

T  
673

103860

03860



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD XOCHIMILCO

---

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

“Alternativas de suplementación en composta  
para la producción de *Agaricus bisporus* y su  
efecto en las actividades enzimáticas”

T E S I S  
(Idónea Comunicación de Resultados)  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS  
P R E S E N T A  
Ing. OSCAR ARCE CERVANTES

DIRECTOR  
DR. OCTAVIO LOERA CORRAL

ASESORES  
DR. HERMILO LEAL LARA  
DR. FRANCISCO CRUZ SOSA

MÉXICO, D.F. DICIEMBRE 2007

XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACIÓN  
ARCHIVO HISTÓRICO

## AGRADECIMIENTOS

*Primeramente a la vida por la benévola que ha sido conmigo, gracias por permitirme pertenecer a esta familia formada por mis mejores maestras, guías y amigos Margarita Cervantes y Venancia Arce, mis padres.*

*Así también a mis grandes hermanos y amigos Israel, Jesús y Venancia porque son parte importante de la culminación de esta etapa, gracias por su apoyo incondicional a lo largo de nuestras travesías.*



# ÍNDICE

RESUMEN.....	7
ABSTRACT.....	9
1 INTRODUCCIÓN.....	11
2 ANTECEDENTES.....	13
2.1 Ecología de <i>Agaricus bisporus</i> .....	13
2.2 Cultivo Comercial.....	15
2.2.1 Necesidades nutricionales del cultivo.....	15
2.2.2 Composta.....	16
2.2.3 Inoculación y propagación vegetativa.....	17
2.2.4 Cobertura e inducción.....	18
2.2.5 Cultivo y producción de carpóforos.....	19
2.3 Suplementación de la composta.....	20
2.3.1 Importancia de usar suplementos.....	20
2.3.2 Características de los suplementos.....	21
2.3.4 Tratamiento de los suplementos.....	22
2.3.5 Desarrollo de nuevos tipos de suplementos.....	22
2.4 Actividad enzimática.....	23
2.4.1 Enzimas lignocelulolíticas.....	23
2.4.2 Proteasas y Lipasas en <i>A. bisporus</i> .....	25
3 JUSTIFICACIÓN.....	27
4 HIPÓTESIS.....	28
5 OBJETIVOS.....	29
5.1 OBJETIVO GENERAL.....	29
5.2 Objetivos específicos.....	29
6 MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
6.1 Ccpa.....	30
6.2 Análisis de los ingredientes.....	30
6.2.1 Cenizas.....	30
6.2.2 Grasa cruda.....	30
6.2.3 Proteína cruda.....	31
6.2.4 Formulación de suplementos.....	32
6.3 Obtención de la composta y proceso de siembra.....	32
6.4 Diseño experimental.....	33
6.5 Variables de Producción.....	33
6.6 Obtención del extracto crudo enzimático.....	34
6.6.1 Determinación de Proteína soluble.....	34
6.6.2 Determinación de Celulasas.....	35
6.6.3 Determinación de Xilanasas.....	36
6.6.4 Determinación de Lacasas.....	36
6.6.5 Determinación de Proteasas.....	37
6.6.6 Determinación de Lipasas.....	37
6.7 Análisis estadístico.....	38

<b>7 RESULTADOS</b> .....	<b>39</b>
<b>7.1 Formulación de suplementos experimentales</b> .....	<b>39</b>
7.1.1 Suplementos experimentales basados en salvado .....	39
7.1.2 Composición de suplementos experimentales.....	40
<b>7.2 Producción de champiñones en compostas con diferentes suplementos</b> .....	<b>41</b>
7.2.1 Producción de champiñones (Experimento 1) .....	41
7.2.2 Producción de champiñones (Experimento 2) .....	42
<b>7.3 Evolución del contenido de proteína soluble y actividades enzimáticas</b> .....	<b>44</b>
7.3.1 Contenido de Proteína Soluble (Experimento 1).....	44
7.3.2 Contenido de Proteína Soluble (Experimento 2).....	44
7.3.3 Actividad total de Celulasas (Experimento 1).....	46
7.3.4 Actividad total de Celulasas (Experimento 2).....	46
7.3.5 Actividad total de Xilanasas (Experimento 1) .....	46
7.3.6 Actividad total de Xilanasas (Experimento 2) .....	48
7.3.7 Actividad total de Lacasas (Experimento 1) .....	48
7.3.8 Actividad total de Lacasas (Experimento 2) .....	48
7.3.9 Actividad de total de Proteasas (Experimento 1).....	51
7.3.10 Actividad de total de Proteasas (Experimento 2).....	51
7.3.11 Actividad de total de Lipasas (Experimento 1 y 2).....	51
<b>8 DISCUSIÓN</b> .....	<b>54</b>
<b>9 CONCLUSIONES</b> .....	<b>58</b>
<b>10 RECOMENDACIONES</b> .....	<b>61</b>
<b>11 REFERENCIAS</b> .....	<b>62</b>
<b>12 ANEXOS</b> .....	<b>70</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS

<b>Figura 1.</b> Ciclo de vida de basidiomicetos.....	14
<b>Figura 2.</b> Cuerpos fructíferos.....	15
<b>Figura 3.</b> Laminas de <i>Agaricus bisporus</i> .....	15
<b>Cuadro 2.3.2.</b> Características generales de suplementos en el mercado.....	21
<b>Cuadro 7.1.</b> Composición de ingredientes utilizados para la elaboración de suplementos.....	39
<b>Cuadro 7.1.1.</b> Formulación de suplementos experimentales a base de salvado con composición al suplemento comercial Rendiplus.....	40
<b>Cuadro 7.1.2.</b> Composición de suplementos experimentales.....	41
<b>Cuadro 7.2.1.</b> Producción de champiñón kg/m <sup>2</sup> con diferentes tipos de suplementos (Exp 1)....	43
<b>Cuadro 7.2.2.</b> Producción de champiñón kg/m <sup>2</sup> con diferentes tipos de suplementos (Exp 2)....	43
<b>Cuadro 7.3.1.</b> Contenido de proteína soluble (mg/gSS) durante el cultivo de <i>Agaricus bisporus</i> en compostas con suplementos basados en salvado (Exp 1).....	45
<b>Cuadro 7.3.2.</b> Contenido de proteína soluble (mg/gSS) durante el cultivo de <i>Agaricus bisporus</i> en compostas con suplementos basados en salvado (Exp 2).....	45
<b>Cuadro 7.3.3.</b> Actividad de celulasas (UI/gSS) durante el cultivo de <i>Agaricus bisporus</i> en compostas con suplementos basados en salvado (Exp 1).....	47
<b>Cuadro 7.3.4.</b> Actividad de celulasas (UI/gSS) durante el cultivo de <i>Agaricus bisporus</i> en compostas con suplementos basados en salvado (Exp 2).....	47
<b>Cuadro 7.3.5.</b> Actividad de xilanasas (UI/gSS) durante el cultivo de <i>Agaricus bisporus</i> en compostas con suplementos basados en salvado (Exp 1).....	49
<b>Cuadro 7.3.6.</b> Actividad de xilanasas (UI/gSS) durante el cultivo de <i>Agaricus bisporus</i> en compostas con suplementos basados en salvado (Exp 2).....	49
<b>Cuadro 7.3.7.</b> Actividad de lacasas (UI/gSS) durante el cultivo de <i>Agaricus bisporus</i> en compostas con suplementos basados en salvado (Exp 1).....	50
<b>Cuadro 7.3.8.</b> Actividad de lacasas (UI/gSS) durante el cultivo de <i>Agaricus bisporus</i> en compostas con suplementos basados en salvado (Exp 2).....	50
<b>Cuadro 7.3.9.</b> Actividad de proteasas (UI/gSS) durante el cultivo de <i>Agaricus bisporus</i> en compostas con suplementos basados en salvado (Exp 1).....	52
<b>Cuadro 7.3.10.</b> Actividad de proteasas (UI/gSS) durante el cultivo de <i>Agaricus bisporus</i> en compostas con suplementos basados en salvado (Exp 2).....	52

---

<b>Cuadro 7.3.11.</b> Actividad de lipasas (UI/gSS) durante el cultivo de <i>Agaricus bisporus</i> en compostas con suplementos basados en salvado (Exp 1).....	53
<b>Cuadro 7.3.12.</b> Actividad de lipasas (UI/gSS) durante el cultivo de <i>Agaricus bisporus</i> en compostas con suplementos basados en salvado (Exp 2).....	53
<b>Figura 4.</b> Curva estándar de celulasas.....	68
<b>Figura 5.</b> Curva estándar de xilanasas.....	69
<b>Figura 6.</b> Curva estándar de proteína soluble.....	70
<b>Figura 7.</b> Curva estándar de proteasas.....	71
<b>Figura 8.</b> Curva estándar de lipasas.....	71
<b>Figura 9.</b> Coeficiente de determinación entre producción y niveles de actividad de celulasas (Experimento 1).....	72
<b>Figura 10.</b> Coeficiente de determinación entre producción y niveles de actividad de celulasas (Experimento 2, 2° y 3er brote).....	72

## RESUMEN

El champiñón *A. bisporus* es un hongo saprofito que se cultiva comercialmente en un sustrato preparado con paja y pollinaza como ingredientes principales. La suplementación de la composta es una práctica común para el cultivo comercial de *A. bisporus*. Casi todos los productos desarrollados como suplementos se basan en considerar a la proteína como el componente principal. Un factor importante al adicionar suplementos es el que tienen que ser tratados para tener una liberación lenta de nutrientes a fin de lograr incrementar la producción en los últimos brotes y no sólo en el primer brote. A pesar de que los suplementos deben tener alto contenido de proteínas también contienen altos niveles de lípidos. Por lo tanto, los efectos benéficos de la suplementación no pueden ser solos atribuibles a la adición de proteínas. Por otra parte, los polisacáridos desempeñan un papel clave en la nutrición del micelio para la formación de los carpóforos, por lo que estos componentes deben considerarse en los distintos tipos de suplementos que deseen desarrollarse.

Para dilucidar esta cuestión se prepararon varios tipos de suplementos y se añadieron a la composta de champiñones en la etapa de siembra (3.3% peso seco), comparándose con la composta no suplementada y el suplemento comercial Rendi Plus (Rp) basado en soya quebrada, los cuales fueron preparados y aplicados según procedimientos establecidos, incluyendo la adición de un compuesto antifúngico. Los suplementos experimentales se hicieron con salvado de maíz (S), mezclas de salvado de maíz con gluten de maíz (SG), salvado de maíz con aceite de soya (SA) y con salvado de maíz con gluten de maíz y aceite de soya (SGA). Las mezclas se elaboraron a fin de que su composición final fuera similar a la soya quebrada, (25% de proteínas y / o 18.05% lípidos). Se siguieron procedimientos convencionales en la preparación del sustrato, suplemento, siembra y de manejos de cultivo. Por cada tratamiento, se sembraron y suplementaron con el material correspondiente 18 bolsas con 3 kg de composta de fase II. La producción de cuerpos fructíferos se registró en 3 brotes, donde los suplementos Rp y la mezcla de SGA mostraron una consistente producción mayor en los 3 brotes, pero notablemente más en el último brote, alcanzando una producción total acumulada superior a 34 kg/m<sup>2</sup>. Los tratamientos de S, SG, SA, registraron un aumento en la producción menor para el 2º y 3º brote, pero mostraron ser superiores en la producción total acumulada en comparación con el tratamiento de composta no suplementada. Durante el ciclo de cultivo se tomaron muestras de



composta al momento de siembra (día 0), a la formación de primordios (25 d), y al final del 1<sup>er</sup>, 2<sup>o</sup> y 3<sup>er</sup> brote (39, 48 y 60 d, respectivamente). Las muestras de sustrato se analizaron para ver los cambios en el nivel de proteína soluble y sus niveles de actividades enzimáticas (celulasas, xilanasas, lacasas, proteasas y lipasas, así como proteína soluble). Con respecto a los cambios en los niveles de actividad enzimática se encontró que las celulasas y lacasas son las enzimas que muestran una correlación con los valores de producción. Todos los tratamientos mostraron un comportamiento similar en cuanto a la actividad de lacasas; los valores máximos se detectaron a los 25 d (inducción a la formación primordios), la actividad disminuyó en las etapas de producción sin desaparecer completamente y vuelve a incrementarse al día 60 (Fin del 3<sup>er</sup> brote). En cuanto a la actividad de celulasas, ésta fue baja al momento de siembra y formación de primordios, pero todos los tratamientos mostraron los valores máximos en la etapa de mayor producción por cada brote, presentando una correlación positiva con los valores de producción y el incremento de la actividad. Del mismo modo, las actividades de xilanasas en todos los tratamientos mostraron su valor máximo de actividad después del primer brote, presentándose los valores mayores para los tratamientos Rp y SGA al final del tercer brote. La actividad de las proteasas no mostró correlación entre sus niveles y los valores de producción. La actividad de lipasas para todos los tratamientos a través de los cinco tiempos de muestreo fue menor a 1 UI/gSS, mostrando que esta actividad no fue importante para el crecimiento de *A. bisporus* bajo las condiciones analizadas.

Palabras clave: producción en *A. bisporus*, suplementación, actividades enzimáticas en sustrato

## ABSTRACT

The white bottom mushroom, *A. bisporus* is a saprophytic fungus which is commercially cultivated on a substrate prepared with straw and chicken manure as principal ingredients. Supplementation of substrates has been established as a common practice for commercial cultivation of *A. bisporus*. Almost all supplement products developed have been based considering protein ingredients as the main component. An additional factor is that supplements have to be treated for a delayed release of nutrients in order to achieve yield increases in later flushes and not only in the first break. It has been generally accepted that supplements should have high protein content, although they also usually contain high levels of lipids. Furthermore, the possibility that polysaccharides could be the key limiting nutrient instead of nitrogen has been postulated recently, thus these compounds play a key role in mushroom nutrition, a completely new type of supplements could be developed, with additional advantages to the conventional materials now available in the market.

