

302827
19
24



**UNIVERSIDAD MOTOLINIA, A.C.
ESCUELA DE QUÍMICA
CON ESTUDIOS INCORPORADOS A LA U.N.A.M.**

**EVALUACIÓN DE LA DEGRADACIÓN DE LA PAJA DE TRIGO
POR DICARIOTES ACELULOLÍTICOS DE *Pleurotus ostreatus*.**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
PRESENTA: RICARDO LOMELÍ**

México, D. f.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ LA TESIS:

**DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA
FACULTAD DE QUÍMICA U.N.A.M.**

DIRECTOR DE TESIS

M. en B. REBECA RAMÍREZ CARRILLO

DEDICATORIA

A TI SEÑOR MIO:

**TE DOY GRACIAS POR UN DIA MAS DE MI VIDA, PORQUE
TE QUIERO Y ERES MI AMIGO. POR HABERME PERMITIDO
LLEGAR A SER LO QUE SOY.**

DEDICO A TI MI VIDA Y PROFESION.

A YOLITA:

**QUE CON SU AMOR, PACIENCIA Y CONFIANZA HA SIDO EL
FARO QUE ALUMBRA MI CAMINO Y ESTIMULO PARA SER
LO QUE AHORA SOY.**

A NORMITA, CECILIA Y RICARDITO:

**QUE CON SU AMOR Y COFIANZA LE DAN SENTIDO A MI
VIDA.**

A MELA Y YOLIS:

GRACIAS POR SU APOYO Y CARINO, DIOS LAS BENDIGA.

EN MEMORIA

**DE MI ABUELITA CELSTA, DE JULITA:
A LAS QUE TANTO DEBO Y A LAS QUE TANTO EXTRANO,
GRACIAS MUCHAS GRACIAS.**

**A MIS PADRES: MAMA
A LOS QUE DEBO TANTO CUAL SOY, PERO QUE NO TENGO
CON QUE AGRADECERLES, GRACIAS.**

**A TOS MIS HERMANOS:
SIEMPRE PIENSO EN ELLOS, GRACIAS POR SU AMOR Y
ESTIMULO, DEDICO MI ESFUERZO Y TRABAJO.**

**A LA MADRE LUPITA CAMARENA:
QUE OCUPA UN LUGAR EN MI CORAZON Y QUE QUIERO
SINCERAMENTE, GRACIAS POR SU AYUDA Y ESTIMULO.**

**A MIS AMIGOS:
POR SU CARINO, CONFIANZA, PALABRAS DE ALIENTO Y
AYUDA QUE PUDIERON DAR, GRACIAS.**

AGRADECIMIENTOS

A MI QUERIDA REBECA POR SU ENSEÑANZA, ORIENTACION Y APOYO; PERO SOBRE TODO POR SU PACIENCIA, GRACIAS MUCHAS GRACIAS POR AYUDARME A CONCLUIR ESTE TRABAJO.

M. EN B. REBECA RAMIREZ CARRILLO.

AL DOCTOR HERMILO LEAL L.:

POR SU CONFIANZA, POR SU APOYO, PERO SOBRE TODO POR LAS PALABRAS DE ALIENTO EN LOS MOMENTOS DIFICILES, GRACIAS.

A MIS SINODALES

MAESTRA: GRACIELA SOSA

MAESTRA: ANGELICA LOPEZ SOTELO

MAESTRO: RICARDO ALEJANDREZ

MUCHAS GRACIAS POR AYUDARME A CONCLUIR MI TRABAJO QUE HA SIDO ARDUO Y DIFICIL.

INDICE

	Páginas
CAPITULO I INTRODUCCIÓN.	
1.1.	Planteamiento del problema. 5
1.2.	Objetivos. 6
1.2.1.	Objetivo principal 6
1.2.2.	Objetivo particular 6
1.3.	Hipótesis. 6
CAPITULO II ANTECEDENTES.	
2.1.	Disponibilidad de esquilmos agrícolas. 8
2.2.	Composición de los desperdicios agrícolas 8
2.3.	Métodos de dilignificación. 10
2.4.	Degradación de lignina. 11
2.5.	Estudio comparativo de la degradación de la lignocelulosa por dos hongos <i>Pleurotus ostreatus</i> y <i>Phanerochaete chrysosporium</i> 13
CAPITULO III PARTE EXPERIMENTAL.	
3.1.	Diagramas de bloques para obtener los patrones de degradación de los dicarlotos acelulolíticos. 15
3.2.	Materiales 19
3.2.1.	Materiales biológicos. 19
3.2.2.	Materiales lignocelulósicos. 19
3.2.3.	Material de laboratorio. 19
3.2.4.	Equipo. 20
3.2.5.	Reactivos. 20
3.2.5.1.	Medios de cultivo. 20
3.2.5.2.	Reactivos analíticos. 21
3.3.	Metodología. 21
3.3.1.	Medio de agar extracto de malta. 21
3.3.2.	Preparación de Inóculo de grano 21
3.3.3.	Preparación del sustrato e inoculación. 22
3.3.4.	Evaluación de los patrones de consumo de los dicarlotos acelulolíticos sobre el sustrato. 22
3.3.5.	Determinaciones analíticas. 22
CAPITULO IV RESULTADOS Y DISCUSIONES.	26
CAPITULO V CONCLUSIONES.	43
CAPITULO VI BIBLIOGRAFÍA	45

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 Planteamiento del problema.

El mundo entero, cuenta con un potencial abundante de desechos agrícolas, que bien pudieran ser integrados a la alimentación, tanto humana como animal, mediante el uso de tecnología apropiada.

Los países llamados tercer mundistas, sienten más a fondo esta necesidad, debido a que su crecimiento demográfico acrecienta el déficit alimentario, y si aunado a esto se contempla la baja productividad del campo, el panorama resulta aún más desalentador. Por ello, es necesario encontrar mecanismos adecuados, que permitan reciclar estos productos en los ecosistemas y tratar de obtener beneficios de ellos, ya sea como forrajes, compostas o combustibles.

El compuesto más común sobre la membrana celular vegetal es el polisacárido celulosa, el cual esta frecuentemente asociado a la hemicelulosa, el segundo polisacárido de importancia en los tejidos vegetales. En la mayoría de las paredes celulares, estos polisacáridos no se encuentran libres y particularmente los tejidos leñosos están impregnados de lignina (Esau, 1976). Gran parte de la lignina, se encuentra asociada a la celulosa formando complejos lignocelulósicos de difícil degradación.

Existen diversos procesos de delignificación para obtener una mejor disponibilidad de nutrientes. Por medio de estos procesos se pretende tratar los residuos lignocelulósicos, de origen forestal y agrícola para mejorar su digestibilidad y usarlos en la alimentación de rumiantes o bien en la obtención de materias primas para uso industrial, como la producción de alcohol, solventes orgánicos o la fabricación de papel (Simposium Latinoamericano de Biotecnología, 1987).

Los procesos disponibles para lograr una delignificación se han clasificado en tres tipos: físicos, químicos y microbiológicos. Entre los procesos físicos podemos mencionar la molienda, calentamiento con vapor y calentamiento a altas presiones. Los procesos químicos, son los tratamientos que hacen uso de compuestos alcalinos, ácidos y oxidantes. En los métodos microbiológicos, la degradación de lignina ocurre más lentamente por la acción de algunas bacterias y por cierto tipo de hongos, principalmente basidiomicetos (Agullera *et al*, 1982).

En el Departamento de Alimentos de la Facultad de Química de la UNAM, el hongo *Pleurotus ostreatus*, ha sido utilizado para la obtención de mutantes acelulolíticas. Sin embargo, solo se han producido cepas dicarióticas, sin conocer su patrón de consumo en los desperdicio lignocelulósico. El presente trabajo está enmarcado dentro de un proyecto en donde se pretenden obtener cepas de *Pleurotus ostreatus*, capaces de producir una degradación selectiva de la lignocelulosa. Cepas con tales características podrán ser utilizadas

para el aprovechamiento integral de los desperdicios agrícolas. Es decir, permitirán producir hongos comestibles para el consumo humano y sustrato delignificado para la alimentación de rumiantes.

1.2 OBJETIVOS.

1.2.1 Objetivo principal.

Determinar el patrón de degradación de la paja de trigo por diferentes dicarlotos acelulolíticos de *Pleurotus ostreatus*.

1.2.2 Objetivo particular.

Seleccionar las cepas que presenten una menor degradación de la celulosa y al mismo tiempo mayor consumo de lignina.

1.3 Hipótesis.

- a) Existe diferencia entre los patrones de degradación de los diferentes dicarlotos acelulolíticos.
- b) Los patrones de degradación para la lignina son iguales para las cepas acelulolíticas como para las cepas silvestres.
- c) El proceso de mutación, modifica de alguna forma el comportamiento de las cepas acelulolíticas sobre el consumo de los polisacáridos.

CAPÍTULO II

ANTECEDENTES

2.1 Disponibilidad de esquilmos agrícolas.

Desde tiempos inmemoriales la demanda de alimentos ha ido en aumento, ésto no solo en nuestro país sino que también a nivel mundial. El problema es que dicha demanda en México se debe a que la población ha ido aumentando de una manera muy rápida, y por ello resulta necesario utilizar en forma óptima los recursos agrícolas disponibles.

Una característica muy común en los países en desarrollo es la baja productividad en comparación con los países industrializados. Aunado a ello, el material cosechado en la mayoría de los cultivos representa el 30% de la biomasa producida y la pérdida del material cosechado representa normalmente el 50%. En la tala de madera la pérdida es todavía mayor, por ésto, podemos considerar que el aprovechamiento de los desechos agrícolas, están en función del atraso socioeconómico, prevalente en los países en desarrollo como México.

En México la producción de cereales se encuentra alrededor de 15 millones de toneladas anuales (INEGI, 1988). Mientras que la producción anual de los principales residuos agrícolas alcanza los 66 millones de toneladas (Tabla 1).

La utilización extensiva de los desechos agrícolas representa serios problemas, debido a diferentes factores. Como son: la naturaleza dispersa donde se generan, el costo del transporte, la falta de infraestructura y tecnología, que afectan consecuentemente su aprovechamiento a mayores escalas. Por ello es necesario que existan tecnologías que no requieran un alto grado de mecanización o procesos sumamente sofisticados. Aunado a lo anterior sería conveniente que dichos procesos redundaran en beneficio de los campesinos que carecen de recursos por falta de empleo la mayor parte del año.

