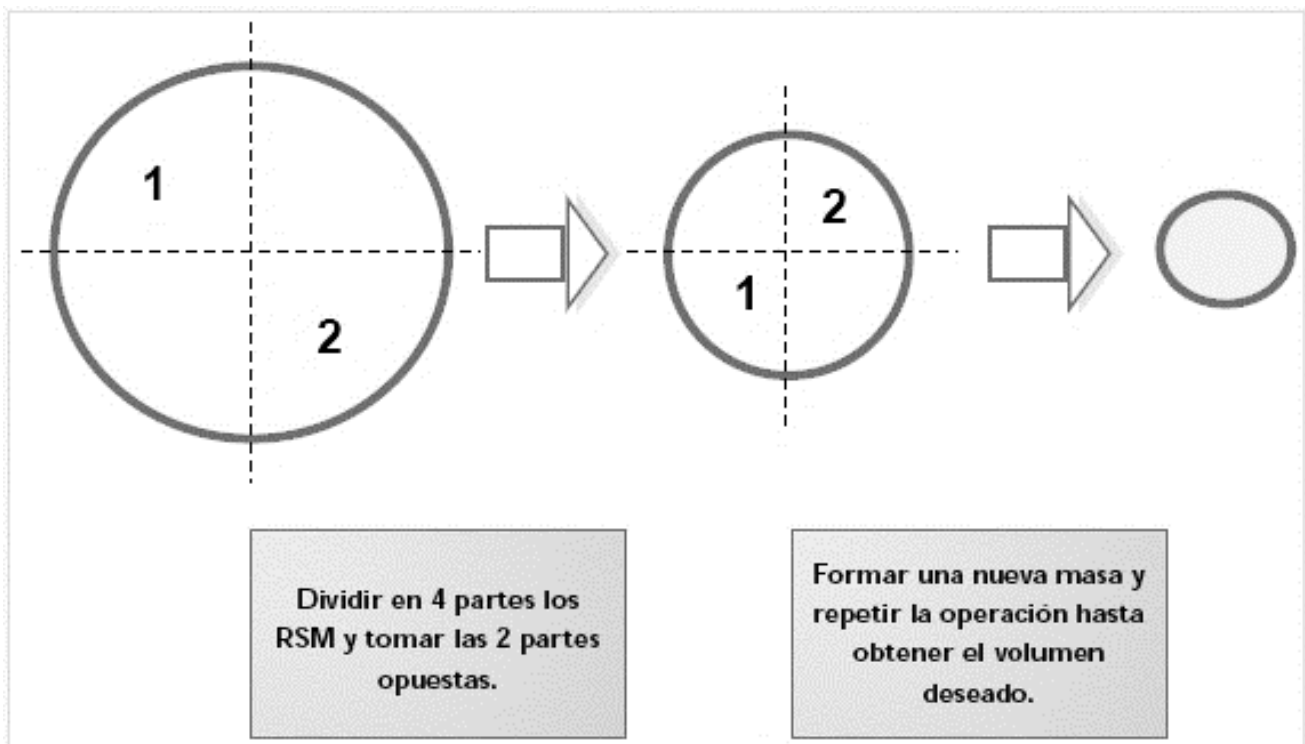


Figura 18. Esquema de técnica muestreo por cuarteo resumida. Recuperado de [http://www.bvsde.paho.org/cursoa\\_mrsme/capitulo3.html](http://www.bvsde.paho.org/cursoa_mrsme/capitulo3.html)

## 11.2. Anexo 2. Códigos universales de los aminoácidos

<i>Código (una letra)</i>	<i>Código (tres letras)</i>	<i>Aminoácido</i>
A	Ala	Alanina
R	Arg	Arginina
N	Asn	Asparagina
D	Asp	Aspartato
C	Cys	Cisteína
Q	Gln	Glutamina
E	Glu	Ácido glutámico
G	Gly	Glicina
H	His	Histidina
I	Ile	Isoleucina
L	Leu	Leucina
K	Lys	Lisina
M	Met	Metionina
F	Phe	Fenilalanina
P	Pro	Prolina
S	Ser	Serina
T	Thr	Treonina
W	Trp	Triptófano
Y	Tyr	Tirosina
V	Val	Valina

*Figura 19. Códigos universales de los aminoácidos. Recuperado de [http://bioinformatica.uab.es/genetica/pr7/codi%20aa\\_sp.htm](http://bioinformatica.uab.es/genetica/pr7/codi%20aa_sp.htm)*