In order to elucidate this issue various types of experimental supplements were prepared and added to mushroom compost at spawning stage (at 3% dry weight basis), comparing to both a non supplemented compost and to Rendi Plus (commercial Supplement) based on cracked soybeans. All these supplements were elaborated following conventional procedures and an antifungal compound was also added. Experimental supplements were prepared with corn bran alone (S), mixed corn bran with corn gluten (SG), corn bran with soybean oil (SA) and corn bran with corn gluten and soybean oil (SGA) altogether. Mixtures were elaborated so as to reach a final composition resembled that of cracked soybeans, i.e. 25 % protein and /or 18.05 % Lipids. Conventional procedures were followed regarding preparation of substrates, spawning and cultivation techniques. For each treatment, 18 bags containing 3 kg phase II compost, which were spawned and supplemented with the corresponding material. Bags were randomly allocated in a shelf of a production room in a commercial farm. Production of fruit bodies was recorded for the 3 first flushes.

Supplementation in compost proved essential for higher yields. Treatments based on Rp and SGA supplements achieved consistently higher production levels in all 3 flushes, reaching a total accumulated production higher than 34.1 kg/m<sup>2</sup>. Those treatments with S, SG, SA, showed lower yield increases for 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> flushes were registered. Samples of substrate (3 bags) were also

taken at the time of spawning, primordia formation (25 d) and at the end of the 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> flush. These samples were analyzed in order to monitor changes enzymatic activities (cellulases, xylanases, laccases, proteases and lipases, including also soluble protein). All treatments showed a similar behavior in regards to activity of laccases; maximal values were detected at 25 d (primordia formation), this activity decreased in subsequent production stages although it increased again after 60 d (final stage: 3<sup>rd</sup> flush). On the other hand cellulases, all treatments showed a similar behavior with maximal values after first flush. Cellulase activity lowered slightly after 2nd flush. This activity showed a positive correlation with those values regarding levels of fruiting bodies production. Similarly, xylanases values were higher after first flush for all treatments, whit the highest levels for Rp and SGA after third flush. Neither protease nor lipase activity showed any correlation with fruiting bodies production. In fact, lipase activity remained below 1 UI/gSS for all treatments along cultivation, thus this activity was not important for *A. bisporus* growth under those conditions analyzed.

Key words: production in *A. bisporus*, supplementation, enzymatic activities in substrate

# 1 INTRODUCCIÓN

La producción de hongos comestibles es una actividad con amplias perspectivas y una dinámica interesante. Los hongos más populares que se cultivan en el mundo son los del género *Agaricus*, *Pleurotus*, *Lentinus*, *Volvariella*, *Auricularia* y *Flammulina*, volumen en orden de importancia (Pandey, 2004). A nivel mundial, el champiñón *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach., es el hongo comestible más importante, con un nivel de producción superior a los 2 millones de toneladas métricas anuales (Martínez, *et al.*, 2007).

De acuerdo a Lahmann (2007), en Latinoamérica, México es el productor más importante de *A. bisporus* con más del 50% de la producción. La producción anual estimada por Martínez, *et al.*, (2007), asciende a 45,260 toneladas. Por otra parte el consumo de setas en los últimos años ha tenido a generalizarse presentando un interesante potencial de mercado (CCI, 2007). En el 2006 cerca del 49.4% de los consumidores urbanos compran hongos comestibles cultivados. (Martínez, *et al.*, 2007).

Dentro de las ventajas del cultivo comercial del champiñón, es que se maneja bajo un sistema ecológicamente controlado (Rinker, 1991), con el cual se aprovechan los desechos orgánicos sólidos derivados de la actividad agropecuaria, agroindustrial y forestal, cuya acumulación pueden ser un problema de contaminación (Aguilar, 2001). Comercialmente esta especie se cultiva habitualmente en un material compuesto básicamente de paja de trigo, cebada, mazorcas de maíz, sorgo, adicionado con abono de caballo, pollinaza, diversos tipos de harinas y yeso (Kenji *et al.*, 1994; De Groot *et al.*, 1998).

La composta que requiere para su crecimiento se puede separar en tres componentes principales: lignina, carbohidratos complejos (celulosa y hemicelulosa) y fuentes orgánicas de nitrógeno (Bonnen, 1994). Las fuentes de carbono utilizadas por el champiñón son de carácter lignocelulósico, durante el crecimiento vegetativo estos hongos producen diversas enzimas para degradar estos sustratos, entre ellas están las lacasas, para la degradación de la lignina; también se producen diversos tipos de celulasas y xilanasas para la degradación de celulosa y hemicelulosa (Whitford, 2000).

Para incrementar la producción las industrias champiñoneras utilizan diferentes materiales como suplementos. La aplicación de estos materiales orgánicos en la composta al momento de la inoculación (siembra), corresponde a una fase dentro del ciclo de cultivo en la cual se permite aumentar los nutrientes. (Randle, 1986). Los productos que se utilizan como suplementos consideran a la proteína como el componente principal (Schisler y Sinden 1962; Beyer y Muthersbaugh, 1996), dando como resultado un incremento en la producción, en su mayor parte en el primer brote y con un continuo declive en cada brote sucesivo. Sin embargo, varias líneas sugieren que el metabolismo del carbono es importante en el proceso de maduración del champiñón (Rinker, 1991; Vijay *et al.*, 2003; Dahlberg, 2004).

El siguiente trabajo plantea conocer cuál es la importancia de una fuente de polisacáridos de difícil asimilación (salvado de maíz), de una fuente de proteína (gluten de maíz), y presencia de lípidos (aceite de soya); incluyendo la combinación de éstas como suplementos para incrementar los rendimientos de *Agaricus bisporus*. Con el análisis de estos resultados se evaluó el comportamiento de estos suplementos frente a un suplemento comercial.

Es necesario demostrar bajo condiciones experimentales, similares a las prácticas de cultivo comercial, cómo estos ingredientes y sus mezclas, pueden incrementar la producción. Conociendo que *A. bisporus* es un basidiomiceto degradador secundario y productor de enzimas lignocelulolíticas (celulasas, xilanasas, lacasas), se planteó también la medición de actividades enzimáticas, responsables de la hidrólisis de estos compuestos, a lo largo del cultivo del hongo. Dada la fuente de proteína y lípidos se midieron los niveles de actividad de proteasas y lipasas durante el ciclo de cultivo, de manera que se correlacionaran los incrementos en la producción con los niveles de actividades enzimáticas.

## 2 ANTECEDENTES

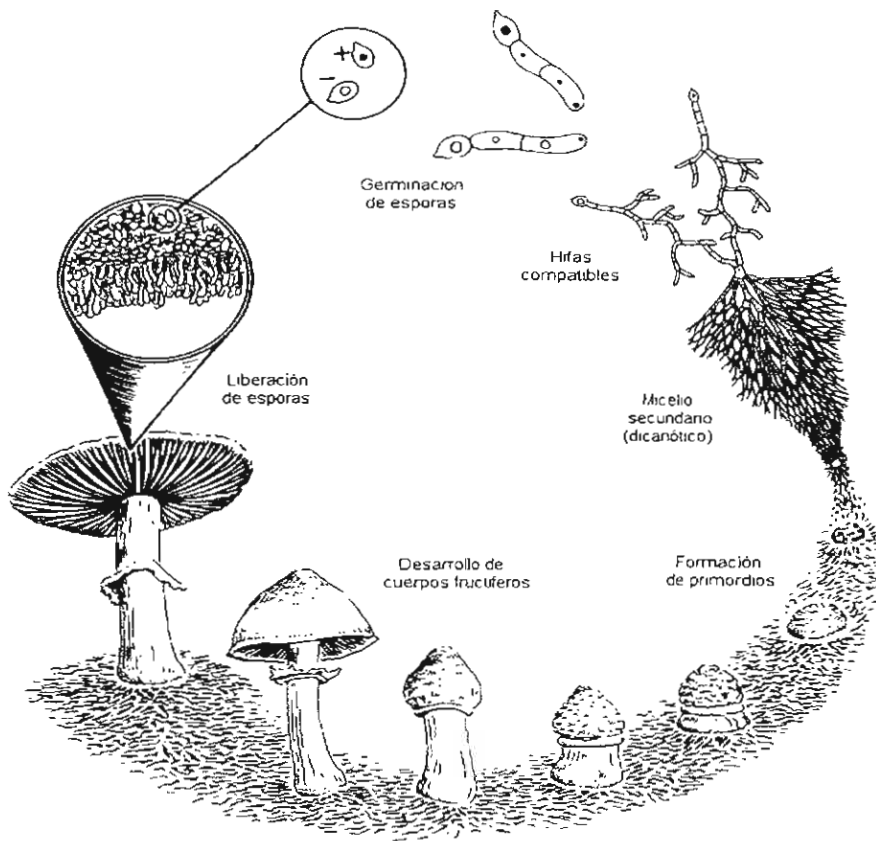
### 2.1 Ecología de *Agaricus bisporus*

Los hongos son organismos eucarióticos, portadores de esporas, aclorofilicos que se reproducen de forma sexual o asexual, y cuyas estructuras somáticas, ramificadas y filamentosas, están rodeadas por paredes celulares que contienen quitina o celulosa, o ambas sustancias, junto con otras muchas moléculas orgánicas complejas (Alexopoulos y Mims, 1985).

Las setas son generadas como órganos sexuales específicos en el micelio vegetativo, para su morfogénesis primero se forman nudos de hifas (nódulos primarios) en el micelio vegetativo, que se generan de agregaciones de hifas generativas con ramificaciones cortas, estas ramificaciones se agregan gradualmente entre si para formar una asociación miceliar esférica algodonosa de entre 1- 2 mm (nódulos secundarios o iniciales). Dentro de estos pequeños cuerpos hay una diferenciación celular y se establecen los primordios de cuerpos fructíferos que básicamente contienen todos los tejidos presentes en el cuerpo fructífero maduro (Fig 1). Una vez que los tejidos en el primordio se han establecido ya no hay división celular ahora las células crecen rápidamente en todas las direcciones generando un incremento en volumen en la producción (Kues, 2000).

Bajo el reino de los micetes (hongos), en la División *Amastigomicetes*, Clase *Basidiomicetes*, Orden *Agaricales*, se encuentran los hongos cuyo cuerpo fructífero recibe en general el nombre de setas (Guzmán, 1985). De la Familia *Agaricaceae* y género *Agaricus*, las especies de mayor importancia comercial son *A. brunnescens*, *A. bisporus* y *A. bitorquis* de los cuales existen varias cepas (Fiore y Albarracín, 1997).

En los *Agaricales* un cúmulo de hifas orientadas paralelamente emergen después de la maduración del estípite del hongo (estípite) sobre un tejido de plectenquima, el sombrero del hongo (pileo) se desarrolla de la región inicial del tejido (prosénquima), la parte superior es origen del pileo y la parte baja forma un anillo de células ricas en glicógeno que definen el límite entre el himenio (capa celular productora de esporas) llamada también láminas y el estípite (Kues, 2000).



Fuente: Stamets, 1993

Fig 1. Ciclo de vida de los basidiomicetos

Las especies del género *Agaricus* suelen producir un basidiocarpo con un sombrero de blanco a pardo, o pardo gris (Fig 2), láminas libres, con anillo pero sin volva y pie que se separa fácilmente del sombrero., las láminas pueden ser de color claro, pero al final oscurecen, tomando el color de las esporas maduras, pardo chocolate (Fig 2a) (Alexopoulos y Mims, 1985). En un basidiocarpo joven el tejido himenial se diferencia en forma rudimentaria de domo (Moore, 1998).



Fig 2. Cuerpos fructíferos



Fig 2. Laminas de *A. bisporus*

Los únicos organismos descritos con la capacidad de degradar y mineralizar la lignina son un grupo de basidiomicetos causantes de la pudrición blanca, en su mayoría son de la orden de los *Agaricales*, estos hongos poseen un grupo de enzimas oxidasas que catalizan las primeras reacciones que rompen uniones dentro de la compleja molécula de la lignina (Papinutti *et al.*, 2003).

El hongo comestible *A. bisporus* es un hongo saprofito que no pertenece a los llamados de pudrición blanca, pero presenta enzimas extracelulares ligninolíticas (lacasas) que degradan a la lignina, facilitando que el organismo utilice la holocelulosa (celulosa y hemicelulosa) de la paja fermentada (composta) (Rimko *et al.*, 2003).

## 2.2 Cultivo Comercial

### 2.2.1 Necesidades nutricionales del cultivo

El champiñón es un degradador secundario que depende en su alimentación de sustancias orgánicas disponibles, ya que no puede formar por sí mismo todos los hidratos de carbono que forman parte de su estructura. Los hongos están considerados generalmente como quimiheterótrofos estrictos, son incapaces de fotosintetizar y por consiguiente necesitan sustratos ricos para alcanzar sus requerimientos de energía y biomasa (Wainwright, 1995).

En lo referente al consumo de hidratos de carbono durante la constitución del micelio, debe de tenerse presente que se utiliza en especial mucha lignina, mientras que en la formación del cuerpo reproductor se necesitan grandes cantidades de celulosa y pentosas. Las necesidades de proteínas se cubren a expensas de los microbios muertos y del complejo humus-lignina (Hellmut, 1987).



El micelio del champiñón a diferencia de lo que sucede con los hongos competidores, aprovecha muy bien los carbohidratos difíciles de hidrolizar, además las vitaminas producidas por los microorganismos estimulan el desarrollo del micelio de los champiñones, en el desarrollo de *A. bisporus* parece revestir importancia la incorporación de vitaminas a la composta (ácido pantoténico, ácido nicotínico, aneurina y biotina) que son producidos por la acción de los microorganismos que descomponen la celulosa del sustrato (Hellmut, 1987).