2.2 Composición de los desperdicios agrícolas.

En general los desperdicios lignocelulósicos están compuestos principalmente por celulosa (35 a 60%), hemicelulosa (10 a 30%) y lignina (4 a 18%).

La celulosa es el componente predominante de las pajas, lo cual ha ocasionado una gran atención a los usos potenciales de los subproductos de su degradación química. Es un compuesto cristalino relativamente hidrófilo, cuya fórmula general es $(C_6H_{10}O_5)_n$. Al igual que el almidón es un homopolisacárido compuesto por unidades de glucosa; es un polímero lineal de D-glucosa unido por enlaces glucosídicos β (1,4). Esta estructura le confiere a la celulosa la fuerza física y la rigidez por la cual, la mayoría de las enzimas secretadas en el

tracto digestivo de los mamíferos no pueden atacarla. Sin embargo, los rumiantes pueden utilizar la celulosa porque la mayoría de los microorganismos de su flora ruminal producen la enzima celulasa.

TABLA 1: PRODUCCIÓN NACIONAL DE ESQUILMOS AGRÍCOLAS PARA 1988

ESQUILMOS AGRÍCOLAS	PRODUCCIÓN (Toneladas)
Bagazo de caña	27,622,056
Rastrojo de maíz	24,060,871
Paja de sorgo	5,894,949
Paja de trigo	2,931,863
Otote	2,861,866
Vara de algodón	735,920
Paja de frijol	685,750
Paja de arroz	683,722
Paja de cebada	398,531
Paja de cártamo	222,417
Paja de soya	153,887
Paja de alonjoli	23,508
TOTAL	66,275,340

Dirección General de Aprovechamientos Forrajeros (1989).

Las hemicelulosas son polímeros de pentosas, como la D-xilopiranosas, formando grandes cadenas a través de enlaces glucosídicos β (1,4). La mayoría de las hemicelulosas no son homoglicanos, ni heteroglicanos que contiene 2 a 4 y, raramente 5 ó 6 tipos distintos de unidades de azúcar, unidos a la D-xilopiranosas en los carbonos de posición 2 ó 3. Los carbohidratos más frecuentemente asociados con este grupo de polímeros son mananos, glucomanos, galactanos, arabinogalactanos, arabinoxilanos y ácidos urónicos.

Finalmente la lignina es una de las sustancias más importantes que componen la pared celular, es un polímero estructural de las plantas vasculares con un alto contenido de carbono. Constituida predominantemente por unidades de fenil propano. Proporciona a las plantas rigidez y unión entre sus células, además de disminuir la permeabilidad al agua a través de las paredes celulares y proteger a las células de invasiones por microorganismos (Sarkanen y Ludwig, 1971). La molécula de la lignina presenta una estructura ramificada irregular (Ander y Eriksson, 1978).

La lignina es un producto final del metabolismo y una vez formada, parece que funciona primordialmente como componente estructural de la pared celular. Físicamente es rígida y es

la representante más importante de las sustancias incrustantes, esto es, sustancias que impregnan la pared después de su desarrollo inicial (Frey-Wyssling, 1959). Gran parte de la lignina se encuentra asociada con la celulosa formando complejos lignocelulósicos de difícil degradación.

Los desechos agrícolas contienen estos complejos, lo cual limita su uso directo en la alimentación animal. Los materiales lignocelulósicos presentan una baja digestibilidad, ya que la lignina actúa como una barrera para la utilización de la celulosa, compuesto de gran importancia en la dieta de los animales (Sundstol and Owen, 1984; Agosin, *et al.*, 1987).

Para que la lignocelulosa pueda reciclarse de manera adecuada en los ecosistemas, la lignina debe de ser degradada a compuestos más sencillos.

2.3 Métodos de delignificación.

Existen varias posibilidades para desdoblar el complejo celulosa-lignina, consistiendo esencialmente en la extracción o degradación de la lignina. Entre los métodos empleados para lograr una degradación del complejo lignocelulósico se encuentran los físicos, químicos y microbiológicos.

Los de tipo físico pueden involucrar diferentes tratamientos como: una simple molienda, uso de rayos ionizantes, calentamiento con vapor o calentamiento a presión elevada.

Los métodos químicos en general pueden ser de tres tipos:

- 1) Tratamiento alcalino, en donde se han utilizado sustancias alcalinas como sosa, potasa o amoníaco.
- 2) Tratamiento ácido, el cual utiliza ácidos como el sulfúrico y el clorhídrico.
- 3) Tratamientos oxidantes, que se caracterizan por utilizar agua oxigenada o permanganato de potasio.

Métodos microbiológicos. Se conocen actualmente una gran variedad de hongos y bacterias que degradan o modifican la lignina en diferentes formas. Los cambios pueden ser desde simple modificación estructural hasta la completa oxidación a CO₂ y agua (Vera, 1981; Janshekar & Flechter, 1983). Los microorganismos que degradan la madera y por lo tanto la lignina, se han clasificado en 4 grupos principalmente (Amer & Drew, 1980; Crawford & Crawford, 1980; Vera, 1983):

- a) Hongos de la pudrición suave.
- b) Hongos de la pudrición café.
- c) Hongos de la pudrición blanca.

d) Bacterias.

a) Entre los hongos de la pudrición suave existe una gran variedad de Ascomicetos y hongos imperfectos. La pudrición suave esta caracterizada por el ataque en la madera bajo condiciones húmedas y la degradación es generalmente acompañada por un reblandecimiento de la capa superficial del material. Este tipo de microorganismos provocan una pérdida en peso que va desde un 10% hasta un 60% después de 70 días de incubación, degradando principalmente la celulosa.

b) Hongos de la pudrición café. En este grupo están incluidos varios Basidiomicetos y presentan mayor preferencia por los polisacáridos de la madera que por la lignina. Esta únicamente es demetilada.

c) Hongos de la pudrición blanca. Los hongos de la pudrición blanca han sido los más estudiados, por ser microorganismos altamente ligninolíticos y presentan la capacidad de degradar todos los componentes de la madera incluyendo la lignina hasta CO_2 y agua. Este grupo de hongos está integrado por un gran número de Basidiomicetos y unos cuantos Ascomicetos. Su nombre surge del hecho que remueven por lo menos en parte materiales tánicos de la madera dejando manchas blancas de celulosa no degradada (Amer & Drew, 1980; Crawford & Crawford, 1980). Es evidente que la degradación de la lignina por estos hongos es oxidativa, por el hecho de que la lignina degradada o alterada tiene mayor cantidad de oxígeno que la lignina sana (Amer & Drew, 1980).

d) Bacterias. Las bacterias probablemente juegan un papel secundario en la degradación de la lignina en el suelo y ambiente acuoso. Solamente muy pocas cepas han demostrado capacidad de oxidar la lignina y derivados sintéticos de la misma a CO_2 y agua. Las cepas más activas han sido: *Nocardia*, *Bacillus megaterium* y numerosos *Streptomyces* (Janshekar & Flechter, 1983).

2.4 DEGRADACIÓN DE LIGNINA.

La degradación de hemicelulosa, y actividades relacionadas con la degradación de la lignina, han sido investigadas ampliamente en los últimos años. La lignina es el segundo polímero más abundante en la naturaleza, su compleja estructura, no permite el uso económico de los vegetales o de la pajas como alimentos para rumiantes o forraje (Crawford, R. L., 1991; Platt, M. W., 1989; Zadrazil, F. y H. Brunnert, 1982). Recientemente, se han hecho grandes esfuerzos tendientes a un mejor conocimiento de los mecanismos de biodegradación de lignina (Datt, A., A. Beterman, 1991; Farrell, R. L., K. E. Murtagh, 1989; Perle, F. H. y M. H. Gold, 1991). En los animales la celulosa y la hemicelulosa, son parcialmente metabolizadas en el rumen, en un periodo de 2 a 3 días. Sin embargo, la lignina presente en 102 vegetales

usados como forraje, disminuye los niveles de digestibilidad, debido a que los microorganismos del rumen son incapaces de degradarla (Steward, 1981).

Para aumentar la digestibilidad de la lignocelulosa, se han usado métodos ya sea físicos, químicos o biológicos (Han, 1978; Jackson, 1978). El principio de todos estos métodos, es la ruptura del complejo lignina-celulosa, por extracción, o descomposición de lignina en los compuestos.

El problema principal del proceso biológico, es encontrar microorganismos convenientes con patrones metabólicos diferentes de los existentes en la flora y fauna del rumen, el microorganismo ideal debe ser un fuerte degradador selectivo de lignina, y a la vez degradar muy poca celulosa y hemicelulosa, por lo que se ha tratado de obtener mutantes capaces de producir una degradación selectiva de lignina (Erickson, *et al*, 1980).

En los procesos naturales es muy difícil diferenciar entre poblaciones de bacterias, levaduras y hongos y sobre todo la cantidad de lignina degradada en un ecosistema por el tipo de microorganismo (Harder y Trojanowsky, 1981). Se ha llegado a la conclusión, de que el método biológico es el método más efectivo para degradar lignina, y recientemente, se han hecho grandes esfuerzos tendientes a conocer los mecanismos de degradación de lignina (Datta, A., A. Bateman y T. K. Kirk, 1991; Farrell, R. L, 1989; Perle, F. H, 1991). Los más efectivos biodegradadores de lignina, son los hongos de pudrición blanca, pertenecientes a los basidiomicetos. El más ampliamente estudiado de éstos es *Phanerochaete chrysosporium* (Datta, A. y T. K. Kirk, 1991; Farrell, R. L, 1989; Holzbauer, E. L. F, 1991; Lee, B., A. L. Pometo III, 1991). Estos estudios han sido enfocados a la fisiología, enzimología y genética molecular de los procesos de biodegradación. Parece ser que la llave enzimática para la fragmentación del polímero lignina por *Phanerochaete chrysosporium* es la enzima lignina-peroxidasa (Datta, A. y T. K. Kirk, 1991; Farrell, R. L, 1989; Higuchi, T., 1990).

El hongo *Pleurotus ostreatus* también ha demostrado ser un gran degradador de lignina (Afosin, E, 1985; Platt, M. W. y Hadar, 1984; Zadrazil, F. y H. Brunert, 1982). Sin embargo, los esfuerzos hechos para detectar esta misma enzima o genes de lignina-peroxidasa en *P. ostreatus*, bajo severas condiciones de cultivo, no han tenido éxito (Kimura, V., 1990; Sannia, G. y P. Limongi, 1991; Waldner, R., M. S. A. Leisola, 1988). Por ello Sannia, *et al*. (1991), sugirieron que para metabolizar la lignina, pueden existir grandes diferencias de especie a especie. *P. ostreatus* se ha encontrado, que produce laccasa, cobre-fenoloxdasa (Platt, M. W. y Hadar, 1984; Sannia, G., P. Giardino, 1986). La laccasa es una fenol-oxdasa extracelular, producida por basidiomicetos, y juega un papel importante en la biodegradación de lignina (Higuchi, T., 1990; Milstein, O., A. Hars, 1988; Sannia, G., P. Limongi, 1991), causando una degradación-oxidativa de la lignina y catalizando la polimerización de pequeños

anillos moleculares fenólicos, durante la degradación (Betts, W. B. y J. E. King, 1991; Higuchi, T., 1990).

2.5. ESTUDIO COMPARATIVO DE LA DEGRADACION DE LA LIGNOCELULOSA POR DOS HONGOS *Pleurotus ostreatus* Y *Phanerochaete chrysosporium*.

Recientemente se han hecho grandes esfuerzos, tendientes a conocer los mecanismos de biodegradación de la celulosa y las actividades relacionadas con la degradación de la lignina. Kerem, et al. (1992), realizaron un estudio comparativo entre dos hongos de producción blanca, *Phanerochaete chrysosporium* y *Pleurotus ostreatus* para conocer su fisiología y la degradación de lignocelulosa en una fermentación en estado sólido usando como sustrato tallos de algodón. Ellos observaron que *P. chrysosporium* crece vigorosamente en 15 días, pero produce una rápida degradación no selectiva de los componentes orgánicos de los desperdicios del algodón. Por otro lado, *P. ostreatus* crece más lentamente en 30 días, pero presenta mayor selectividad para degradar la lignina, degrada únicamente 20% de los componentes de la materia orgánica, observándose una tasa de degradación de 0,7% a través del período de fermentación. La pérdida de lignina fué de 45% de la cantidad original, empezando la degradación después del sexto día, hasta el final del experimento. Cuando las actividades relacionadas con la degradación de lignina, fueron medidas durante el cultivo de *P. ostreatus*, se encontró relación entre el período y la tasa de degradación de lignina. Sin embargo, en este estado no pudieron verificar si ésta, es puramente una actividad enzimática o una actividad química, resultado de la generación de radicales libres durante la biodegradación. (Kelley, R.L., 1988). Esta actividad fue mucho mas alta en *P. ostreatus* que en *P. chrysosporium*. La laccasa es una enzima relacionada con la degradación de lignina (Platt, M. W., 1984), únicamente se encontró en *P. ostreatus*, y aparentemente se mantuvo durante la colonización, con niveles bajos detectables después de 16-18 días. La falta de actividad lignina-peroxidasa en cultivos de *P. ostreatus*, sugiere que otras enzimas pueden ser las responsables de la producción de radicales libres por estos hongos. Platt et al. (32), sugirieron el papel iniciativo de la laccasa en *P. ostreatus* en la degradación de la lignina, haciendo la degradación de lignina por estos hongos dependientes de la laccasa, sus resultados demuestran una alta actividad al empezar el período de degradación con un subsecuente decremento hasta niveles estables aunque las tasas de degradación de lignina permanezcan constantes. La laccasa actúa en este caso, detoxificando compuestos en el sustrato (Mayer, A. M., 1987) y oxidando grupos fenólicos como una enzima inicial, incluyendo el desdoblamiento de cadenas laterales y anillos fenólicos aromáticos de lignina.

CAPÍTULO III

PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Diagramas de bloques para obtener los patrones de degradación de los dicaríotes acelulolíticos.

DIAGRAMA GENERAL PARA DETERMINAR LOS PATRONES DE DEGRADACIÓN DE LOS DICARIOTES ACELULOLÍTICOS.

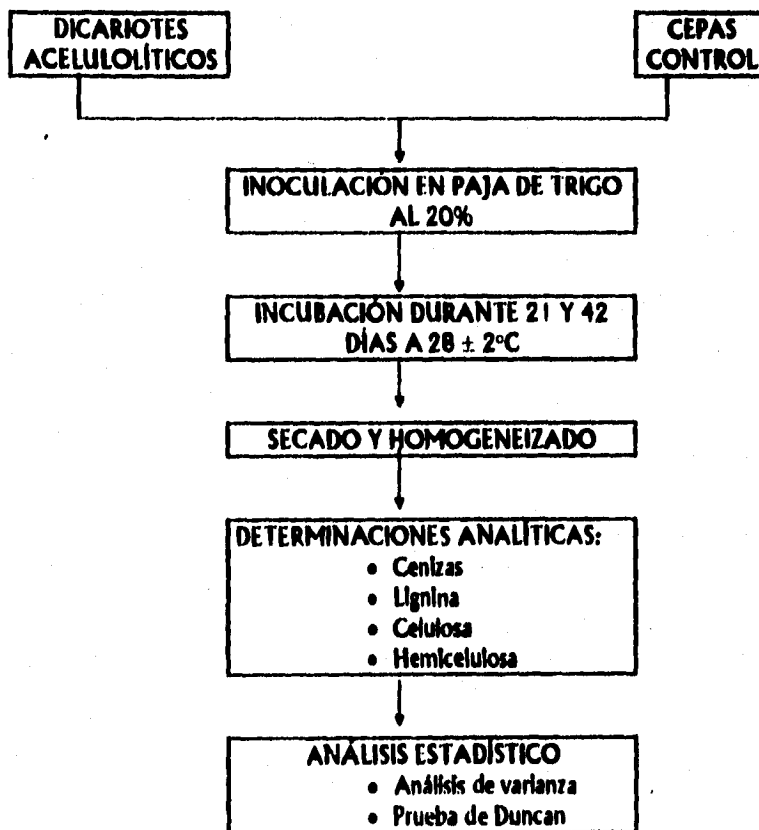


DIAGRAMA DE BLOQUES PARA LA PREPARACIÓN DEL SUSTRATO.

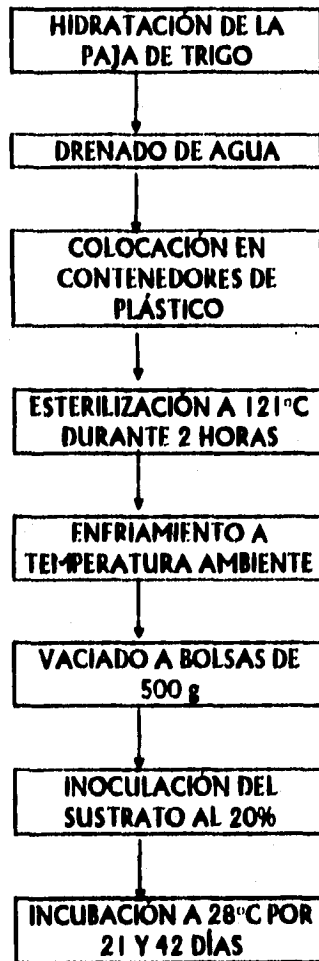


DIAGRAMA DE BLOQUES PARA LA PREPARACIÓN DEL INÓCULO DE GRANO DE TRIGO.

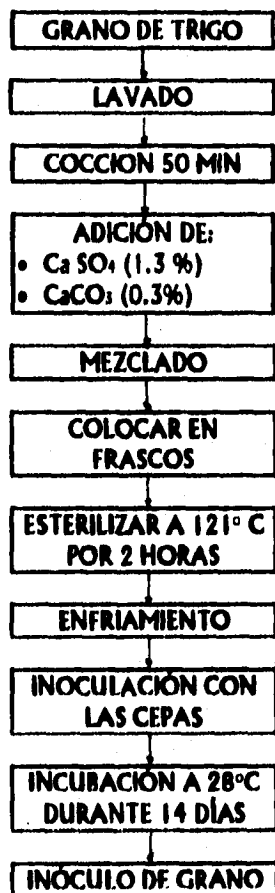
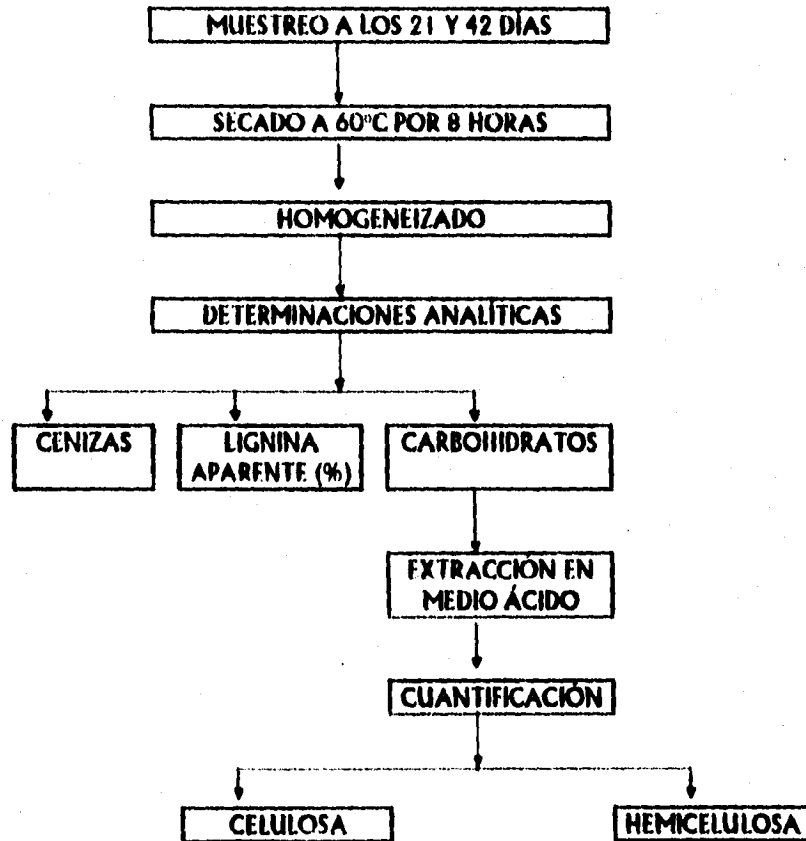


DIAGRAMA DE BLOQUES PARA LA EVALUACIÓN DE LOS PATRONES DE CONSUMO DE LOS DICARIÓTES ACELULOLÍTICOS SOBRE LOS COMPONENTES DEL SUSTRATO.