### 2.2.2 Composta

Se puede definir a la composta para el cultivo del champiñón como un complejo ligno-celulósico de tipo húmico rico en nitrógeno, debe ser un medio selectivo, el cual, no debe favorecer el desarrollo de otros organismos (Van Griensven, 1988). Este composteo es una oxidación biológica exotérmica de la materia orgánica llevada a cabo por una sucesión dinámica y rápida de poblaciones microbianas aerobias. La materia orgánica heterogénea inicial, es transformada, a través de fases biooxidativas y de maduración, en un producto final estabilizado a través de su mineralización y humidificación (Kenji *et al.*, 1994; García *et al.*, 1997).

El proceso se divide en dos fases, la fase I es el paso donde las materias primas son mezcladas, humedecidas y apiladas (Royse, 2007a), implica el desdoblamiento aeróbico de los materiales crudos, y posteriormente, en la fase II se pasteuriza y acondiciona (una fermentación en la que se controla la temperatura, la aireación, la concentración de algunos gases y la humedad) para obtener al final un medio de crecimiento selectivo para el crecimiento del champiñón (Sánchez *et al.*, 2004; Royse, 2007a).

Aunque la materia orgánica en descomposición presenta poblaciones microbiológicas autóctonas que pueden realizar el proceso de composteo, es una práctica común adicionar inóculos como abono de caballo o pollinaza (fuente de nitrógeno) para acelerar el proceso de composteo (Kenji *et al.*, 1994; Vázquez *et al.*, 1997). En el composteo resultan desdoblados en primer lugar los carbohidratos de fácil descomposición, mientras que las fracciones más estables, como la lignina, permanecen íntegras. Por lo que, en el curso de la preparación de la composta se produce una concentración selectiva de nutrientes para el crecimiento y desarrollo del champiñón. Además durante el proceso de composteo se incluye una parte del nitrógeno en la lignina, originándose así

el complejo humus-lignina, rico en nitrógeno (Hellmut, 1987). Al mencionar sustrato selectivo se contempla que los compuestos requeridos por champiñón incluyen (Gerrits, 1986; Gea, 1997):

- Agua: ya que alrededor del 92% del champiñón está formado por agua, esta sustancia la toma principalmente de la composta y en menor medida de la tierra de cobertura.
- Fuentes de carbono: como la celulosa, hemicelulosa y lignina, sustancias que están presentes en la composta.
- Fuentes de nitrógeno: sustancias como proteínas, aminoácidos y ácidos nucleicos, pero también ácido úrico, ureas y amoniac, que se encuentran en varios tipos de estiércoles. Los champiñones no son capaces de absorber nitratos, el amoniac gaseoso ( $\text{NH}_3$ ) es perjudicial pero el nitrógeno amoniacal ( $\text{NH}_4^+$ ) sí puede ser absorbido. Una gran parte del nitrógeno que necesitan los champiñones puede ser suministrado por la lignina después del composteo, en lo que se conoce como complejo lignina - humus rico en nitrógeno.
- Vitaminas: como la tiamina y biotina.
- Minerales: fósforo, azufre, potasio, calcio y magnesio, en pequeñas cantidades cobre, zinc, manganeso y molibdeno.

Por regla general estos últimos están presentes en cantidades suficientes en la composta y están en cantidades abundantes en casi toda la paja de trigo y abonos. Es importante mencionar que toda la materia prima empleada para la elaboración de composta, pueden ajustarse y combinarse de tal manera que se obtenga un porcentaje entre 1.6%-1.8% de Nitrógeno sobre peso seco a la siembra (Vedder, 1996).

Si todo el proceso de composteo se ha realizado correctamente, al final se obtendrá una composta con las siguientes características: pH de 7.3 ( $\pm 0.2$ ); humedad de 66% ( $\pm 3\%$ ); nitrógeno total de 2.05% ( $\pm 0.15\%$ ); materia orgánica de 73% ( $\pm 3\%$ ); cenizas de 27% ( $\pm 3\%$ ); relación carbono/nitrógeno (C/N) 19 ( $\pm 1$ ); libre de amoniac residual, de parásitos y competidores (Roysc *et al.*, 1982; Gea, 1997).

### **2.2.3 Inoculación y propagación vegetativa**

La semilla consiste en un grano esterilizado u otro material apropiado que es colonizado por el micelio del hongo y usado para sembrar en la composta. La semilla es producida generalmente con un cultivo puro de una cepa de la variedad que ha sido desarrollada y seleccionada por sus

características productivas. Estas características deben incluir la productividad, el color del pileo, resistencia a enfermedades, textura, etc. En la actualidad existen empresas dedicadas a la propagación de semillas de *A. bisporus*, la cepa más utilizada en las champiñoneras es un híbrido blanco que fue desarrollado en los años de 1980, llegando a dominar la industria en el mundo (Royse, 2007a).

La semilla seleccionada debe ser mezclada cuidadosamente con la composta de manera que todos los puntos de inóculo estén distribuidos lo mejor posible por toda la masa de la composta. La tasa de semilla que se utiliza en la siembra es de alrededor del 1% del peso fresco del sustrato (Gea, 1997). Es una práctica común para algunas empresas que al momento de la inoculación, simultáneamente mezclen algún tipo de suplemento, generalmente es a base de soya, una vez realizadas las operaciones de siembra, suplementado y envasado, los sacos o bloques se trasladan a los cuartos de cultivo en donde tiene lugar la incubación, en donde, es importante el control de la temperatura, la humedad y la concentración de CO<sub>2</sub> durante la incubación para alcanzar una producción máxima de hongos (Gea, 1997; Royse 2007a). Las propiedades de los suplementos se describen más adelante.

#### 2.2.4 Cobertura e inducción

El champiñón a lo largo de su ciclo de cultivo pasa por diferentes fases, en cada una de ellas existen diferencias significativas en la temperatura, el contenido de dióxido de carbono, la humedad relativa y la velocidad del aire. Cuando se realizan de forma correcta y oportuna, permiten obtener el máximo rendimiento de composta sobre superficie (kg/m<sup>2</sup>). Una composta totalmente invadida con micelio de *A. bisporus* necesita en recubrimiento superior (tierra de cobertura) sobre el cual se desarrollarán los cuerpos fructíferos, es importante que esta capa se homogénea y se considera un espesor apropiado de 2 a 4 cm (Fiore y Albarracín, 1997; Gea, 1997).

De acuerdo con Wuest y Beyer (1996); Van Griensven (1988), la tierra de cobertura debe cumplir varias funciones como:

- Soporte físico donde se desarrollaran los carpóforos.
- Proteger la superficie de la composta de la desecación.

- Absorber gran cantidad de agua, actuando como reservorio, contiene y favorece los factores que inducen la fructificación (gradiente del contenido del CO<sub>2</sub>, cambio del microclima, bacterias estimuladoras – *Pseudomonas putida*, *P. fluorescens* y *P. aeruginosa* - y baja conductividad eléctrica),
- Proporciona un ambiente aireado al micelio, permitiendo el intercambio gaseoso.
- pH ligeramente alcalino, entre 7.4 y 7.6

Adicionalmente a estas características, Gea, (1997) agregó parámetros físicos, químicos y biológicos:

- Estructura porosa y textura abierta, que favorece el intercambio gaseoso entre la composta y el microclima del cuarto de cultivo.
- Presencia de calcio para neutralizar el ácido oxálico segregado por el micelio.
- Estar libre de agentes patógenos.

Después de 7 a 9 días de haber puesto la tierra de cobertura, tiene lugar la aparición del micelio en la superficie de la tierra, momento que se aprovecha para dar paso a la formación de los carpóforos, deteniendo el crecimiento vegetativo del micelio e induciendo la etapa de fructificación. Esta se logra variando las condiciones climáticas del cuarto de cultivo como el aumento en la ventilación, al tiempo que se mantiene la humedad relativa próxima al 90% (Gea, 1997).

#### **2.2.5 Cultivo y producción de carpóforos**

Varios son los factores que tienen un impacto en la producción de champiñones. Estos factores incluyen cepa, condiciones ambientales (temperatura, humedad, concentración de CO<sub>2</sub>) plagas y enfermedades, tierra de cobertura, humedad, sanidad y una buena calidad de la composta (Weil *et al.*, 2004). Esta calidad se refiere a los requerimientos que una composta selectiva y nutricionalmente suficiente que se debe proporcionar para el crecimiento y fructificación de *A. bisporus* (Petrenko *et al.*, 2004).

Finalmente, cuando se obtienen los cuerpos fructíferos se llega a la etapa de cosecha. Este periodo de corte no es conveniente tenerlo demasiado tiempo porque se puede convertir en un

foco de infección del mismo cultivo (hongos, nemátodos, moscas, etc) (Rimko *et al.*, 2003). Por lo general, el 70% de la producción total se recoge en los tres primeros brotes (Vedder, 1996).

## 2.3 Suplementación de la composta

### 2.3.1 Importancia de usar suplementos

El uso de suplementos en la industria champiñonera se inició a principios de 1960 cuando se observó que la producción aumentaba hasta en un 10% cuando la composta era suplementada con materiales ricos en proteína y lípidos. Sin embargo, el sobrecalentamiento y la estimulación de mohos competidores en la composta reducían drásticamente los efectos positivos de tales suplementos (Royse *et al.*, 1982; Gerrits, 1986; Vijay *et al.*, 2002).

De esta forma la aplicación de suplementos orgánicos en la composta al momento de la siembra (inoculación), con diferentes materiales ricos en fuentes de proteína y lípidos solo aumentaba la producción en su mayor parte en el primer brote, teniendo un continuo declive en cada brote sucesivo. (Schisler y Sinden, 1962; Randle, 1986; Beyer y Muthersbaugh, 1996; Petrenko *et al.*, 2004).

En la década de 1970 se desarrolló la suplementación de liberación lenta de nutrientes, consiguiendo un incremento hasta de un 60% en la producción cuando el suplemento era desnaturalizado parcialmente con formaldehído (Royse *et al.*, 1982; Gerrits, 1986; Vijay *et al.*, 2002). De acuerdo a Carrol y Schisler (1976), Beyer y Muthersbaugh (1996), es prerequisite de cualquier suplemento el retrasar la liberación de nutrientes para que pueda incrementar la producción en todos los brotes.

Desde la introducción de los primeros productos como suplementos en la industria de los champiñones se ha investigado qué tipo de materiales resultan más favorables. En la composta los requerimientos de nutrientes pueden ser cubiertos por un complejo rico en proteína-lípidos al momento de siembra (Schisler y Sinden, 1962; Beyer y Muthersbaugh, 1996). Esta composta suplementada con formas solubles de fósforo pueden suministrar nutrientes de forma limitada para *A. bisporus* originando una mejor producción en los últimos brotes (Beyer y Muthersbaugh, 1996).

Hellmut (1987), Rinker (1991); Vijay *et al.* (2002); Dahlberg (2004), sugieren que el metabolismo del carbono es importante en el proceso de maduración del champiñón debido a la acción de enzimas hidrolíticas durante el periodo de cultivo.

### 2.3.2 Características de los suplementos

Actualmente se encuentran en el mercado mareas comerciales de nutrientes de liberación lenta, vendidos por muchas compañías productoras de semilla y de suplemento (Cuadro 2.3.2). Prácticamente todos los cultivadores de champiñones suplementan sus cultivos con estos nutrientes disponibles en el mercado con un variado contenido de proteína y de grasa (Wach y Wheeler, 1998).

**Cuadro 2.3.2 Características generales de suplementos en el mercado**

Producto	Ingrediente	Proteína (%)	Aceite (%)	Nivel de suplementación %
CS36*	Soya quebrada	36	17	3 -5
CG60*	Gluten de maíz	60 - 62	17	1.5 – 2.5
XCel55*	Harina de soya	55	3.5	2.5 – 3.5
Promycel gold+	NE	54	NE	3
Promycel Target	NE	48	NE	3
CGGold+	Gluten	56	NE	NE

El nivel de suplementación corresponde a composta base seca. NE= No específica (\*Sylvan®, 2007, + Amycel®, 2007).

Para realizar una suplementación adecuada en la composta es de especial importancia la calidad de ésta, el uso de suplementos en la composta puede originar un efecto no positivo en la producción, debido a cambios químicos y físicos en el sustrato ocasionando una escasa colonización del sustrato y por consiguiente bajas producciones. Estos suplementos son generalmente ricos en carbohidratos, proteínas y lípidos los cuales pueden favorecer el crecimiento de varios mohos competidores (Vijay *et al.*, 2002). Aunque existen otros factores limitantes y responsables de bajas producciones además de las contaminaciones y el agotamiento de los nutrientes, como puede ser la acumulación de metabolitos tóxicos en la composta y el tiempo de cultivo del champiñón (Beyer y Muthersbaugh, 1996).

Las características de los suplementos en la etapa de formulación, acondicionamiento e incorporación de suplementos está basado a lo recomendado por Gerrits (1986) y Rinker, (1991), quienes evaluaron el efecto de diferentes suplementos en la composta. encontrando que durante la siembra o al colocar el material de cobertura son momentos convenientes para mejorar la nutrición del cultivo e incrementar la producción de champiñones, estos autores también mostraron que los materiales no tratados e incorporados en la siembra pueden reducir la producción, de ahí la importancia del tratamiento de los ingredientes.

### **2.3.3 Tratamiento de los suplementos**

Dadas las características de los suplementos se pueden favorecer el crecimiento de varios mohos competidores, principalmente *Trichoderma*, *Aspergillus* y *Penicillium*, los cuales ocasionan un gran daño al cultivo. Los suplementos tienden a ser pre-tratados para desnaturalizar parcialmente las proteínas resultando en una lenta liberación del nutriente, de esta manera se reduce el sobrecalentamiento de la composta mientras el micelio del hongo coloniza la composta (corrimiento) (Carrol y Schisler 1976; Randle, 1986; ; Vijay *et al.*, 2002). Este tratamiento, generalmente con formaldehído, reduce susceptiblemente la incidencia de competidores, debido a que inmediatamente se restringe la disponibilidad de nutrientes

Stoller (1979) atribuye el incremento de la producción, ha que al ser tratados los suplementos con formaldehído se tiene control sobre los mohos competidores presentes en la composta. Randle (1986), suplementó al 5% con un producto vegetal rico en proteínas (Betamyl 1000R), tratado con formaldehído, encontrando un incremento del 10% en la producción, señalando la importancia de una composta selectiva de calidad para evitar la presencia de mohos competidores.

### **2.3.4 Desarrollo de nuevos tipos de suplementos**

Según lo mencionado por Beyer y Muthersbaugh (1996), Petrenko *et al.* (2004), en la producción de champiñones es importante el buscar fuentes nutricionales alternas que puedan ser efectivas en el incremento de la producción en todos los brotes. Como ventaja adicional al distribuir la producción en todos los brotes se logra mejorar la calidad en los trabajos de cosecha y mejora el

canal de comercialización, sin deterioro de la calidad y cantidad del producto en fresco (Beyer y Muthersbaugh 1996).

La disponibilidad de nutrientes es especialmente importante durante la fructificación, cuando la cantidad de nutrientes ha decrecido con respecto a la concentración inicial (Petrenko *et al.*, 2004). Dadas las propiedades de *A. bisporus* como productor de enzimas lignocelulolíticas es posible evaluar materiales con alto contenido de polisacáridos (salvado de maíz) como ingrediente principal en la formulación de nuevos suplementos. Sin embargo, la importancia de la fuente de proteína y lípidos (Schisler y Sinden, 1962; Beyer y Muthersbaugh, 1996) en los suplementos representa un punto partida y de control para el desarrollo de nuevos materiales. Por lo que en los ingredientes propuestos se debe de utilizar materiales con proteína (gluten de maíz) y lípidos (aceite de soya). La mezcla de estos materiales debe proporcionar características similares en el contenido de proteína y lípidos de suplementos comerciales, generalmente formulados a base de frijol de soya quebrada.

Es importante para la evaluación de suplementos decidir el nivel de suplementación y contenido de proteína a suplementar, se consideran la calidad de la composta, un suplemento con alto contenido de proteína y bajo en grasa puede tener un beneficio mayor en rendimiento pero puede ser el último en perdonar una calidad pobre en la composta y una inadecuada capacidad de manejo de aire, suplementos con bajo contenido de proteína y bajo contenido de grasa puede ser más conveniente para ambientes de cultivos con menor capacidad de manejo de aire (Royse, 2007a).

## **2.4 Actividad enzimática**

### **2.4.1 Enzimas lignocelulolíticas**

Después de la etapa de composteo, el sustrato se conforma de dos componentes principales, la fracción lignocelulósica y la biomasa microbiana (Bonnen, 1994; De Groot *et al.*, 1998). Los basidiomicetos cultivados en presencia de algunos materiales lignocelulósicos estimulan la secreción de enzimas indistintamente de la suplementación del medio (Kapich *et al.*, 2004; Vladimir *et al.*, 2006).



El micelio de *A. bisporus* producen en la composta un rango amplio de enzimas extracelulares capaces de degradar sustratos lignocelulosicos en sustancias solubles, la combinación de estas actividades enzimáticas son las responsables de degradar los complejos polimeros que se encuentran en la composta (lignina, celulosa, hemicelulosa y proteína), estas enzimas son predominantemente hidrolasas (Wood y Fermor, 1981; Baldrian y Gabriel, 2003).

La hidrólisis enzimática de la celulosa es lenta debido a su asociación con la lignina (Álvarez *et al.*, 1992). La acción enzimática catalizada por las celulasas de los hongos para llevar a cabo la hidrólisis implica la operación secuencial y sinérgica de diferentes tipos de celulasas, que presentan diferentes tipos de enlace y difieren de su acción específica (Braverman, 1980; Chacon 2005). En la composta del champiñón se encuentran un grupo de celulasas (endocelulasas), las cuales a partir de hidrolizar la celulosa proporcionan azúcares (glucosa y celobiosa) que son asimilables para el micelio de *A. bisporus* (Wood y Fermor, 1981).

Las xilanasas son otro grupo de enzimas extracelulares de los hongos comestibles presentes en la composta, utilizan como sustrato el xilano, el cual es el segundo polímero más importante en las pajas. La conversión enzimática del xilano dentro de azúcares asimilables requiere de la acción concertada de varias enzimas de este grupo (De Groot *et al.*, 1998; Qinghe *et al.*, 2004).

De acuerdo Whiteford *et al.*, (2000), la actividad de las xilanasas (endoxilanasas) en la composta se incrementa durante el estadio de primordios (botón), en el desarrollo del cuerpo fructífero y decrece después de que los champiñones son cosechados, la producción de otra enzima perteneciente a esta familia (beta-xilosidasas) difiere pues solo son detectadas durante el desarrollo del primordio, por lo que algún tipo de xilanasas se encuentra presente durante la etapa de fructificación o cuando existen fuentes de carbono como la celulosa o el xilano, pero no hay actividad con azúcares como la glucosa y xilosa.

Las lacasas forman parte de un complejo enzimático utilizado por los hongos degradadores de la madera para degradar a la lignina (Díaz *et al.*, 1995). La actividad de estas polifenol oxidasas se correlaciona directamente con el momento del desdoblamiento y mineralización de la lignina en

la composta, por lo que al crecimiento del micelio la lacasa es la proteína extracelular predominante que produce *A. bisporus* (Turner, 1974; Wood, 1980; Bonnen *et al.*, 1994; Rimko *et al.*, 2003).

Leonard (1971) demostró que la actividad de las fenol oxidasas están estrechamente relacionadas con la formación de los cuerpos fructíferos, presentando una actividad inductora a la fructificación. De acuerdo a Salmons (2005), en función del sustrato lignocelulósico utilizado las lacasas están asociadas con una rápida adaptación del hongo *Pleurotus* spp a un nuevo sustrato, así como a la producción de metabolitos que impiden o reducen la competencia de mohos antagonistas. Randle, (1986) evaluó que la actividad de las lacasas en *A. bisporus* se incrementa favorablemente en respuesta a la suplementación de la composta.

#### **2.4.2 Proteasas y Lipasas en *A. bisporus***

En el basidiomiceto *Flammulina velutipes* la actividad de proteasas esta relacionada con la formación y elongación de los cuerpos fructíferos (Chao y Hans, 1987). El micelio de *A. bisporus* mostró que puede producir proteasas extracelulares cuando crece sobre una variedad de sustratos que contienen fuente de proteína (Leake y Read, 1990), la proteína es la fuente más abundante de nitrógeno disponible para el organismo en la composta, en forma de ligno-proteína y proteína microbiana (Moore y Chiu, 2002). Esta actividad de proteasas puede tener varios roles a través del ciclo de cultivo (Burton *et al.*, 1994).

La actividad de las proteasas en la composta es esencial para suministrar aminoácidos (Wood y Fermor, 1981), para inactivar selectivamente fases de crecimiento, donde las proteínas no son requeridas para el desarrollo y por la activación y modificación de las enzimas involucradas en las síntesis de la pared celular (Deshpande, 1992).

Las lipasas son un grupo de enzimas que hidrolizan enlaces ester de ácidos grasos (Moore *et al.*, 1998; Bozom *et al.*, 1999). La producción de lipasas extracelulares en el micelio de *A. bisporus* se presenta al degradar y metabolizar bacterias muertas (incluyendo pared celular, proteína, ácidos nucleicos y lípidos) presentes en la composta, en componentes solubles (Wood y Fermor, 1981). En cultivos fermentados la mayor parte de lipasas son producidas en fases estacionarias (es una actividad metabólica secundaria) (Moore *et al.*, 1998).

La adición de aceite en composta utilizada en la producción de hongos comestibles es debido a que se encontró que el ácido linoleico como principal fuente de grasa en composta es un lípido estimulador en la producción (Royse *et al.*, 1982;). De acuerdo a Gayosso (2005), en el hongo *Pleurotus* (Basidiomiceto de pudrición blanca) observó que los lípidos estimulan el crecimiento micelial y favorecen la formación de cuerpos fructíferos. Sin embargo, la adición de aceite vegetal en el sustrato no incrementa la producción significativamente, esto estará más en función del tipo de suplemento, el nivel de suplementación, el tratamiento de los materiales y la cepa utilizada. Al adicionar altos niveles de aceite vegetal en el sustrato se observó una baja producción ya que esta asociado con una contaminación por *Trichoderma* spp. (Royse *et al.*, 1991).

### 3 JUSTIFICACIÓN

El desarrollo de nuevos suplementos en la industria de los champiñones es una necesidad constante en el proceso de producción. Sin embargo, en gran medida la suplementación se basa en productos comerciales sin explorar alternativas viables que no disminuyan la producción y el rendimiento biológico de este proceso. Debido a las propiedades lignocelulolíticas de *A. bisporus*, es factible buscar materiales orgánicos alternos que puedan ser utilizados como suplementos, dentro de estos materiales se considera a los ingredientes con alto contenido de polisacáridos como una opción en la formulación de nuevos suplementos. Tomando en cuenta que un sustrato selectivo debe evitar la incidencia de organismos competidores, que mermen la producción, la calidad y sanitización de los materiales propuestos para suplementar deben de mantener la disponibilidad racional de nutrientes en el cultivo. La propuesta de nuevos suplementos debe mostrar las ventajas contra preparaciones comerciales ya probadas como ingredientes importantes en la suplementación. Estos suplementos comerciales son ricos en proteínas y lípidos, por lo que cualquier alternativa tendría que tener estos nutrientes en su formulación (proteína y lípidos).

## 4 HIPÓTESIS

A partir del análisis bromatológico de un suplemento comercial, es posible formular sustitutos de cada fracción a partir de materiales alternos sin detrimento en los rendimientos del proceso.

## 5 OBJETIVOS

### 5.1 OBJETIVO GENERAL

Comparar los rendimientos de champiñón fresco usando un suplemento comercial y suplementos alternos.

### 5.2 Objetivos específicos

- Realizar un análisis químico proximal de los materiales a utilizar.
- 
- Elaborar balances de fórmulas para realizar mezclas con salvado de maíz, gluten de maíz y aceite de soya.
- 
- Determinar el rendimiento en  $\text{kg/m}^2$  de champiñón fresco con las diferentes mezclas de suplementación.
- 
- Medir los niveles de actividad enzimática producidas en la composta con diferentes mezclas de suplementación.

## 6 MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Ceba

En el presente trabajo, se utilizó la cepa Hauser A15 de Sylvan® del hongo comestible *Agaricus bisporus*, que crece sobre sustratos selectivos, inoculada en semilla de trigo estéril para su comercialización. Es un híbrido de crecimiento rápido (reduce tiempo en incubación), produce champiñones con sombrero bien definido, de medio y gran tamaño (blanco), velo fuerte y provee mejor vida de anaquel. Proporcionada por la empresa de Champiñones El Encinal S.A de R.L.

### 6.2 Análisis de los ingredientes

#### 6.2.1 Cenizas

Para la preparación de los suplementos se realizó un análisis químico proximal de los ingredientes utilizados: quebrado de soya o suplemento comercial, salvado de maíz y gluten de maíz. Se determinó el contenido de cenizas colocando 2 g de muestra en un crisol a peso constante, la muestra se carbonizó sobre una flama de mechero hasta que dejó de desprender humos y se calcinó durante 24 h en una mufla a 500° C, se pasó a un desecador 30 min, finalmente se pesó (AOAC, 1980).

#### 6.2.2 Grasa cruda

Para la determinación de extracto etéreo o grasas cruda (AOAC, 1980), se pesaron 2 g de muestra molida en papel filtro (Watman No.1) que posteriormente se doblo para obtener la muestra. En una balanza analítica se pesaron vasos Golfish tomados con pinzas de sujeción de un desecador. Utilizando un papel secante se colocó el portacartucho (con la muestra) en la abrazadera del equipo Golfish. El vaso (previamente pesado) se sacó del desecador y se le adicionó éter de petróleo (un cuarto de su capacidad), hecho esto, se colocó en el equipo cuidando la circulación del agua refrigerante. Durante 4 h (tiempo de extracción) se observó el goteo del condensado, manteniendo los niveles de éter. Posteriormente se retiró el cartucho colocando el vaso nuevamente en el equipo cuidando que se evaporara el éter para evitar quemar la grasa. Finalmente, el vaso con la grasa se colocó en el desecador y se metió a un horno a 80°C durante 5 min, nuevamente se colocaron en el desecador para registrar el peso.

Los cálculos se realizaron de acuerdo a la siguiente expresión:

Peso del vaso con grasa (g) – Peso del vaso vacío (g) = Peso de la grasa

$$\% \text{ de Grasa base seca} = \frac{\text{Peso de la grasa (g)} * 100}{\text{Peso de la muestra (g)}} =$$

### 6.2.3 Proteína cruda

Para determinar el nitrógeno presente en los materiales se utilizó el método de Kjeldahl (AOAC, 1980), en donde el contenido de nitrógeno es convertido en sales de amonio por la digestión de la muestra con ácido sulfúrico concentrado. Para la digestión de la muestra se colocó 1 g de muestra en matraces Kjeldahl, adicionando 10 g de mezcla catalizadora (sulfato de cobre – sulfato de potasio), 25 mL de ácido sulfúrico concentrado y 5 perlas de vidrio. La digestión se realizó hasta que la solución adquirió un verde transparente brillante. Por otro lado, se colocó en un matraz Erlenmeyer 30 ml de ácido bórico al 4% y 3 gotas de indicador de proteínas (rojo de metilo), a continuación, se colocó el matraz en el tubo colector. Se adicionó al matraz Kjeldahl, 300 mL de agua destilada, granulos de zinc y 100 mL de Hidróxido de sodio al 33%.