3.2 Materiales

3.2.1 Material biológico.

Para el presente trabajo se emplearon 9 cepas de *Pleurotus ostreatus*. La cepa 56HINI x Mo.24 es un dicariote obtenido de la cruce entre la mutante acelulolítica 56HINI (obtenida por mutación química con N-metil-N-nitro-N-nitroso guanidina por Ramírez 1989) y el monocariote silvestre Mo.24. La cepa 8 x 3 es un dicariote con elevada capacidad para producir cuerpos fructíferos. Las cepas restantes son dicariotes acelulolíticos obtenidos por selección y mejoramiento genético a partir de la primera progenie del dicariote 56HINI x Mo.24. Todas las cepas se obtuvieron del cepario del Departamento de Alimentos de la Facultad de Química de la UNAM (Tabla 2).

TABLA 2: CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES DE LAS CEPAS DE *Pleurotus ostreatus* UTILIZADAS PARA EL PRESENTE TRABAJO.

TIPO DE CEPAS	CLAVE
MONOCARIOTE SILVESTRE	Mo.24
DICARIOTE SILVESTRE	8 x 3
DICARIOTE PROGENITOR DE LOS DICARIOTES ACELULOLITICOS	56HINI x Mo.24
DICARIOTES ACELULOLITICOS	16 x 27
	16 x 100
	36 x 61
	73 x 27
	84 x 27
	104 x 61

3.2.2 Materiales lignocelulósicos.

Paja de trigo obtenida del Rancho de San Miguel de las Tablas en el Edo. de México.

3.2.3 Material de laboratorio.

Agitadores
asa microbiológica

bolsas de plástico
cajas petri desechables
crisoles de porcelana de 20 ml
deseccador
embudos de filtración rápida
gradillas
ligas
jeringa de llenado continuo (SARTORIUS)
matraces Erlenmeyer de 1000 ml
matraces aforados de 25, 50 y 100 ml
mecheros
papel filtro (Whatman No. 1)
papel aluminio
pinzas para crisol
pipetas automáticas de 1 ml
pipetas graduadas de 1, 5 y 10 ml
pipetas volumétricas de 1 ml
tubos de centrifuga de 15 ml
tubos de ensaye de 15 x 160 mm

3.2.4 Equipo.

Agitador de tubos de ensaye (Super-Mixer)
autoclave vertical (AESA)
balanza analítica (Sartorius)
campana de flujo laminar (Veco)
centrifuga clínica de 5000 rpm (I.C.C.)
espectrofotómetro (Bauch & Lomb)
estufa de secado (Felsa)
muffa (Termolyne)
licuadora (Phillips Tx 3000)
refrigerador (Royal Collinher)

3.2.5 Reactivos.

3.2.5.1 Medios de cultivo.

Agar bacteriológico (Bloxon)
extracto de malta (Maltex "N" de Complementos Alimenticios)

3.2.5.2 Reactivos analíticos.

Todos los reactivos utilizados fueron grado analítico, marca J. T. Baker.

Ácido acético glacial
ácido cromotrópico
ácido oxálico
ácido sulfúrico
agua destilada
anilina
carbonato de calcio
sulfato de calcio

3.3 METODOLOGIA

3.3.1 Medio de agar extracto de malta.

Para preparar 500 ml del medio de agar extracto de malta, pesar 7.5 g de extracto de malta y 10 g de agar, colocarlos en un matraz Erlenmeyer de 1 litro. Adicionar 500 ml de agua destilada, gradualmente, procurando disolver los reactivos. A continuación tapar el matraz y dejar reposar durante 20 minutos. Posteriormente, esterilizar en autoclave a 121°C y 15 libras de presión durante 15 minutos. Vaciar 15 mililitros del medio estéril a cajas petri desechables, con la ayuda de una jeringa dosificadora. Una vez solidificado el medio guardar las cajas petri en bolsas de polietileno hasta su uso para evitar contaminaciones y deshidratación del medio.

3.3.2 Preparación del inóculo de grano.

Se llama inóculo de grano al micelio crecido en algún tipo de cereal como trigo, centeno o mijo y que se utiliza para inocular el sustrato elegido para la fructificación o producción de esporos.

El inóculo de grano se preparó remojando el trigo limpio durante 24 horas en agua de la llave, pasado este tiempo se eliminó el exceso de agua dejando escurrir durante 20 minutos. Al grano hidratado se le adicionó sulfato de calcio al 1.3% y carbonato de calcio al 0.3%, se mezcló y se colocó en frascos de vidrio, llenándolos únicamente hasta la mitad de su capacidad. Los frascos se taparon con un cuadro de hule espuma y papel aluminio y se esterilizaron durante 2 horas a 121°C y 15 libras de presión. Los frascos estériles se dejaron enfriar a temperatura ambiente durante 24 horas antes de ser inoculados con el micelio previamente preparado en cajas petri, provenientes de la segunda resembra de las cepas.

Cada frasco con 100 g de grano hidratado se inoculó con el micelio de una caja petri, cortada en cubos de 1.5 cm de lado aproximadamente. Una vez inoculados los frascos se incubaron a 25°C durante 2 semanas.

3.3.3 Preparación del sustrato e inoculación.

La paja de trigo se cortó con la ayuda de un molino, a 5 cm de largo aproximadamente, se dejó hidratar durante 24 horas y se drenó el exceso de agua durante 1 hora. A continuación se esterilizó durante 2 horas a 121°C y 15 libras de presión en frascos de poliuretano de 500 g de capacidad, cubiertos con hule espuma y papel aluminio. Una vez esterilizado el sustrato se dejó enfriar a temperatura ambiente y se traspasó a bolsas de plástico bajo condiciones asépticas. El sustrato estéril y frío se inoculó con el inóculo de grano al 20% en base húmeda. Las bolsas inoculadas se agitaron manualmente para lograr una distribución homogénea del inóculo y se incubaron a 28°C durante 21 y 42 días.

3.3.4 Evaluación de los patrones de consumo de los dicarlotos acetilolíticos sobre el sustrato.

Los sustratos lignocelulósicos inoculados con las diferentes cepas se incuban a 28°C ± 2°C y se toman 3 bolsas de cada cepa a los 21 y 42 días. Las muestras se secan para determinar su contenido de humedad y los cambios en su composición. Estos cambios son detectados cuantificando en el sustrato, en cada periodo de incubación las cantidades de cenizas, lignina, y carbohidratos (pentosas y hexosas).

3.3.5 Determinaciones analíticas.

Cenizas (3).

Para cuantificar las cenizas, se coloca un crisol a peso constante en la mufla a 550 °C. Una vez frío el crisol, se pesa 1 g de la muestra y se carboniza con la ayuda de un mechero. A continuación se coloca nuevamente el crisol en la mufla hasta obtener cenizas de color blanco o gris. Finalmente se deja enfriar el crisol en un desecador y se pesa nuevamente.

Lignina (Método de Effland) (7)

Esta determinación se basa en que al tratar un material lignocelulósico con un ácido fuerte, se hidrolizan todos los carbohidratos y por lo tanto se solubilizan, dejando un residuo insoluble que por definición se le conoce como lignina. Para determinar la lignina, se pesa 1 g de

muestra seca en un matraz Erlenmeyer de 500 ml y se adicionan 10 ml de ácido sulfúrico al 72%. Mezclar la muestra para que se humedezca con el ácido y dejar reposar durante 1 hora. A continuación adicionar 280 ml de agua destilada, se tapa el matraz con hule espuma y aluminio y se esteriliza a 121°C y 15 libras de presión durante 1 hora. Después del tratamiento térmico, el contenido del matraz se filtra en caliente en papel Whatman #1 previamente tarado. Eliminar el sobrenadante y lavar el precipitado de lignina con agua destilada hasta que el pH del agua de lavado alcance un valor cercano a 6. Posteriormente secar el papel filtro a 60°C hasta peso constante. El material residual corresponde a la lignina aparente. La cantidad de lignina aparente se calcula de acuerdo a la siguiente fórmula:

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

CARBOHIDRATOS

Extracción.

Esta determinación se basa en que al tratar un material lignocelulósico con un ácido fuerte se solubilizan todos los carbohidratos, para ser cuantificados posteriormente por métodos específicos. Para extraer los carbohidratos pesar 200 mg de muestra en un tubo de centrifuga de 15 ml de capacidad y adicionar con agitación 10 ml de ácido sulfúrico al 67%. Dejar reposar la muestra durante 1 hora a temperatura ambiente agitando cada 15 minutos. A continuación centrifugar a 5,000 rpm durante 20 minutos y eliminar el precipitado obtenido. En la solución resultante determinar el contenido de hexosas y pentosas.

Celulosa (15).

En el método de Klein-Weissman, las hexosas son oxidadas por el ácido sulfúrico y dan origen al formaldehído, el cual en presencia de ácido cromotrópico da una coloración violeta proporcional al contenido de hexosas. La eficiencia del método analítico seleccionado y de los factores que interfieren en el desarrollo del color fueron estudiados en un trabajo previo (1). Considerando los resultados obtenidos en dicho estudio, las condiciones óptimas para la cuantificación de hexosas son las siguientes:

- Tiempo de calentamiento: 50 minutos.
- Absorbancia máxima: 570 nm.
- Concentración de ácido cromotrópico: 0.5 g en 205 ml de ácido sulfúrico.

Con las condiciones óptimas se realiza una curva estándar de glucosa en agua. (Tabla 3)

La cuantificación de celulosa se lleva a cabo de la siguiente manera: colocar 1 ml de la solución problema en un tubo de ensaye y añadir a continuación 5 ml de reactivo de Klein-Weissman. Tapar los tubos de ensaye y colocarlos en un baño de agua a temperatura de

ebullición durante 50 minutos. A continuación enfriar los tubos inmediatamente y leer a 570 nm contra un blanco de agua.

Para preparar el reactivo de Klein-Weissman, disolver 0.5 g de ácido cromotrópico en 5 ml de agua destilada y adicionar 205 ml de ácido sulfúrico 15 M. El reactivo se debe preparar al momento, de lo contrario se requiere guardarlo en refrigeración por un máximo de 2 semanas.

Hemicelulosa (21).

El método de Tracey se fundamenta en que al oxidarse las pentosas por acción del ácido acético en presencia de anilina y oxígeno, se desarrolla un complejo colorido de color naranja. Esta coloración es proporcional a la cantidad de pentosas presentes en la muestra. De acuerdo a los resultados obtenidos en un trabajo previo (1), las condiciones óptimas para la cuantificación de la pentosas son las siguientes:

- Absorbancia máxima: 475 nm.
- Temperatura de reacción: $30 \pm 2^\circ\text{C}$.
- Tiempo de reacción: 24 horas.

Con estas condiciones realizar una curva estándar con soluciones de xilosa en ácido sulfúrico al 67%, debido a que la xilosa es el componente que se encuentra en mayor proporción en la hemicelulosa. Para llevar a cabo esta determinación, colocar 2 ml de la muestra en un tubo de ensayo y adicionar 6 ml del reactivo de Tracey. Dejar los tubos de ensayo en la oscuridad a $30^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 horas. A continuación tomar las lecturas de las muestras a 475 nm contra un blanco de ácido sulfúrico al 67%. Preparar el reactivo de Tracey mezclando en un frasco de color ámbar 100 ml de ácido acético glacial, 5 ml de ácido oxálico al 5%, 24 ml de agua destilada y 16 ml de anilina incolora. El reactivo no debe usarse después de una semana de su preparación.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 RESULTADOS

Para el presente trabajo se contaban con cepas acelulolíticas del hongo comestible *Pleurotus ostreatus*, que habían sido obtenidas previamente por mutación química y mejoramiento genético. Sin embargo, dichas cepas no habían sido evaluadas en términos de su capacidad real para consumir los componentes de algunos sustratos lignocelulósicos.

Para determinar los patrones de consumo se utilizó como sustrato paja de trigo, inoculada al 20% con inóculo de grano de trigo y se incubó durante 21 y 42 días. La cuantificación del consumo de los componentes del sustrato por los dicaríotes acelulolíticos y las cepas control se llevó a cabo para cada tiempo de muestreo, tomando 3 bolsas. Cada bolsa se analizó por triplicado en términos de su contenido de: cenizas, lignina, celulosa y hemicelulosa.

CUANTIFICACIÓN DE CELULOSA Y HEMICELULOSA.

Para la cuantificación de celulosa y hemicelulosa fue necesario realizar una curva estándar de glucosa en agua y xilosa en ácido sulfúrico, respectivamente. Ambas curvas siguieron la Ley de Lambert & Beer. La curva de glucosa en agua fue lineal hasta una concentración de 30 mg/ml, que correspondió a una absorbancia de 0.95 (Tabla 3, Figura 5). La curva de xilosa en ácido sulfúrico también fue lineal para una concentración de 50 μ g/ml, con una absorbancia de 0.85 (Tabla 4, Figura 6).

TABLA 3: CURVA ESTÁNDAR PARA LA DETERMINACIÓN DE HEXOSAS, UTILIZANDO COMO REFERENCIA UNA SOLUCIÓN DE GLUCOSA EN AGUA (MÉTODO MODIFICADO DE KLIEN WEISSMAN).

CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA (mg/ml)	ABSORBANCIA ($\lambda = 570 \text{ nm}$)
0.00	0.000
0.05	0.173
0.10	0.325
0.15	0.455
0.20	0.630
0.25	0.860
0.30	0.950

Coeficiente de correlación = 0.99700
 Pendiente = 3.2350
 Intercepto = 0.00053

**CURVA PARA HEXOSAS
(Método de Klein-Weissman)**

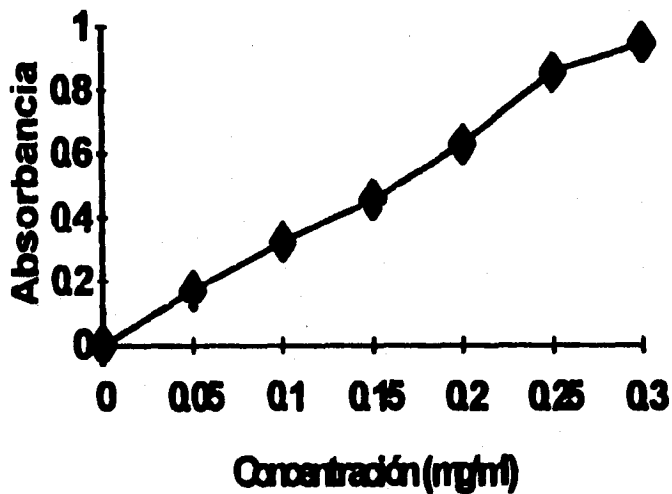
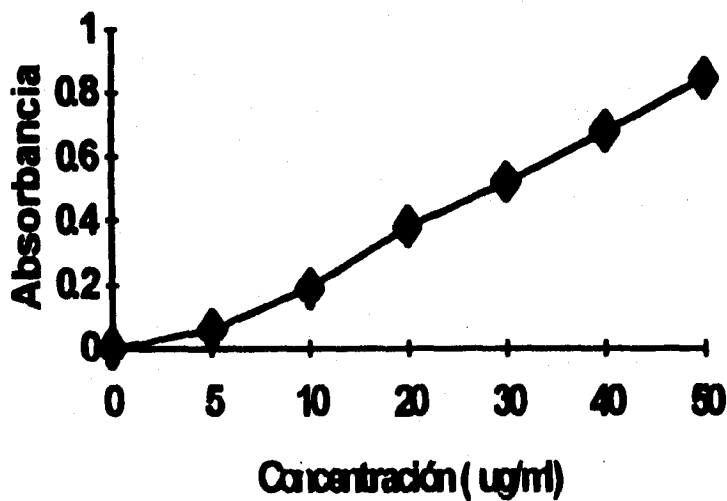


TABLA 4: CURVA ESTÁNDAR PARA LA DETERMINACIÓN DE PENTOSAS UTILIZANDO COMO REFERENCIA UNA SOLUCIÓN DE GLUCOSA EN ÁCIDO SULFÚRICO AL 67% POR EL MÉTODO DE TRACEY.

CONCENTRACIÓN DE XILOSA ($\mu\text{g/ml}$)	ABSORBANCIA ($\lambda = 475 \text{ nm}$)
0	0.00
5	0.06
10	0.19
20	0.38
30	0.52
40	0.68
50	0.85

Coeficiente de correlación = 0.998
 Pendiente = 0.0178
 Intercepto = 0.0045

**CURVA DE PENTOSAS
(Método de Tracey)**



En la Tabla 5 se presenta la composición de la paja de trigo en base seca a los 21 días de incubación. Para el sustrato control al tiempo cero las cenizas fueron 6.71%, mientras que para las cepas control, el contenido aparente de cenizas a los 21 días se incrementó entre 7.48 y 9.28%. De igual forma se observa un incremento para todas las cepas acelulolíticas desde 7.63 hasta 9.69%. La cantidad de lignina para el sustrato al tiempo cero fue de 26.01%. Para las cepas control el contenido aparente de lignina disminuyó ligeramente en un rango de 23.43 a 24.68%.

Para las cepas acelulolíticas también hubo decrementos que va desde 18.65 hasta 24.56%. Con respecto a la celulosa para el sustrato control al tiempo cero fue de 38.74%, para las cepas control hubo un aumento relativo con respecto al sustrato sin inocular entre 41.58 y 52.11%. De igual forma las cepas acelulolíticas presentaron un incremento relativo en la cantidad de celulosa en un rango de 45.00 a 50.14%. El contenido de hemicelulosa para el sustrato control al tiempo cero fue de 19.51. En las cepas control disminuyó la cantidad de hemicelulosa a los 21 días de 14.30 a 18.34%. En forma similar las cepas acelulolíticas presentaron cantidades semejantes (13.76 a 19.02%).

En la Tabla 6 se presenta la composición de la paja de trigo después de 42 días de incubación con las cepas control y acelulolíticas. El contenido de cenizas para las cepas control se incrementó ligeramente con respecto a los 21 días en un rango de 9.13 a 11.83%. Las cepas acelulolíticas también presentaron incrementos semejantes 8.9 a 12.25%. La cantidad de lignina para las cepas control se mantuvo por abajo de la cantidad presente en el sustrato al tiempo cero, siendo para éstas entre 21.83 y 24.68%. En forma semejante las cepas acelulolíticas también presentaron un decremento en el contenido de lignina entre 18.44 y 22.85%. La cantidad de celulosa en las cepas control se incrementó con respecto a los 21 días en un rango desde 48.02 hasta 54.40%.

Las cepas acelulolíticas también presentaron un incremento semejante de 48.41 a 55.17%. Para la hemicelulosa se presentó un ligero decremento con respecto a los 21 días que va de 13.78 a 17.85%. En las cepas acelulolíticas la disminución fue semejante (14.08 a 17.98%).

En las Tablas 7 y 8 se presentan los cambios en composición, en base constante de cenizas, de la paja de trigo a los 21 y 42 días de incubación. Como se sabe durante el periodo de incubación, los diferentes componentes orgánicos del sustrato se degradan a CO₂ y agua, de la cual parte se evapora y parte queda retenida en el sustrato. Sin embargo, el contenido absoluto de minerales se mantiene constante, pero no en términos de porcentaje en relación con los demás componentes, ya que al disminuir la cantidad de cada componente, el porcentaje de cenizas se verá incrementado.

TABLA 5: COMPOSICIÓN DE LA PAJA DE TRIGO DESPUÉS DE 21 DÍAS DE INCUBACIÓN CON CEPAS SILVESTRES Y ACELULOLÍTICAS.