Realizada la preparación se conectó el matraz Erlenmeyer al refrigerante del destilador, se agitó lentamente y se encendieron las parrillas. Una vez completa la destilación se tituló con HCl 0.1 N hasta que la solución viró a color rosa. Los cálculos se realizaron como se indica a continuación:

$$\% \text{ de nitrógeno} = \frac{(V)(N)(\text{meq. N})(100)}{\text{Peso de la muestra (g)}}$$

Donde:

V = volumen (mL) gastado de HCl

N = normalidad del HCl

meq = miliequivalentes de nitrógeno

El contenido de proteína cruda se determinó multiplicando el porcentaje de nitrógeno por el factor 6.25 (conversión de nitrógeno a proteína).



#### 6.2.4 Formulación de suplementos

Se realizó la formulación de mezclas de acuerdo a los valores de proteína y grasa que reportaron los ingredientes propuestos, esto con el fin de obtener composiciones similares al tratamiento control o suplemento comercial Rendi plus (Rp), el cual está basado en el quebrado de soya. Las mezclas se estandarizaron a 25 % de proteína y 18.05 % de aceite. Los ingredientes propuestos se sometieron a un tratamiento de esterilización siguiendo las normas de preparación y desinfección de la empresa. Se preparó suplemento suficiente para realizar el experimento por duplicado en diferentes fechas: de diciembre 2006 a febrero 2007 y de febrero a abril de 2007.

#### 6.3 Obtención de la composta y proceso de siembra

Se marcaron bolsas pequeñas por tipo de suplemento y se pesaron 32 g (nivel de 3.3% base seca) de cada mezcla de suplemento. La cantidad de semilla correspondió de 30 g (cepa Hauser A15) para cada unidad experimental. Para la realizar la inoculación o siembra se barrió y lavó con agua y jabón la superficie de trabajo, posteriormente se colocaron plásticos sobre el piso para evitar que la composta tuviera contacto con el piso.

A continuación se desmenuzó la composta de fase II, para asegurar una distribución homogénea del sustrato en todos los tratamientos. Una vez hecho esto se empacó la composta en bolsas grandes para realizar la homogenización de los ingredientes, cada bolsa grande se pesó con 3 kg de composta, agregándole el suplemento correspondiente y la semilla, previamente acondicionadas para tal efecto. Se agitó vigorosamente la bolsa para asegurar el mezclado de materiales para posteriormente llenarlas manualmente según cada tratamiento, moldeándolas cilíndricamente, compactando y acomodándolas sobre tarimas. Finalmente, se transportaron a una nave de cultivo.

Los tratamientos se aleatorizaron y colocaron en un mismo nivel (cama de cultivo) dentro de los cuartos de cultivo, en donde se siguió las prácticas de cultivo comerciales, las condiciones ambientales (temperatura, humedad, ventilación y trabajos adicionales) fueron de acuerdo a las requeridas por *A. bisporus* y realizadas por cultivadores de la misma empresa.

## 6.4 Diseño experimental

Para los dos experimentos (experimento 1: de diciembre 2006 a febrero 2007; y experimento 2 de febrero a abril de 2007), se realizaron bajo un Diseño Completamente al Azar, en donde la combinación de los tratamientos en el cuarto de cultivo fueron asignados a través de una tabla de números aleatorios generada en Excell.

Los tratamientos experimentales evaluados fueron: composta no suplementada (testigo sin suplementación); composta con suplemento comercial (Rp); composta con salvado (S); composta con salvado más gluten (SG); composta con salvado más aceite (SA); composta con salvado más gluten más aceite (SGA). Cada experimento constó de 6 tratamientos por 18 repeticiones (108 unidades experimentales en total).

Al momento de sembrar e incorporar los suplementos (día cero) se realizó aleatoriamente el primer muestreo (3 bolsas de cada tratamiento), los próximos muestreos se distribuyeron durante el ciclo de cultivo, de la siguiente forma: a la inducción de cuerpos fructíferos (25 d); al final de 1<sup>er</sup> brote (39 d); al final del 2<sup>o</sup> brote (48 d) y al final de 3<sup>er</sup> brote (60 d).

Los datos fueron analizados siguiendo un diseño completamente al azar, se realizó un ANDEVA de una vía y se usó un modelo lineal general. Se realizó la prueba de rango múltiple de Duncan para determinar la diferencia entre tratamientos ( $p=0.01$ ).

## 6.5 Variables de Producción

Después de los primeros dos muestreos (siembra e inducción), llegaron a producción 12 unidades experimentales por tratamiento, las cuales se tomaron en cuenta para evaluar la producción al final del 1er brote. Al final del segundo muestreo se consideraron 7 bolsas en producción y finalmente 4 bolsas para cuantificar la producción al 3<sup>er</sup> brote. La cosecha de los cuerpos fructíferos se realizó cuando el velo del champiñón estaba cerrado, consistió en contar y pesar las piezas inmediatamente después de su cosecha. El periodo de cosecha fue de 24 d en intervalos de 8 d (3 brotes). La producción se expresó en  $\text{kg/m}^2$ ,  $\text{g/pieza}$  y total de piezas producidas de acuerdo al suplemento empleado.

## **6.6 Obtención del extracto crudo enzimático**

Para obtener el extracto crudo enzimático de la composta durante las diferentes etapas del cultivo se muestrearon 18 bolsas (3 por tratamiento), en ellas se procedió a vaciar y mezclar las compostas (de cada tratamiento), homogenizando el sustrato hasta que todas las partículas presentaron características similares. Mediante la realización de cuarteos se obtuvo una muestra representativa de 600 g de composta base húmeda, de esta muestra 100 g se usaron para determinar la materia seca, 100 g se utilizaron para obtener el extracto crudo enzimático y 400 g fueron secados y molidos.

A continuación, la muestra representativa de sustrato se colocó en un recipiente de un litro y se agregaron 150 ml de buffer de citratos 50 mM y pH 5.3. Este preparado se agitó a velocidad constante con una batidora por 10 min, y se dejó reposar por 5 min. Esta mezcla de composta humedecida con el buffer se colocó en tela de ciego y se sometió a prensado (con un exprimidor de jugos) finalmente, se recuperó el extracto líquido y se colocaron en botellas para centrifugar.

Se realizó la eliminación de exceso de sólidos del Extracto Crudo Enzimático mediante una primera centrifugación a 10 000 rpm durante 25 min a temperatura de 4° C. Una vez hecho esto, se obtuvo el sobrenadante y se eliminó el sólido suspendido. Debido a la turbidez se realizó un segundo y último centrifugado a 10 000 rpm durante 15 min a temperatura de 4°C. Se recuperó el sobrenadante como extracto crudo enzimático y se realizaron los análisis correspondientes (proteína soluble, celulasas, xilanasas, lacasas, proteasas y lipasas). Las determinaciones en los niveles de actividad enzimática se realizaron para todas las enzimas el mismo día de la extracción, aun así el extracto se mantuvo en frío cuando no era utilizado.

### **6.6.1 Proteína soluble**

Para poder determinar la actividad específica de las enzimas medidas se realizó el análisis de la proteína soluble del extracto. Se determinó mediante el método de Bradford (1976), para cada uno de las mediciones se tomaron 800 µL del extracto crudo enzimático (diluido 1:100 en buffer de citratos 50 mM y pH 5.3) y se le adicionaron 200 µL de reactivo de Bradford (BioRad). Se agitaron y dejaron reposar las muestras por 5 min, posteriormente se midió la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro (DU 640 Beckman). La cantidad de proteína se calculó con base a la

curva estándar utilizando una solución de seroalbumina bovina (1mg/1mL) diluida en buffer de citratos (50 mM y pH 5.3). (Anexo ).

### 6.6.2 Celulasas

Las celulasas son un grupo de enzimas en acción sinérgica que llevan a cabo la hidrólisis de la celulosa, a través de la liberación de azúcares reductores. Su actividad se midió a través de la liberación de azúcares reductores (Miller, 1959). Este método ha sido reportado para la lectura de estas enzimas (Purkartofer *et al.*, 1993).

Para medir los niveles de actividad enzimática se utilizó como sustrato una solución de Carboximetilcelulosa (CMC) al 0.5% (2.5 g/500 mL) (SIGMA), diluida en una solución amortiguadora de citratos (50mM y pH 4.8) (Membrillo, *et.al*, 2005). Se evaluó la actividad por la liberación de azúcares reductores del CMC. Esto se midió colorimétricamente con el método del reactivo ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), el cual se basa en la reducción del DNS (de color amarillo) por la glucosa u otro azúcar reductor al ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (de color rojo ladrillo) (Chaplin 1986), realizando la lectura de una absorbancia a 540 nm.

Se realizó una curva estándar con una solución de glucosa 10 mM (0.18 g/100 mL) diluida en un buffer de citratos (50 mM y pH 4.8). Posteriormente, se utilizó para relacionar los equivalentes de glucosa formados en el medio de reacción con la actividad enzimática (Anexo ).

El extracto se utilizó sin diluir en las muestras de siembra e inducción; para fin del primero, segundo y tercer brote se utilizó buffer de citratos (50 mM pH 4.8) para diluir el extracto (1:10). Hecho esto, en tubos de ensayo con tapón de rosca por triplicado, se adicionaron 0.9 mL de CMC y 0.1 mL de la muestra del extracto crudo enzimático. Se incubaron a 50°C durante 60 min, posteriormente se le adicionó el reactivo DNS a todos los tubos (a los blancos de muestra se les adicionó inmediatamente después el extracto enzimático), se pusieron a hervir por 5 min, finalmente, se retiraron y colocaron en hielo con el fin de detener la reacción. Se templaron los tubos y se realizó la lectura con celdas de plástico colocando 1 mL del volumen total de la muestra, se midió en el espectrofotómetro (DU640 Beckman) a una absorbancia de 540 nm. Teniendo en cuenta que una unidad internacional para celulasas es la cantidad de enzima que libera 1  $\mu$ M de azúcar reductor (glucosa) por min a 50°C (Meraz *et.al.*, 2006).

### 6.6.3 Xilanasas

Las xilanasas son un grupo de enzimas hidrolíticas que actúan sinérgicamente en el rompimiento de los enlaces presentes en la hemicelulosa (xilano) (Ponce y Pérez, 2002). La actividad de xilanasas fue medida a través de la liberación de azúcares reductores por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), (Miller, 1959), con modificaciones de Loera y Córdoba (2003) descritas a continuación: se utilizó como sustrato una solución de Xilano 0.5% (2.5 g/500 mL) (SIGMA) disuelta en amortiguador de citratos (50 mM y pH 5.3) (Baldrian, 2003).

Además se realizó una curva estándar con solución de xilosa a una concentración final de 10 mM (0.15 g/100 mL) disuelta en buffer citratos (50 mM y pH 5.3). Esta solución inicial fue diluida en el mismo buffer de citratos para obtener la serie de la curva estándar (Anexo ).

En tubos de ensaye con tapón de rosca por triplicado se llevó a cabo la reacción para la determinación de xilanasas, en las muestras de siembra e inducción el extracto se utilizó sin diluir; para fin del primer brote se utilizó el buffer de citratos (50 mM pH 5.3) para diluir el extracto (1:10) y finalmente para las determinaciones del final de segundo y tercer brote se diluyó 1:100. El volumen de reacción fue de 1 mL, que contenía 0.9 mL del sustrato y 0.1 del extracto crudo enzimático. Se incubó por 5 min a 50°C. Se le agregó 1.5 mL del reactivo DNS. Al blanco de muestra se le agregó después del DNS la muestra del extracto enzimático. Las muestras se llevaron a hervir durante 5 min, para desarrollar color, posteriormente se colocaron en hielo. Finalmente en el espectrofotómetro se tomó 1 mL del volumen total, se colocó en una celda de plástico desechable y se midió su absorbancia a 540 nm. Una unidad de xilanasas se define como la cantidad de enzima necesaria para producir 1  $\mu$ M de azúcar reductor (d-xylosa) por minuto a 50° C. (Qinnghe et al., 2004).

### 6.6.4 Lacasas

Se determinó la actividad por la oxidación del ácido 2,2-azinobis-3-etilbencetiazolinasulfónico (ABTS). El reactivo ABTS se preparó con 0.069 g disueltos en 25 mL de amortiguador de citratos (50 mM pH 5.3). Esta solución se colocó en un frasco color ámbar y se cubrió con papel aluminio, hasta por 10 días. Los tubos de reacción se prepararon con 800  $\mu$ L de buffer citratos (pH 5.3 50 mM), 100  $\mu$ L del extracto crudo enzimático, posterior a esto se incubó en baño María

a 40° durante 1 min. Al momento de la lectura de cada muestra se le incorporaron por cada tubo 100 µL del reactivo ABTS para dar un volumen total de 1 mL, se agitó en un vortex y se midió la absorbancia a 420 nm durante 5 min cada de 15 s. Una unidad de actividad se definió como la cantidad de enzima que produce 1µmol de sustrato oxidado por minuto bajo las condiciones de reacción (Ávila, 2005).

#### 6.6.5 Proteasas

Las proteasas se determinaron por colorimetría según la metodología de Nieto y Ellis (1986). Se utilizó como sustrato una solución de Caseína 2% (1 g/50 mL) (Caseína Hammerstein), diluida en una solución amortiguadora de citratos (50 mM, pH 5.3).