CEPAS	COMPOSICIÓN (g/100 g PAJA SECA)				
	CENIZAS	LIGNINA	CARBOHIDRATOS		TOTAL
			CELULOSA	HEMICELULOSA	
CONTROLES					
Paja (t=0)	6.7±0.2	26.1±0.3	38.7±0.0	19.5±0.5	91.0
8 x 3	7.5±0.3	23.7±0.2	52.1±0.5	14.3±0.2	97.6
Mo. 24	8.7±0.3	23.4±0.6	42.0±0.7	18.0±0.1	92.1
56 HiNi x Mo. 24	9.3±0.4	24.7±0.3	41.6±0.5	18.3±0.5	93.9
DIC. (C.)					
16 x 27	7.6±0.6	23.5±0.2	46.3±0.5	18.4±0.4	95.9
16 x 100	9.5±0.3	23.3±0.5	45.1±1.0	16.7±0.3	94.6
36 x 61	9.7±0.6	22.1±1.0	50.1±0.9	13.8±0.7	95.7
73 x 27	7.8±0.3	23.8±0.1	45.0±0.5	17.6±0.1	94.2
84 x 27	9.3±0.4	18.6±0.3	49.3±1.1	19.0±0.0	96.3
104 x 61	8.2±0.7	24.6±0.6	45.9±0.4	14.7±0.2	93.4

TABLA 6: COMPOSICIÓN DE LA PAJA DE TRIGO DESPUÉS DE 42 DÍAS DE INCUBACIÓN CON CEPAS SILVESTRES Y ACELULOLÍTICAS.

CEPAS	COMPOSICIÓN (g/100 g PAJA SECA)				
	CENIZAS	LIGNINA	CARBOHIDRATOS		TOTAL
			CELULOSA	HEMICELULOSA	
CONTROLES					
Paja(t=0)	6.7 ± 0.2	26.1 ± 0.3	38.7 ± 0.0	19.5 ± 0.5	91.0
8 x 3	9.1 ± 0.3	23.0 ± 0.2	54.4 ± 0.6	13.8 ± 0.2	100.3
Mo. 24	11.3 ± 0.3	21.8 ± 0.2	48.0 ± 0.9	16.5 ± 0.1	97.7
56 HiNi x Mo. 24	11.8 ± 0.5	24.7 ± 0.3	51.9 ± 0.6	17.8 ± 0.2	106.2
DIC. (C.)					
16 x 27	11.3 ± 0.6	21.3 ± 0.6	49.5 ± 0.8	17.4 ± 0.3	99.5
16 x 100	12.2 ± 1.0	20.1 ± 0.9	48.4 ± 0.8	16.8 ± 0.0	97.6
36 x 61	11.7 ± 0.7	22.4 ± 0.1	55.2 ± 0.8	14.4 ± 0.1	103.7
73 x 27	8.9 ± 0.4	19.1 ± 0.5	48.5 ± 0.6	17.1 ± 0.1	93.7
84 x 27	12.1 ± 0.3	18.4 ± 0.3	49.1 ± 0.7	18.0 ± 0.4	97.6
104 x 61	11.1 ± 0.9	22.8 ± 0.4	48.8 ± 0.4	14.1 ± 0.1	96.1

TABLA 7 : CAMBIO EN LA COMPOSICIÓN EN BASE CONSTANTE DE LA PAJA DE TRIGO A LOS 21 DÍAS DE INCUBACIÓN CON CEPAS SILVESTRES Y ACELULOLÍTICAS.

CEPAS	COMPOSICIÓN (g DE COMP./g DE CENIZAS)		
	LIGNINA	CARBOHIDRATOS	
		CELULOSA	HEMICELULOSA
CONTROLES			
PAJA(t=0)	3.88 ± 0.05	5.77 ± 0.00	2.89 ± 0.06
8 x 3	3.17 ± 0.03	ND	1.91 ± 0.03
Mo. 24	2.70 ± 0.07	4.85 ± 0.08	2.07 ± 0.01
56H ₁ N ₁ x Mo. 24	2.66 ± 0.04	4.48 ± 0.06	1.98 ± 0.05
DIC. (C)			
16 x 27	3.08 ± 0.02	ND	2.41 ± 0.05
16 x 100	2.45 ± 0.07	4.73 ± 0.11	1.75 ± 0.04
36 x 61	2.29 ± 0.13	5.17 ± 0.09	1.42 ± 0.07
73 x 27	3.06 ± 0.03	5.79 ± 0.07	2.27 ± 0.02
84 x 27	1.99 ± 0.04	5.28 ± 0.11	2.03 ± 0.01
104 x 61	2.98 ± 0.08	5.56 ± 0.04	1.78 ± 0.03

ND: No determinado

TABLA 8: CAMBIO EN LA COMPOSICIÓN EN BASE CONSTANTE DE LA PAJA DE TRIGO A LOS 42 DÍAS DE INCUBACIÓN CON CEPAS SILVESTRES Y ACELULOLÍTICAS.

CEPAS	COMPOSICIÓN (g DE COMP./g DE CENIZAS)		
	LIGNINA	CARBOHIDRATOS	
		CELULOSA	HEMICELULOSA
<u>CONTROLES</u>			
PAJA(t=0)	3.88 ± 0.05	5.77 ± 0.00	2.89 ± 0.06
8 x 3	2.51 ± 0.03	5.96 ± 0.07	1.51 ± 0.02
Mo. 24	1.92 ± 0.02	4.23 ± 0.08	1.45 ± 0.01
56H ₁ N ₁ x Mo. 24	2.07 ± 0.03	4.39 ± 0.05	1.51 ± 0.02
<u>DIC. (C-)</u>			
16 x 27	1.89 ± 0.06	4.39 ± 0.07	1.56 ± 0.02
16 x 100	1.64 ± 0.21	3.95 ± 0.07	1.37 ± 0.00
36 x 61	1.92 ± 0.01	4.72 ± 0.10	1.23 ± 0.01
73 x 27	2.15 ± 0.06	5.45 ± 0.07	1.93 ± 0.01
84 x 27	1.52 ± 0.03	4.05 ± 0.06	1.49 ± 0.03
104 x 61	2.05 ± 0.05	4.39 ± 0.04	1.26 ± 0.01

Con respecto a la cantidad de lignina en base a cenizas para el sustrato control al tiempo cero fue de 3.88, para las cepas control se presentó una disminución con respecto a ésta y va de 2.66 a 3.17. Las cepas acelulolíticas presentan una disminución semejante entre 1.99 y 3.08. La cantidad de celulosa en base a cenizas constantes para el sustrato control al tiempo cero fue de 5.77, las cepas control presentaron una ligera disminución que va de 4.48 hasta 4.85 y las cepas acelulolíticas presentaron una cantidad semejante al sustrato control al tiempo cero (4.73 a 5.79). La cantidad de hemicelulosa en la misma base constante para el sustrato control al tiempo cero fue de 2.89, las cepas control mostraron una ligera disminución de 1.91 a 2.07, de la misma forma las cepas acelulolíticas también presentaron una disminución, que va de 1.42 hasta 2.41.

En la Tabla 8 se presentan los cambios en la composición de la paja de trigo a los 42 días de incubación considerando las cenizas constantes. La cantidad de lignina del sustrato control con respecto a las cepas control presentó una disminución que va de 1.92 a 2.51, para las cepas acelulolíticas también se observó una disminución semejante de 1.52 a 2.15. Para la celulosa las cepas control casi se mantienen en el mismo rango con respecto al sustrato control y van de 4.23 a 5.96. De igual forma las cepas acelulolíticas, presentan una cantidad semejante a las cepas control, que va desde 3.95 hasta 5.45. Con respecto a la cantidad de hemicelulosa las cepas control presentaron una pérdida con respecto al sustrato control, que va de 1.45 a 1.51. Para las cepas acelulolíticas la disminución fue similar, de 1.23 a 1.93.

La pérdida de los componentes de la paja de trigo para los 21 y 42 días de incubación se calculó considerando la cantidad de cada componente en base a cenizas de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Pérdida} = \frac{\frac{\text{g Componente (t=0)} - \text{g Componente (t=t)}}{\text{g cenizas}}}{\frac{\text{g Componente (t=0)}}{\text{g cenizas}}} \times 100$$

En la Tabla 9 se presenta la pérdida de cada componente expresada en porcentaje para los 21 días de incubación. La pérdida de lignina para las cepas control fue del 18.30 al 31.36% y para las cepas acelulolíticas fue desde 20.70% hasta 48.63%. La pérdida de celulosa en las cepas control varió entre 16.02 y 22.36%. Las cepas acelulolíticas perdieron entre 1.17% y 18.02%. Para la hemicelulosa las cepas control presentaron una pérdida de 28.26% a 34.02%, mientras que las cepas acelulolíticas perdieron de 16.49% a 50.86%.

TABLA 9: PÉRDIDA DE LIGNINA Y CARBOHIDRATOS DE LA PAJA DE TRIGO DESPUÉS DE 21 DÍAS DE INCUBACIÓN CON CEPAS SILVESTRES Y ACELULOLÍTICAS.

<u>CEPAS</u>	<u>PERDIDA DE LOS COMPONENTES (%)</u>		
	<u>LIGNINA</u>	<u>CARBOHIDRATOS</u>	
		<u>CELULOSA</u>	<u>HEMICELULOSA</u>
<u>CONTROLES</u>			
8 x 3	18.30±0.68	N.D.	34.02±0.96
Mo. 24	30.33±1.81	16.02±1.47	28.26±0.46
56HiNi x Mo. 24	31.36±1.08	22.36±0.94	31.60±1.65
<u>DIC. (C-)</u>			
16 x 27	20.70±0.59	N.D.	16.49±1.75
16 x 100	36.85±1.82	18.02±1.87	39.38±1.23
36 x 61	41.11±3.86	10.37±1.62	50.86±2.54
73 x 27	21.05±0.65	1.17±0.14	21.60±0.55
84 x 27	48.63±0.97	8.55±1.95	29.60±0.35
104 x 61	23.28±2.14	3.60±0.76	38.40±0.88

ND: No determinado

TABLA 10: PÉRDIDA DE LIGNINA Y CARBOHIDRATOS DE LA PAJA DE TRIGO DESPUÉS DE 42 DÍAS DE INCUBACIÓN CON CEPAS SILVESTRES Y ACELULOLÍTICAS.

<u>CEPAS</u>	<u>PÉRDIDA DE LOS COMPONENTES (%)</u>		
	<u>LIGNINA</u>	<u>CARBOHIDRATOS</u>	
		<u>CELULOSA</u>	<u>HEMICELULOSA</u>
<u>CONTROLES</u> 8 x 3	33.22±0.85	N.D.	47.75±0.65
Mo. 24	50.43±0.54	26.65±1.31	49.71±0.17
56HiNi x Mo. 24	46.22±0.79	23.97±0.91	47.67±0.71
<u>DIC. (C-)</u> 16 x 27	51.20±1.51	23.86±1.24	46.14±0.81
16 x 100	57.73±2.55	31.52±1.24	52.60±0.00
36 x 61	50.51±0.36	18.22±1.16	57.62±0.42
73 x 27	44.56±1.60	5.51±1.20	33.29±0.29
84 x 27	60.74±0.83	29.75±1.04	48.56±0.96
104 x 61	47.08±1.16	23.99±0.63	56.29±0.49

ND: No determinado

en la Tabla 10 se muestra la pérdida de cada componente en porciento a los 42 días de incubación. La pérdida de lignina para las cepas control varió desde 33.22% hasta 50.43%. Para las cepas acelulolíticas la pérdida se incremento en un rango de 47.08% a 60.74%. Con respecto a la celulosa, las cepas control perdieron entre 23.97% y 26.65%, las cepas acelulolíticas perdieron entre 5.51% y 31.52%. La pérdida de hemicelulosa para las cepas control fue de 47.67% a 49.71%, para las cepas acelulolíticas la pérdida se mantuvo entre 33.29% y 57.62%

4.2 DISCUSION

Para interpretar los resultados se aplicó un análisis de varianza para determinar si existía una diferencia significativa entre los sustratos ($P=99\%$) debido al desarrollo de cepas con diferentes características (cepas control o progenitoras y cepas acelulolíticas). En los casos donde se presentó una diferencia significativa o altamente significativa en el análisis de varianza, se aplicó la prueba de rango múltiple de Duncan para clasificar a las cepas de acuerdo a su capacidad para consumir el sustrato. Finalmente se aplicó una prueba de "t" de Student para determinar si existía diferencia entre el porcentaje de degradación de cada cepas a los 21 y 42 días de incubación.

En la Tabla 11 se presenta el análisis estadístico para el consumo de lignina para las cepas control y acelulolíticas. El análisis de varianza indicó que existía diferencia altamente significativa en el consumo de lignina entre las diferentes cepas evaluadas para los dos tiempos de incubación. Al aplicar la prueba de rango múltiple de Duncan para los 21 días de incubación, se observa que cada cepa presenta diferente capacidad para consumir lignina. De acuerdo a esta prueba, las cepas se ordenaron de menor a mayor pérdida de lignina con letras diferentes de acuerdo al alfabeto. Las cepas de mayor consumo de lignina fueron el dicarlotte 84 x 27 con 49%, seguido de las cepas 36 x 61 y 16 x 100, en un rango de 37 a 41, y con un consumo menor, los controles 56HINI-MO. 24, y Mo. 24, con un rango de 30-31%, y las cepas que tuvieron menor degradación fueron los dicarlotos 104 x 61; y la 16 x 27, con un consumo que va desde 23% hasta 21%; la de menor consumo fue el control 8 x 3, con 18%. A los 42 días de incubación las cepas que mayor consumo de lignina tuvieron, fueron el dicarlotte 84x27, con un consumo de 61% ; y luego las cepas 16 x 100, 16x27, 36x61, y el control Mo.24, con un rango de 58% a 50% ; y continuamos con las cepas 104 x 61, 56HINI-Mo.24, y la 73 x 27, con una cantidad descendente de 47% a 44%; y la cepa que menos lignina consumió fue el control 8 x 3, con aproximadamente 35%. La prueba "T" se uso para comprobar si había aumento en la degradación de lignina entre los 21 y 42 días de incubación para cada cepa y los resultados de estas pruebas arrojaron que había diferencias altamente significativas en cada una de las cepas mayor de 99% como se muestra en tabla.

En la Tabla 12 se presenta el análisis estadístico para el consumo de celulosa por las cepas control y acelulolíticas. El análisis de varianza nos da una diferencia altamente significativa para

el consumo de celulosa entre las diferentes cepas evaluadas para los dos tiempos de incubación. Al aplicar la prueba de rango múltiple de Duncan para los 21 días de incubación, se observa que cada una de las cepas presenta diferente capacidad para consumir celulosa, de acuerdo a esta prueba, las cepas se ordenaron de menor a mayor pérdida de celulosa con letras diferentes de acuerdo al alfabeto. Las cepas de mayor consumo de celulosa fueron el control 56HINI-Mo.24, con (22% aprox.); seguido de los dicarlotos y cepas control en forma descendente de consumo, así la cepa 16 x 100; Mo.24; 36 x 61; y 84 x 27; en un rango de (18% a 9%); y las cepas que menor consumo de celulosa tuvieron fueron los dicarlotos 16 x 27; 104 x 61; y 73 x 27 con una cantidad que va de (4% a 1%). A los 42 días de incubación, se siguió el mismo procedimiento del caso anterior para el análisis de varianza respectivo y siguiendo el mismo orden y la cepa que más celulosa degradó fue el dicarlotte 16 x 100, con (32% aprox.); seguida de los dicarlotos y controles como sigue, 84 x 27; MO.24; 104 x 61; 56HINI-MO.24; y 16 x 27, con un rango de degradación de (30% a 24%); y las cepas de menor consumo fueron los dicarlotos 36 x 61; y 73 x 27 con (18% hasta 5.51%). La prueba "T" se utilizó con la finalidad de comparar el aumento en la degradación de celulosa entre los 21 y 42 días de incubación para cada cepa y se observó una diferencia muy significativa para cada una de las cepas y que es mayor de ($P=99\%$).

En la Tabla 13 se presenta el análisis estadístico para el consumo de hemicelulosa, tanto para las cepas control como para las cepas acelulolíticas. También en este caso el análisis de varianza indicó una diferencia altamente significativa, en el consumo de hemicelulosa, todo entre las cepas evaluadas a los dos tiempos de incubación, cuando se aplicó la prueba de Duncan a los 21 días de incubación se observó, que en el caso de la Hemicelulosa las cepas tienen diferente capacidad de consumo entonces las cepas se ordenaron de menor a mayor pérdida de Hemicelulosa, con letras diferentes de acuerdo al alfabeto, entonces así, las cepas que más hemicelulosa consumieron fueron la 36 x 61 con un consumo de (51%), seguido de los dicarlotos 16 x 100 y 104 x 61 con un rango de consumo que va de (39% a 38%), y luego con un consumo descendente los controles y dicarlotos como sigue, 8 x 3; 56HINI x Mo.24; 84 x 27; y Mo.24, con un consumo desde (34% hasta 28%); y las de menor consumo fueron las cepas 73 x 27; y 16 x 27, con (22% a 16%).

También a los 42 días de incubación se aplicó el análisis de varianza y la prueba de Duncan, observándose diferencias altamente significativas y también su capacidad de degradación es diferente, y entonces las cepas que mayor degradación de hemicelulosa tuvieron a este tiempo fueron; el dicarlotte 36 x 61 con (58% aprox.); seguido de los dicarlotos y control siguiente, 104 x 61; 16 x 100; Mo.24; y 84 x 27; con un rango de consumo de (56% a 48%); después vienen los controles, 8 x 3; 56HINI-Mo.24, con (47.75% a 47.67%) y con menor consumo los dicarlotos 16 x 27 y 73 x 27 con (46% a 33%). Ahora en este caso también se aplicó la prueba "T" para comparar el aumento en la degradación de Hemicelulosa entre los 21 y 42 días de incubación y se observaron diferencias altamente significativas, para una probabilidad que vaya hasta el 99%, como se indica en la tabla.

ESTA TAREA DE DEBE
SER DE LA BIBLIOTECA

TABLA 11: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL CONSUMO DE LIGNINA POR LAS CEPAS CONTROL Y LOS DICARIOTES ACELULOLÍTICOS.

PRUEBAS ESTADÍSTICAS	RESULTADOS			
ANÁLISIS DE VARIANZA	DIFERENCIA ALTAMENTE SIGNIFICATIVA (P=99%) EN CADA TIEMPO DE INCUBACIÓN			
	21 DÍAS		42 DÍAS	
PRUEBA DE DUNCAN	8 x 3 16 x 27 73 x 27 104 x 61 Mo. 24 56H ₁ N ₁ xMo.24 16 x 100 36 x 61 84 x 27	a ab ab b c c d e f	8 x 3 73 x 27 56H ₁ N ₁ xMo.24 104 x 61 Mo. 24 36 x 61 16 x 27 16 x 100 84 x 27	a b b c d d e f
PRUEBA "T"	8 x 3 Mo. (P=99%)24 56 H ₁ N ₁ x Mo. 24 16 x 27 73 x 27 84 x 27 36 x 61 104 x 61 16 x 100	Mayor (P=99%) Mayor (P=99%) Mayor (P=99%) Mayor (P=99%) Mayor (P=99%) Mayor (P=99%) Mayor (P=99%) Mayor (P=99%) Mayor (P=99%)		
<p>Análisis de varianza: Este análisis indicó que existía una diferencia altamente significativa entre los substratos, debido al desarrollo micellar de las diferentes cepas.</p> <p>Prueba de Duncan: Las cepas se ordenan de menor a mayor pérdida de acuerdo a su media (x). Letras diferentes para un mismo tiempo indican diferencias significativas entre las cepas (P=99%).</p> <p>Prueba "T": Esta prueba se utilizó para comparar el aumento en la degradación de lignina entre los 21 y 42 días de incubación para cada cepa.</p>				

TABLA 12: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL CONSUMO DE CELULOSA POR LAS CEPAS CONTROL Y LOS DICARIOTES ACELUIOLÍTICOS.