Las determinaciones se realizaron por triplicado, la mezcla de reacción se preparó en tubos de ensayo conteniendo 1 mL del sustrato más 1 mL del extracto enzimático (para el análisis en la etapa de siembra, inducción y final del primer brote no se realizaron diluciones del extracto, pero para final segundo y tercer brote se hizo dilución 1/10).

La mezcla se incubó a 30°C por 10 min con agitación suave, y para detener la reacción se agregó 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0.4 M; al blanco de muestra se le adicionó la muestra después del TCA. Se centrifugó a 7 000 rpm por 15 min a 4°C, y se eliminó el sedimento, recuperando 1 mL del sobrenadante (Sánchez *et al.* 2004); para determinar el color se le adicionó 5 mL de carbonato de sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) 0.4 M y 1 mL de reactivo Folin-Ciocalteu (1:5), la mezcla se agitó, posteriormente se incubó a 30°C por 30 min para finalmente leer su absorbancia a 660 nm. La curva estándar se realizó con solución de tirosina (Anexo).

#### 6.6.6 Lipasas

La actividad lipolítica se determinó de acuerdo a la metodología propuesta por Pencreach y Baratti (1996), monitoreando el incremento en la absorbancia debido a la liberación de *p*-Nitrofenol (*p*-Np) por acción de las lipasas al hidrolizar el sustrato *p*-Nitrofeoil palmitato (*p*-Npp). La mezcla de reacción consistió en adicionar 9 partes (2.43 mL) de la solución B, incorporando por goteo 1 parte (0.27 mL) del sustrato (solución A), manteniendo las muestras en incubación a 40°C, al momento de la lectura se le adicionó 0.30 mL del extracto enzimático para

ajustar la muestra a 3 mL, las muestras se realizaron por triplicado. Para leer la absorbancia a 410 nm, durante 5 min en intervalos de 60 s, se utilizó un espectrofotómetro SHIMADZU.

**Solución A:** *p*-Nitrofenil palmitato (*p*-Npp), 13.4 mM (SIGMA) diluido en 2-propanol.

**Solución B:** Tris HCl (pH 7.5, 40°C)(BioRad), 100 mM; CaCl<sub>2</sub> 20 mM; alcohol polivinílico PVA, 0.25% (p/v).

La curva estándar se realizó con una solución de *p*-Nitrofenol *p*-Np 1.11 μmol/mL en 2-propanol. Una unidad de lipasa corresponde a la cantidad de enzima capaz de liberar 1 μmol de *p*-Np proveniente del *p*-Npp por min (a 40°C en una solución amortiguadora de Tris HCl, 100 mM, a pH 7.5).

## 6.7 Análisis estadístico

Se aplicará un análisis de varianza para un Diseño Completamente al Azar. Con esto se estimó y probó la hipótesis, respecto a las variancias de las poblaciones y respecto a las medias de las poblaciones respectivamente, esto para poder determinar si es posible concluir que tres o más tratamientos difieren en eficacia respecto de los tratamientos evaluados (Wayne, 2005).

A los resultados de la prueba anterior y de acuerdo al grado de significancia de la ANDEVA, se les aplicó la prueba de rango múltiple de Duncan (Montgomery, 2003), para conocer la influencia de las mezclas sobre la producción y en los niveles de actividad. Se utilizó el programa de software SPSS versión 13.0.

## 7 RESULTADOS

### 7.1 Formulación de suplementos experimentales

La formulación de suplementos se hizo teniendo como base un material rico en polisacáridos como es el salvado de maíz, el cual se mezcló con fuentes ricas en proteína (gluten de maíz) y con materiales ricos en lípidos (aceite de soya) de tal forma que presentaran composiciones similares al suplemento convencional (quebrado de soya). Dado lo anterior, para realizar una correcta suplementación fue necesario conocer la composición de los ingredientes propuestos (Cuadro 7.1), en base a estos valores se realizaron formulaciones que asemejen las propiedades nutricionales que presenta el suplemento convencional.

Se puede observar que el salvado de maíz tuvo 3 veces menos proteína que el gluten de maíz, aunque los dos materiales mostraron bajos niveles de aceite (menos del 3%), por lo que fue necesario ocupar una fuente de grasa, como lo es el aceite de soya.

Ingredientes	Composición (g /100g materia seca)				
	Cenizas	Grasa	Proteína	Extracto Libre de N	Total
Salvado de maíz	4.75	1.59	19.00	74.66	100
Gluten de maíz	2.75	3.00	63.00	31.25	100
Accite de soya		100			100

**Cuadro 7.1 Composición de ingredientes utilizados para la elaboración de suplementos**

#### 7.1.1 Suplementos experimentales basados en salvado

Partiendo de la composición de los ingredientes propuestos para suplementar compostas, fue necesario realizar formulaciones de tal forma que se llegara a una cantidad similar a las características del suplemento convencional, se determinó la proporción de ingredientes que corresponde para llegar a los valores del suplemento comercial, el cálculo se realizó para preparar 15 kg de mezcla para cada tratamiento.



En el Cuadro 7.1.1 se observa la composición del suplemento comercial Rendi plus (Rp), con base en estas características se realizaron formulaciones para cada tratamiento hasta llegar a una composición similar a la del suplemento comercial. Los parámetros a igualar fueron el 25% de proteína y el 18% de aceite. En el caso del tratamiento con solo Salvado (S), como única suplementación, los valores demuestran a pesar de tener niveles de proteínas y de lípidos por debajo del suplemento comercial, esto con el fin de conocer su efecto como ingrediente rico en polisacáridos. El balance del tratamiento de Salvado y Gluten (SG) correspondió a un proporción (26:4) para llegar a un contenido de proteína del 24.9%, muy cercano al contenido de proteína de Rp. La mezcla de Salvado y Aceite (SA) tuvo una proporción (25:5) con lo que se llegó a un contenido de aceite de 18%, similar al contenido de aceite de Rp. Finalmente, la mezcla de Salvado, Gluten y Aceite (SGA) tuvo una proporción de (62:21:17) para llegar a un contenido de 25% de proteína y 18.6% de aceite. Este cuadro también muestra los kg necesarios por cada ingrediente para preparar 15 kg de suplemento como un mismo lote para ser utilizados en la réplica del experimento.

SUPLEMENTO COMERCIAL	Composición (g /100g materia seca)				
	Cenizas	Grasa BS	Proteína	Extracto Libre de N	Total
RENDI PLUS	3.44	18.05	25.00	53.51	100
SUPLEMENTOS EXPERIMENTALES	I	I	I	I	I
SALVADO	4.75	1.59	19.00	74.66	100
SALVADO + GLUTEN (26:4)	4.48	1.78	24.87	68.87	100
SALVADO + ACEITE (25:5)	3.96	17.99	15.83	62.22	100
SALVADO + GLUTEN + ACEITE (62:21:17)	3.52	18.62	25.01	52.85	100

**Cuadro 7.1.1 Formulación de suplementos experimentales a base de salvado con composición al suplemento comercial "Rendiplus";**Error! Marcador no definido.

### 7.1.2 Composición de suplementos experimentales

Por sus propiedades nutricionales estos ingredientes favorecen el crecimiento de mohos competidores, ocasionando daño al cultivo, si se incorporaran en exceso pueden romper la

selectividad de las compostas. Una vez determinada la cantidad de ingredientes a utilizar, estas formulaciones se llevaron a esterilizar de acuerdo a los protocolos de la empresa.

El Cuadro 7.1.2 muestra la composición final de los suplementos, estos corresponden a los tratamientos a evaluar con composta de fase II, además se contempló un control con composta sin suplementar.

Suplemento	Composición (g /100g materia seca)				
	Cenizas	Grasa	Proteína	Extracto Libre de N	Total
RENDI PLUS	3.4	18.1	25.0	53.5	100
Salvado	4.8	1.6	19.0	74.7	100
Salvado + Gluten (26:4)	4.5	1.8	24.9	68.9	100
Salvado + Aceite (25:5)	4.0	18.0	15.8	62.2	100
Salvado+ Gluten+ Aceite (62:21:17)	3.5	18.6	25.0	52.9	100

**Cuadro 7.1.2 Composición de suplementos experimentales**

## 7.2 Producción de champiñones en composta con diferentes suplementos

Para medir la eficiencia de los suplementos propuestos, se determinó el efecto en la producción de champiñones frescos por superficie. La producción comenzó aproximadamente, para todas las unidades experimentales a los 32 d. Se cosecharon los cuerpos fructíferos con el velo cerrado, se registró el peso y el número de piezas cosechadas por bolsa cada día.

### 7.2.1 Producción de champiñones (Experimento 1)

El Cuadro 7.2.1 muestra los valores de producción del experimento 1 (realizado en los meses de diciembre-febrero), se observa que desde el final del 1<sup>er</sup> brote (39 d) existe una diferencia en la producción entre la composta no suplementada (14.7 kg/m<sup>2</sup>), el Rp y SGA (20.3 kg/m<sup>2</sup> y 20.1 kg/m<sup>2</sup>, respectivamente), aunque los demás tratamientos no mostraron diferencias estadísticas entre ellos. En el siguiente intervalo de corte (final del 2<sup>o</sup> brote, 48 d), la producción descendió

aproximadamente 50% en todos los tratamientos, pero se observó que el tratamiento con composta no suplementada tuvo la menor producción ( $8.4 \text{ kg/m}^2$ ), siendo estadísticamente diferente con Rp y SGA cuyas producciones fueron de  $11.3 \text{ kg/m}^2$  y  $11.1 \text{ kg/m}^2$ , respectivamente. La producción en el final del ciclo de cultivo (3<sup>er</sup> brote, 60 d) mostró una diferencia estadística significativa de Rp y SGA contra los otros tratamientos, en este tiempo, el control con composta no suplementada no fue diferente con respecto a S, SG y SA en la producción en el 3<sup>er</sup> brote. Los suplementos Rp y SGA causaron la mayor producción total acumulada con  $35.5 \text{ kg/m}^2$  y  $35.2 \text{ kg/m}^2$ , respectivamente. Para este mismo parámetro la composta no suplementada mostró la producción menor ( $25.1 \text{ kg/m}^2$ ), pero no fue estadísticamente diferente a los suplementos S ( $28.7 \text{ kg/m}^2$ ) y SA ( $28.9 \text{ kg/m}^2$ ). Por otro lado, con el suplemento SG se obtuvo una producción de  $29.4 \text{ kg/m}^2$ , siendo diferente de la composta no suplementada pero no de los valores de producción de S y SA.

### 7.2.2 Producción de champiñones (Experimento 2)

Los valores de producción del segundo experimento el cual se realizó en los meses de febrero-abril, (Cuadro 7.2.2) mostró que no hubo diferencia en los tratamientos para 1<sup>er</sup> brote (39 d), los valores variaron entre  $13.7 \text{ kg/m}^2$  y  $12.0 \text{ kg/m}^2$ . Al final del 2<sup>o</sup> brote (48 d) el tratamiento SG mostró la producción mayor ( $17.4 \text{ kg/m}^2$ ), pero sin ser estadísticamente diferente a los demás tratamientos, con excepción de la composta no suplementada ( $11.2 \text{ kg/m}^2$ ). El 3<sup>er</sup> brote (60 d) mostró una marcada producción para el suplemento Rp ( $7.9 \text{ kg/m}^2$ ) con respecto a los otros tratamientos, siendo el SG el tratamiento que presentó la menor producción ( $4.3 \text{ kg/m}^2$ ), el cual no presentó diferencia significativa con el control de composta no suplementada y el suplemento SGA. Los tratamientos basados con S y SA tampoco mostraron diferencias entre ellos. La producción total acumulada mostró que el mejor suplemento fue Rp ( $36.6 \text{ kg/m}^2$ ), pero sin diferencias significativas con SG, SA y SGA ( $33.9$ ,  $35.0$  y  $34.1 \text{ kg/m}^2$ ), respectivamente. Para este experimento el tratamiento con la menor producción fue la composta no suplementada ( $29.7 \text{ kg/m}^2$ ). Con los resultados anteriores de la réplica del experimento se observó que los tratamientos Rp y SGA muestran la mejor producción.