PRUEBAS ESTADÍSTICAS	RESULTADOS			
ANÁLISIS DE VARIANZA	DIFERENCIA ALTAMENTE SIGNIFICATIVA (P=99%) EN CADA TIEMPO DE INCUBACIÓN			
	1 DÍAS		42 DÍAS	
PRUEBA DE DUNCAN	73 x 27	a	8 x 3	a
	104 x 61	b	73 x 27	b
	16 x 27	c	36 x 61	c
	84 x 27	d	104 x 61	d
	36 x 61	e	16 x 27	d
	Mo. 24	f	56H ₁ N ₁ xMo.24	d
	16 x 100	g	Mo. 24	e
	8 x 3	h	84 x 27	f
	56H ₁ N ₁ xMo.24	i	16 x 100	g
PRUEBA T	8 x 3	Mayor (P=99%)		
	Mo. 24	Mayor (P=99%)		
	56 H ₁ N ₁ x Mo. 24	Mayor (P=99%)		
	16 x 27	Mayor (P=99%)		
	73 x 27	Mayor (P=99%)		
	84 x 27	Mayor (P=99%)		
	36 x 61	Mayor (P=99%)		
	04 x 61	Mayor (P=99%)		
16 x 100	Mayor (P=99%)			
<p>Análisis de varianza: Este análisis indicó que existía una diferencia altamente significativa entre los sustratos, debido al desarrollo micellar de las diferentes cepas.</p> <p>Prueba de Duncan: Las cepas se ordenan de menor a mayor pérdida de acuerdo a su media (x). Letras diferentes para un mismo tiempo indican diferencias significativas entre las cepas (P=99%).</p> <p>Prueba "T": Esta prueba se utilizó para comparar el aumento en la degradación de celulosa entre los 21 y 42 días de incubación para cada cepa.</p>				

TABLA 13: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL CONSUMO DE HEMICELULOSA POR LAS CEPAS CONTROL Y LOS DICARIOTES ACELULOLÍTICOS.

PRUEBAS ESTADÍSTICAS	RESULTADOS			
ANÁLISIS DE VARIANZA	DIFERENCIA ALTAMENTE SIGNIFICATIVA (P=99%) EN CADA TIEMPO DE INCUBACIÓN			
	21 DÍAS		42 DÍAS	
PRUEBA DE DUNCAN	16 x 27	a	73 x 27	a
	73 x 27	b	16 x 27	b
	Mo. 24	c	56HiNi x Mo. 24	c
	84 x 27	d	8 x 3	c
	56HiNi x Mo. 24	e	84 x 27	d
	8 x 3	f	Mo. 24	e
	104 x 61	g	16 x 100	f
	16 x 100	g	104 x 61	g
	36 x 61	h	36 x 61	h
PRUEBA "T"	8 x 3	Mayor (P=99%)		
	Mo. 24	Mayor (P=99%)		
	56 HiNi x Mo. 24	Mayor (P=99%)		
	16 x 27	Mayor (P=99%)		
	73 x 27	Mayor (P=99%)		
	84 x 27	Mayor (P=99%)		
	36 x 61	Mayor (P=99%)		
	104 x 61	Mayor (P=99%)		
16 x 100	Mayor (P=99%)			

Análisis de varianza: Este análisis indicó que existía una diferencia altamente significativa entre los substratos, debido al desarrollo micellar de las diferentes cepas.

Prueba de Duncan: Las cepas se ordenan de menor a mayor pérdida de acuerdo a su media (x). Letras diferentes para un mismo tiempo indican diferencias significativas entre las cepas (P=99%).

Prueba "T": Esta prueba se utilizó para comparar el aumento en la degradación de hemicelulosa entre los 21 y 42 días de incubación para cada cepa.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

El presente trabajo se llevó a cabo con cepas acelulolíticas del hongo *Pleurotus ostreatus* que previamente se obtuvieron por mutación química y mejoramiento genético. Este experimento se realizó para determinar la capacidad de estas cepas, para degradar los componentes de la paja de trigo, a los 21 días de incubación; como resultado se llegó a las siguientes conclusiones.

Como resultado de los procesos de degradación de los componentes del sustrato, por el desarrollo micellar de las diferentes cepas, se obtuvieron cepas con las siguientes características:

- a).- Las cepas (73 x 27; 36 x 61) degradaron menor cantidad de celulosa que los controles, pero simultáneamente degradaron igual cantidad de lignina que dichos controles.
- b).- Las cepas (104 x 61; 104 x 27) degradan igual cantidad de celulosa que los controles, y al mismo tiempo igual cantidad de lignina que los controles.
- c).- Las cepas (84 x 27; 104 x 100) degradan más celulosa y lignina que los controles (x 100).

Para los objetivos de este trabajo, las cepas de mayor interés son las que degradan menor cantidad de celulosa que los controles, pero simultáneamente degradan igual cantidad de lignina (73 x 27; 36 x 61).

Como resultado final de este trabajo, el proceso de mutación y mejoramiento genético, nos permitió obtener y seleccionar cepas mejoradas en su capacidad para consumir celulosa, como las cepas (73 x 27; 104 x 27; 104 x 61; 16 x 27; 84 x 27; 36 x 61).

El análisis estadístico, permitió detectar diferencias altamente significativas en los patrones de degradación del sustrato por las diferentes cepas probadas.

Finalmente con este trabajo, fue posible obtener cepas acelulolíticas que permitan un aprovechamiento integral de los desechos agrícolas. Es decir, por un lado producir hongos comestibles para la alimentación humana y por otro lado obtener un sustrato residual apto para la alimentación de animales (con alto contenido de celulosa y bajo contenido de lignina).

CAPÍTULO VI

BIBLIOGRAFIA

1. Agosin, E., B. Monties, and E. Odler. Structural Changes in Wheat Straw Durin Decay by Lignina Degrading White-rot Fungi in Relation to Improvement of Digestibility for Rumlants. J. Sci. Food Agric. *36*: 925-935. 1985.
2. Ander, P., K. E. Eriksson, P. Mansson, and B. Petterson. Lignina Degraton by *Sporotrichum pulverulentum*: a New Cultivation Methodo Study Fungal Lignina Degradation. Int. Symp. Wood Pulping Chem. *3*:71. 1981.
3. AOAC. (Association of Official Analytical Chemists). Official Methods of Analysis. Ninth Edition. 1960.
4. Balasubramanya, R. H., D. Y. Pal, A. J. Salkh, and V. J. Kandeparker. Biological Softening of Spent Cotton-Plant Stalks for the Preparation of Pulp. Biological Wastes. *30*:317- 3 320. 1989.
5. Crawford, R. L. Lignina Biodegradation and Transformation. John Wiley & Sons, Inc., New York. 1981.
6. Datta, A., A. Bettermann, and T. K. Kirk. Identification of a Especific Manganese Peroxidasa Among Ligninolytic Enzymes Secreted by *Phanerochaete chrysosporium* During Wood Decay. Appl. Environ. Microbiol. *57*: 1453-1460. 1991.
7. Effland, J. M. 1977. Modified Procedure to Determine Acid-Insoluble Lignin In Wood and Pulp. TAPPI. *60*(10) : 143-144
8. Els Moyson and Hubert Verachtert. Growth of Higher Fungi on Wheat Straw and their Impact on the Digestibility of the Substrate. Appl. Microbiol. Biotechnol. *36*:421-424. 1991.
9. Nerud, Z. Zouchová and Z. Misurcová. Ligninolytic Properties of Different White-rot Fungi. Biotechnology Letters. *13*(9):657-660. 1991.
10. Farrell, R. L., K. E. Murtag, M. Tien, y T. K. Kirk. Physical and Enzymatic Properties of Lignina Peroxidasa Isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*. Enzyme Microb. Technol. *11*:322-328. 1989.
11. Guillén and Ch. S. Evans. Anisaldehyde and Veratraldehyde Acting as Redox cycling Agents for H₂O₂ Production by *Pleurotus eryngii* Applied and. Environmental Microbiology. *60*(8): 2811-2817. 1994.

12. Higuchi, T. Lignin biochemistry Biosynthesis and Biodegradation. Wood Sci. Technol. 24:23-63. 1990.
13. Holzbauer, E. L. F., A. Andrawis, and M. Tien. Molecular Biology of Lignina Peroxidasa from *Panerochaete chrysosporium*. Molecular Industrial Micrology. Marcel Dekker, Inc. New York. 1:197-223. 1991.
14. Kimura, Y., Y. Asada, and M. Kuwahara. Screening of Basidiocyetes for Lignina Peroxidase Genes Using a DNA Probe. Appl. Microbiol. Biotechnol. 32:436-442. 1990.
15. Klein, B. and Weissman, M. New Colour Reagent for Determination of Glucosa in Blood Serum. Analytical Chemistry. 25(5):771-774. 1953.
16. Leisola, M., D. Ulmer, and A. Flechter. Problem of Oxygen Transfer During Degradation of Lignina by *Phanerochaete chrysosporium*. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 7:113-116.
17. Milstein, O., A. Haars, A. Majcheczyk. Removal of Chlorophenols and Chlorolignins from Bleaching Effluent by Combined Chemical and Biological Treatment. Water Sci. Technol. 20:161-170. 1988.
18. Plat, M. W., Y. Hadar, and I. Chet. Fungal Activities Involved in Lignocelulose Degradation by *Pleurotus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 20:150-154. 1984.
19. Ramirez C. Rebeca, y Leguizamo F. Silvia Victoria. Degradacion de Materiales Lignocelulosicos por *Volvarieta volvacea*. I. Escuela de Química. Universidad Motolinia A. C. 1984.
20. Tracey, M. V. Colorimetric Method for Determination of Pentoses in the Presence of Hexoses and Uronic Acids. Biochemical J. 47:433-436. 1950.
21. Sannia, G., P. Giardina, and M. Luna. Laccase from *Pleurotus ostreatus*. Biotechnology Letters. 8:797-800. 1986.
22. Sannia, G., P. Limongi, E. Coca, F. Buonocore and G. Nikl. Purification and Characterization of a Veratryl Alcohol Oxidase from the Lignin Degrading Basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. Biochim. Biophys. Acta 1073:114-119. 1991.
23. Waldner, R., M. S. A. Leisola, and A. Flechter. Comparison of Ligninolytic activities of selected white-rot fungi. Appl. Environ. Microbiol. 29:400-407. 1988.

24. Zadrazil, F., and H. Brunert. Solid State Fermentation of Lignocelulosa Containing Plant Residues With *Sporotrychum pulverulentum* Nov. and *Dichomitus squalens* (Krst.) Reid. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 16:45-51. 1982.
25. Zohar Kerem, Dana Frilesem, and Yitzhak Hadar. Lignocellulose Degradation During Solid-State Fermentation: *Pleurotus ostreatus* Versus *Panerochaete chrysosporium*. Applied and Environmental Microbiology. 58(4): 1121-1127. 1992.
26. Zadrazil, F. Straw and Other Fibrous by Products as Feed, 14. Developments in Animal and Veterinary Sciences. Elsevier Science Publishers B. V. Amsterdam 1984.