**Cuadro 7.2.1 Producción de champiñones (kg de hongos frescos / m<sup>2</sup> ) con diferentes tipos de suplementos (Experimento 1)**

Brote	Composta no suplementada	SUPLEMENTO				
		Rendi plus	SALVADO	Salvado + Gluten	Salvado + Aceite	Salvado + Gluten+Aceite
1	14.7 ± 2.1 <sup>a</sup>	20.3 ± 2.4 <sup>b</sup>	18.0 ± 2.2 <sup>ab</sup>	17.3 ± 2.6 <sup>ab</sup>	17.9 ± 2.0 <sup>ab</sup>	20.1 ± 3.3 <sup>b</sup>
2	8.4 ± 1.3 <sup>a</sup>	11.3 ± 1.9 <sup>c</sup>	8.7 ± 1.7 <sup>ab</sup>	9.9 ± 1.7 <sup>abc</sup>	9.1 ± 1.7 <sup>abc</sup>	11.1 ± 2.1 <sup>bc</sup>
3	2.0 ± 0.2 <sup>a</sup>	4.0 ± 0.4 <sup>b</sup>	2.1 ± 0.4 <sup>a</sup>	2.2 ± 0.4 <sup>a</sup>	1.9 ± 0.3 <sup>a</sup>	4.0 ± 0.7 <sup>b</sup>
<b>Total</b>	<b>25.1 ± 3.6<sup>a</sup></b>	<b>35.5 ± 4.7<sup>c</sup></b>	<b>28.7 ± 4.3<sup>ab</sup></b>	<b>29.4 ± 4.7<sup>b</sup></b>	<b>28.9 ± 4.0<sup>ab</sup></b>	<b>35.2 ± 6.1<sup>c</sup></b>

Letras diferentes en la misma fila indican diferencia significativa entre tratamientos (p=0.01)

**Cuadro 7.2.2 Producción de champiñones (kg de hongos frescos / m<sup>2</sup> ) con diferentes tipos de suplementos (Experimento 2)**

Brote	Composta no suplementada	SUPLEMENTO				
		Rendi plus	SALVADO	Salvado + Gluten	Salvado + Aceite	Salvado + Gluten+Aceite
1	13.7 ± 1.5 <sup>a</sup>	12.1 ± 1.6 <sup>a</sup>	12.0 ± 1.4 <sup>a</sup>	12.1 ± 1.9 <sup>a</sup>	12.7 ± 1.8 <sup>a</sup>	12.7 ± 2.2 <sup>a</sup>
2	11.2 ± 2.3 <sup>a</sup>	16.6 ± 3.1 <sup>b</sup>	15.1 ± 1.5 <sup>b</sup>	17.4 ± 2.3 <sup>b</sup>	16.0 ± 1.3 <sup>b</sup>	16.5 ± 2.4 <sup>b</sup>
3	4.8 ± 0.3 <sup>ab</sup>	7.9 ± 1.5 <sup>c</sup>	6.1 ± 1.1 <sup>b</sup>	4.3 ± 0.6 <sup>a</sup>	6.3 ± 1.1 <sup>b</sup>	4.9 ± 0.8 <sup>ab</sup>
<b>Total</b>	<b>29.7 ± 4.2<sup>a</sup></b>	<b>36.6 ± 6.4<sup>c</sup></b>	<b>33.2 ± 4.1<sup>b</sup></b>	<b>33.9 ± 4.8<sup>bc</sup></b>	<b>35.0 ± 4.4<sup>bc</sup></b>	<b>34.1 ± 5.4<sup>bc</sup></b>

Letras diferentes en la misma fila indican diferencia significativa entre tratamientos (p=0.01)

### 7.3 Evolución del Contenido de proteína soluble y actividades enzimáticas

Los suplementos mostraron un efecto significativo en la producción de hongo fresco. A continuación se estudió si tal efecto podría estar correlacionado con cambios en niveles enzimáticos. El extracto crudo enzimático se obtuvo para todas las determinaciones enzimáticas con un buffer de citratos (pH 5.3, 50mM).

#### 7.3.1 Contenido de Proteína Soluble (Experimento 1)

La proteína soluble es una medición necesaria para poder determinar los niveles de actividad específica de cada enzima. El Cuadro 7.3.1 nos muestra que el contenido de proteína soluble a la (inducción y final del 1<sup>er</sup> brote) se obtuvieron valores similares para todos los tratamientos, sin embargo, presentaron diferencias al final del 2<sup>o</sup> brote, en el cual SA mostró el valor menor con un contenido de 4.7 mg/gSS contra el de la composta no suplementada que llegó a 14.9 mg/gSS. Esta tendencia se mantuvo hasta el final del 3<sup>er</sup> brote en el que la composta no suplementada presentó el valor más alto de proteína (16.1 mg/gSS) y el SA la menor cantidad (13.9 mg/gSS).

#### 7.3.2 Contenido de Proteína Soluble (Experimento 2)

En el segundo experimento (Cuadro 7.3.2) la proteína soluble también mostró el más alto nivel en el inicio del ciclo de cultivo para todos los tratamientos, representando para la composta no suplementada y el SGA los valores mayores (5,9 mg/gSS) para ambos tratamientos. El menor contenido se observó para la composta suplementada con SA (5.0 mg/gSS). La proteína soluble bajó gradualmente en todos los tratamientos durante el ciclo de cultivo, hasta llegar al final del 3<sup>er</sup> brote a un nivel de 2.9 mg/gSS para SGA, siendo el menor en contenido de proteína, mientras que para este mismo brote, tanto el Rp como SA presentaron el contenido mayor de proteína soluble (3.3 mg/gSS). Para evaluar el contenido inicial de la proteína soluble se midió en la siembra sólo durante el segundo experimento.

**Cuadro 7.3.1 Contenido de Proteína Soluble (mg/g sustrato seco) durante el cultivo de *A. bisporus*, en compostas con suplementos basados en salvado (Exp 1)**

ETAPA DEL CULTIVO	Proteína Soluble mg/gSS					
	Composta no suplementada	SUPLEMENTO				
		Rendi plus (Control)	SALVADO	Salvado + Gluten	Salvado + Aceite	Salvado + Gluten+Aceite
Inducción	10.3 ± 1.3 <sup>a</sup>	9.9 ± 1.6 <sup>a</sup>	8.8 ± 0.7 <sup>a</sup>	9.0 ± 1.8 <sup>a</sup>	8.7 ± 0.3 <sup>a</sup>	10.5 ± 1.0 <sup>a</sup>
Brote 1*	10.6 ± 1.7 <sup>b</sup>	9.5 ± 1.0 <sup>b</sup>	8.8 ± 0.5 <sup>b</sup>	9.7 ± 1.0 <sup>b</sup>	8.5 ± 1.1 <sup>a</sup>	9.5 ± 0.4 <sup>b</sup>
Brote 2*	14.9 ± 2.1 <sup>d</sup>	11.8 ± 1.5 <sup>c</sup>	7.8 ± 0.4 <sup>b</sup>	7.7 ± 0.3 <sup>b</sup>	4.7 ± 0.6 <sup>a</sup>	8.9 ± 1.0 <sup>b</sup>
Brote 3*	16.1 ± 0.8 <sup>d</sup>	14.9 ± 0.4 <sup>b</sup>	15.0 ± 0.2 <sup>b</sup>	16.0 ± 0.5 <sup>c</sup>	13.9 ± 0.8 <sup>a</sup>	15.5 ± 0.3 <sup>bc</sup>

\* Muestreo al final del brote correspondiente

Letras diferentes en la misma fila indican diferencia significativa entre tratamientos (p=0.01)

**Cuadro 7.3.2 Contenido de Proteína Soluble (mg/g sustrato seco) durante el cultivo de *A. bisporus*, en compostas con suplementos basados en salvado (Exp 2)**

ETAPA DEL CULTIVO	Proteína Soluble mg/gSS					
	Composta no suplementada	SUPLEMENTO				
		Rendi plus	SALVADO	Salvado + Gluten	Salvado + Aceite	Salvado + Gluten+Aceite
Siembra	5.9 ± 0.2 <sup>b</sup>	5.5 ± 0.5 <sup>ab</sup>	5.3 ± 0.1 <sup>a</sup>	5.3 ± 0.2 <sup>a</sup>	5.0 ± 0.3 <sup>a</sup>	5.9 ± 0.2 <sup>b</sup>
Inducción	4.6 ± 0.2 <sup>c</sup>	5.1 ± 0.1 <sup>c</sup>	5.0 ± 0.1 <sup>d</sup>	4.5 ± 0.1 <sup>bc</sup>	4.4 ± 0.1 <sup>ab</sup>	4.3 ± 0.1 <sup>a</sup>
Brote 1*	4.8 ± 0.1 <sup>c</sup>	4.8 ± 0.2 <sup>c</sup>	4.2 ± 0.1 <sup>b</sup>	3.8 ± 0.05 <sup>a</sup>	4.5 ± 0.1 <sup>c</sup>	4.5 ± 0.2 <sup>c</sup>
Brote 2*	4.6 ± 0.02 <sup>c</sup>	4.2 ± 0.1 <sup>ab</sup>	4.0 ± 0.1 <sup>a</sup>	4.1 ± 0.3 <sup>ab</sup>	4.3 ± 0.1 <sup>bc</sup>	4.4 ± 0.1 <sup>bc</sup>
Brote 3*	3.2 ± 0.3 <sup>ab</sup>	3.3 ± 0.2 <sup>b</sup>	3.1 ± 0.1 <sup>ab</sup>	3.1 ± 0.1 <sup>ab</sup>	3.3 ± 0.1 <sup>b</sup>	2.9 ± 0.1 <sup>a</sup>

\* Muestreo al final del brote correspondiente

Letras diferentes en la misma fila indican diferencia significativa entre tratamientos (p=0.01)

### **7.3.3 Actividad total de Celulasas (Experimento 1)**

El Cuadro 7.3.3 muestra los valores de celulasas totales durante el ciclo de cultivo. Los valores son prácticamente constantes y presentan la mayor actividad para todos los tratamientos al final del primer brote, siendo Rp y SGA los que alcanzaron los valores mayores de actividad (18.3 UI/gSS para ambos), mientras que la menor actividad se presentó para la composta no suplementada (13.0 UI/gSS). En los siguientes brotes la actividad disminuyó gradualmente en cada uno de los tratamientos.

### **7.3.4 Actividad total de Celulasas (Experimento 2)**

Los valores en la actividad de celulasas en la réplica del experimento (Cuadro 7.3.4) presentaron los valores similares para todos los tratamientos en la etapa de siembra e inducción. Al final del primer brote la producción mayor la tuvo Rp (14.6 UI/gSS) siendo estadísticamente diferente al resto de los tratamientos, la menor producción en esta etapa la presentó el tratamiento SA (6.3 UI/gSS). Para el segundo brote se encontró la mayor actividad en todos los tratamientos, para el suplemento SGA y SG se tuvieron los niveles más altos (73.0 y 69.0 UI/gSS, respectivamente). En esta etapa el tratamiento Rp presentó la actividad más baja con 31.6 UI/gSS. Finalmente al 3<sup>er</sup> brote, los niveles bajaron en todos los tratamientos, excepto para Rp (32.6 UI/gSS) que fue estadísticamente diferente al resto de los tratamientos.

### **7.3.5 Actividad total de Xilanasas (Experimento 1)**

En el cuadro 7.3.5 se presentan los valores de xilanasas que fueron similares en todos los tratamientos en las etapas iniciales de cultivo (siembra e inducción). Sin embargo la producción varió en los muestreos siguientes, mostrando para los tratamientos de composta no suplementada, S y SA la actividad más alta al final del primer brote, con 933, 795.8 y 797.6 UI/gSS, respectivamente; mientras que para los tratamientos con Rp, SG y SGA la mayor actividad se presentó al final del tercer brote, con 2113.3, 1021 y 2558.6 UI/gSS, respectivamente; al final de este último brote la composta suplementada con SA presentó la menor actividad (466.7 UI/gSS).

**Cuadro 7.3.3 Actividad de Celulasas (UI/g sustrato seco) durante el cultivo de *A. bisporus*, en compostas con suplementos basados en salvado (Exp 1)**

ETAPA DEL CULTIVO	Celulasas UI/gSS					
	Composta no suplementada	SUPLEMENTO				
		Rendi plus (Control)	SALVADO	Salvado + Gluten	Salvado + Aceite	Salvado + Gluten+Aceite
Siembra	0.6 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.6 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.7 ± 0.13 <sup>ab</sup>	0.7 ± 0.10 <sup>ab</sup>	0.8 ± 0.10 <sup>b</sup>	0.8 ± 0.14 <sup>b</sup>
Inducción	1.4 ± 0.2 <sup>b</sup>	1.5 ± 0.1 <sup>b</sup>	0.8 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.1 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.1 ± 0.2 <sup>a</sup>	1.6 ± 0.1 <sup>b</sup>
Brote 1*	13.0 ± 0.7 <sup>a</sup>	18.3 ± 0.4 <sup>b</sup>	16.3 ± 0.6 <sup>b</sup>	15.7 ± 0.5 <sup>b</sup>	12.5 ± 0.8 <sup>a</sup>	18.3 ± 1.4 <sup>b</sup>
Brote 2*	11.7 ± 1.5 <sup>b</sup>	12.8 ± 1.7 <sup>b</sup>	12.0 ± 1.5 <sup>b</sup>	14.9 ± 2.4 <sup>b</sup>	11.0 ± 1.9 <sup>a</sup>	13.0 ± 1.8 <sup>b</sup>
Brote 3*	6.6 ± 0.5 <sup>c</sup>	6.6 ± 0.6 <sup>c</sup>	5.5 ± 1.0 <sup>ab</sup>	6.0 ± 0.5 <sup>bc</sup>	4.5 ± 0.1 <sup>a</sup>	6.2 ± 0.5 <sup>bc</sup>

\* Muestreo al final del brote correspondiente

Letras diferentes en la misma fila indican diferencia significativa entre tratamientos (p=0.01)

**Cuadro 7.3.4 Actividad de Celulasas (UI/g sustrato seco) durante el cultivo de *A. bisporus*, en compostas con suplementos basados en salvado (Exp2)**

ETAPA DEL CULTIVO	Celulasas UI/gSS					
	Composta no suplementada	SUPLEMENTO				
		Rendi plus	SALVADO	Salvado + Gluten	Salvado + Aceite	Salvado + Gluten+Aceite
Siembra	2.6 ± 0.4 <sup>b</sup>	2.0 ± 0.2 <sup>a</sup>	2.4 ± 0.2 <sup>b</sup>	2.2 ± 0.4 <sup>b</sup>	2.0 ± 0.1 <sup>a</sup>	2.3 ± 0.2 <sup>b</sup>
Inducción	1.6 ± 0.2 <sup>a</sup>	2.2 ± 0.1 <sup>b</sup>	1.9 ± 0.1 <sup>ab</sup>	3.0 ± 0.5 <sup>c</sup>	2.5 ± 0.4 <sup>b</sup>	2.1 ± 0.1 <sup>ab</sup>
Brote 1*	12.0 ± 2.0 <sup>c</sup>	14.6 ± 0.6 <sup>d</sup>	6.5 ± 0.9 <sup>a</sup>	6.8 ± 1.4 <sup>ab</sup>	6.3 ± 0.9 <sup>a</sup>	8.9 ± 1.0 <sup>b</sup>
Brote 2*	64.4 ± 1.4 <sup>c</sup>	31.6 ± 1.0 <sup>a</sup>	65.1 ± 2.4 <sup>c</sup>	69.0 ± 1.8 <sup>cd</sup>	54.2 ± 1.4 <sup>b</sup>	73.0 ± 5.6 <sup>d</sup>
Brote 3*	12.7 ± 1.4 <sup>a</sup>	32.6 ± 1.6 <sup>c</sup>	22.4 ± 2.3 <sup>b</sup>	13.1 ± 0.5 <sup>a</sup>	12.6 ± 0.6 <sup>a</sup>	12.9 ± 1.3 <sup>a</sup>

\* Muestreo al final del brote correspondiente

Letras diferentes en la misma fila indican diferencia significativa entre tratamientos (p=0.01)



### **7.3.6 Actividad total de Xilanasas (Experimento 2)**

Las xilanasas en el segundo experimento (Cuadro 7.3.6) mostraron diferentes niveles de actividad entre tiempos y tipo de suplemento empleado al final del primer brote para el SA y la composta no suplementada presentaron la actividad mayor con 691.2 y 674.6 UI/gSS, respectivamente. La menor actividad para esta etapa del cultivo se presentó con Rp (311.1 UI/gSS). También se muestra que con SGA se obtuvo la actividad más alta en el primer brote (596.3 UI/gSS). Para el tercer brote la actividad de xilanasas se disparó para los tratamientos Rp, S y SGA presentando valores de 1778.4, 991.2 y 1575.3, UI/gSS, respectivamente, mostrando contraste con SG de menor actividad (352.8 UI/gSS).

### **7.3.7 Actividad total de Lacasas (Experimento 1)**

El nivel de actividad de lacasas (Cuadro 7.3.7) mostró sus niveles más altos en la etapa inicial del cultivo (inducción) para todos los tratamientos. El tratamiento con SGA presentó la mayor actividad (88.6 UI/gSS) y la composta no suplementada tuvo la menor actividad (53.3 UI/gSS). En los siguientes muestreos (fin del 1<sup>er</sup> y 2<sup>o</sup> brote) la actividad en todos los tratamientos se redujo, pero volvió a incrementarse al final del 3er brote siendo el tratamiento SG el que tuvo mayor actividad (69.6 UI/gSS) y la composta no suplementada el que presentó la menor producción con 28.8 UI/gSS.

### **7.3.8 Actividad total de Lacasas (Experimento 2)**

En el Cuadro 7.3.8 se muestran que todos los tratamientos presentaron su nivel de actividad más alto a la inducción de los cuerpos fructíferos. El tratamiento basado en el suplemento S mostró la mayor actividad (36.9 UI/gSS) siendo diferente a los otros tratamientos, mientras que con Rp y SG no se encontraron diferencias entre ellos, en contraste los tratamientos con composta no suplementada, SGA y SA tuvieron la actividad menor con valores de 27.1, 26.4 y 26.5 UI/gSS, respectivamente. Se observó que en la composta no suplementada hubo un incremento en esta actividad al final del segundo brote (15.2 UI/gSS), mientras que el resto de los tratamientos mantuvieron valores menores. Finalmente, para el tercer brote los tratamientos con S, SG, SA y SGA presentaron un aumento en la actividad (7.2, 12.0, 14.9 y 11.6 UI/gSS respectivamente) y la menor actividad la mantuvo Rp con 2.9 UI/gSS.

**Cuadro 7.3.5 Actividad de Xilanasas (UI/g sustrato seco) durante el cultivo de *A. bisporus*, en compostas con suplementos basados en salvado (Exp 1)**

ETAPA DEL CULTIVO	Xilanasas UI/gSS					
	Composta no suplementada	SUPLEMENTO				
		Rendi plus (Control)	SALVADO	Salvado + Gluten	Salvado + Aceite	Salvado + Gluten+Aceite
Siembra	6.3 ± 0.2 <sup>a</sup>	7.5 ± 0.6 <sup>bc</sup>	7.7 ± 1.0 <sup>bc</sup>	8.2 ± 0.9 <sup>c</sup>	7.9 ± 0.5 <sup>bc</sup>	7.0 ± 1.2 <sup>ab</sup>
Inducción	42.3 ± 3.1 <sup>a</sup>	42.9 ± 0.4 <sup>a</sup>	44.6 ± 3.4 <sup>a</sup>	38.3 ± 2.7 <sup>a</sup>	45.1 ± 11.7 <sup>a</sup>	39.8 ± 3.6 <sup>a</sup>
Brote 1*	933.0 ± 8.2 <sup>c</sup>	846.7 ± 15.6 <sup>b</sup>	795.8 ± 13.7 <sup>a</sup>	959.3 ± 19.5 <sup>c</sup>	797.6 ± 13.7 <sup>a</sup>	839.3 ± 33 <sup>b</sup>
Brote 2*	649.4 ± 122.2 <sup>c</sup>	549.2 ± 42.7 <sup>bc</sup>	332.9 ± 9.5 <sup>a</sup>	622.7 ± 62.7 <sup>c</sup>	491.0 ± 3.3 <sup>b</sup>	946.7 ± 43.1 <sup>d</sup>
Brote 3*	601.8 ± 32.7 <sup>a</sup>	2113.3 ± 334.3 <sup>d</sup>	792.8 ± 125.6 <sup>b</sup>	1021.0 ± 53.7 <sup>c</sup>	466.7 ± 60.5 <sup>a</sup>	2558.6 ± 65.9 <sup>c</sup>

\* Muestreo al final del brote correspondiente

Letras diferentes en la misma fila indican diferencia significativa entre tratamientos (p=0.01)

**Cuadro 7.3.6 Actividad de Xilanasas (UI/g sustrato seco) durante el cultivo de *A. bisporus*, en compostas con suplementos basados en salvado (Exp 2)**

ETAPA DEL CULTIVO	Xilanasas UI/gSS					
	Composta no suplementada	SUPLEMENTO				
		Rendi plus	SALVADO	Salvado + Gluten	Salvado + Aceite	Salvado + Gluten+Aceite
Siembra	42.7 ± 2.4 <sup>b</sup>	38.0 ± 7.4 <sup>bc</sup>	32.6 ± 1.8 <sup>ab</sup>	30.1 ± 4.0 <sup>a</sup>	34.5 ± 2.7 <sup>b</sup>	32.4 ± 3.9 <sup>ab</sup>
Inducción	39.4 ± 4.9 <sup>ab</sup>	28.8 ± 1.8 <sup>a</sup>	28.9 ± 5.0 <sup>a</sup>	36.3 ± 4.6 <sup>ab</sup>	45.3 ± 7.2 <sup>b</sup>	44.6 ± 8.5 <sup>b</sup>
Brote 1*	674.6 ± 14.9 <sup>d</sup>	311.1 ± 13.4 <sup>a</sup>	390.5 ± 13.4 <sup>b</sup>	427.0 ± 12.7 <sup>b</sup>	691.2 ± 36.7 <sup>d</sup>	596.3 ± 24.7 <sup>c</sup>
Brote 2*	563.1 ± 16.8 <sup>c</sup>	310.0 ± 29.1 <sup>a</sup>	450.8 ± 7.5 <sup>b</sup>	462.7 ± 8.7 <sup>bc</sup>	502.5 ± 25.7 <sup>cd</sup>	545.1 ± 49.7 <sup>dc</sup>
Brote 3*	481.5 ± 81.2 <sup>ab</sup>	1778.4 ± 130.8 <sup>d</sup>	991.2 ± 122.0 <sup>c</sup>	352.8 ± 71.7 <sup>a</sup>	646.5 ± 102.4 <sup>b</sup>	1575.3 ± 210.5 <sup>d</sup>

\* Muestreo al final del brote correspondiente

Letras diferentes en la misma fila indican diferencia significativa entre tratamientos (p=0.01)

**Cuadro 7.3.7 Actividad de Lacasas (UI/g sustrato seco) durante el cultivo de *A. bisporus*, en compostas con suplementos basados en salvado (Exp 1)**

ETAPA DEL CULTIVO	Lacasas UI/gSS					
	Composta no suplementada	SUPLEMENTO				
		Rendi plus (Control)	SALVADO	Salvado + Gluten	Salvado + Aceite	Salvado + Gluten+Aceite
Siembra	0.004 ± 0.0004 <sup>a</sup>	0.008 ± 0.0001 <sup>c</sup>	0.007 ± 0.0005 <sup>c</sup>	0.010 ± 0.0005 <sup>d</sup>	0.017 ± 0.0005 <sup>c</sup>	0.006 ± 0.0003 <sup>b</sup>
Inducción	53.3 ± 4.6 <sup>a</sup>	81.3 ± 14.7 <sup>b</sup>	78.5 ± 10.3 <sup>b</sup>	72.5 ± 10.5 <sup>h</sup>	71.3 ± 12.3 <sup>ab</sup>	88.6 ± 4.4 <sup>b</sup>
Brote 1*	1.5 ± 0.03 <sup>b</sup>	3.4 ± 0.1 <sup>d</sup>	2.2 ± 0.3 <sup>c</sup>	0.8 ± 0.1 <sup>a</sup>	2.4 ± 0.1 <sup>c</sup>	1.1 ± 0.2 <sup>a</sup>
Brote 2*	5.4 ± 0.8 <sup>b</sup>	6.0 ± 0.6 <sup>bc</sup>	10.1 ± 0.3 <sup>d</sup>	5.6 ± 0.4 <sup>bc</sup>	6.3 ± 0.3 <sup>c</sup>	4.6 ± 0.2 <sup>a</sup>
Brote 3*	28.8 ± 0.4 <sup>a</sup>	38.6 ± 1.9 <sup>b</sup>	40.0 ± 0.8 <sup>b</sup>	69.6 ± 3.9 <sup>d</sup>	57.4 ± 4.3 <sup>c</sup>	59.5 ± 3.5 <sup>c</sup>

\* Muestreo al final del brote correspondiente

Letras diferentes en la misma fila indican diferencia significativa entre tratamientos (p=0.01)

**Cuadro 7.3.8 Actividad de Lacasas (UI/g sustrato seco) durante el cultivo de *A. bisporus*, en compostas con suplementos basados en salvado (Exp 2)**

ETAPA DEL CULTIVO	Lacasas UI/gSS					
	Composta no suplementada	SUPLEMENTO				
		Rendi plus	SALVADO	Salvado + Gluten	Salvado + Aceite	Salvado + Gluten+Aceite
Siembra	0.001 ± 0.0003 <sup>ab</sup>	0.004 ± 0.001 <sup>c</sup>	0.002 ± 0.0004 <sup>bc</sup>	0.003 ± 0.0003 <sup>c</sup>	0.008 ± 0.001 <sup>d</sup>	0.001 ± 0.0002 <sup>a</sup>
Inducción	27.1 ± 0.6 <sup>a</sup>	33.1 ± 0.7 <sup>b</sup>	36.9 ± 1.0 <sup>c</sup>	32.2 ± 0.8 <sup>b</sup>	26.3 ± 1.6 <sup>a</sup>	26.4 ± 1.2 <sup>a</sup>
Brote 1*	0.5 ± 0.1 <sup>a</sup>	4.5 ± 0.2 <sup>d</sup>	2.3 ± 0.2 <sup>b</sup>	7.1 ± 0.2 <sup>e</sup>	2.3 ± 0.1 <sup>b</sup>	3.3 ± 0.8 <sup>c</sup>
Brote 2*	15.2 ± 0.8 <sup>d</sup>	5.9 ± 0.5 <sup>c</sup>	3.6 ± 0.2 <sup>b</sup>	1.5 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.2 ± 0.1 <sup>a</sup>	2.9 ± 0.5 <sup>b</sup>
Brote 3*	5.9 ± 0.3 <sup>b</sup>	2.9 ± 0.2 <sup>a</sup>	7.2 ± 0.03 <sup>c</sup>	12.0 ± 0.2 <sup>d</sup>	14.9 ± 0.2 <sup>c</sup>	11.6 ± 1.0 <sup>d</sup>

\* Muestreo al final del brote correspondiente

Letras diferentes en la misma fila indican diferencia significativa entre tratamientos (p=0.01)

### **7.3.9 Actividad de total de Proteasas (Experimento 1)**

El cuadro 7.3.9 muestra la actividad total de proteasas, la actividad más alta se presentó al final del segundo brote, la composta no suplementada tuvo la mayor actividad (65.8 UI/gSS), siendo diferente a todos los tratamientos, mientras que la menor actividad la presentó el suplemento Rp (25.6UI/gSS). Finalmente al tercer brote las proteasas del tratamiento SA presentaron la mayor actividad (29.0 UI/gSS) y el suplemento Rp tuvo la menor actividad (5.5 UI/gSS), para los tratamientos de composta no suplementada, SA y SGA no se encontraron diferencias.

### **7.3.10 Actividad de total de Proteasas (Experimento 2)**

En el cuadro 7.3.10 podemos observar que la actividad de proteasas del segundo experimento en los primeros muestreos (siembra, inducción y fin del primer brote) no tuvo una marcada diferencia. Al final del segundo brote es donde el tratamiento con base en S muestra una diferencia con el resto de los tratamientos (72.1 UI/gSS), el SG presentó el segundo más alto nivel de actividad (30.2 UI/gSS), finalmente el resto de los tratamiento no mostraron diferencias significativas entre ellos.

### **7.3.11 Actividad de total de Lipasas (Experimento 1 y 2)**

La actividad para lipasas mostró valores mínimos, para todos los tratamientos en todos los muestreos evaluados (Cuadro 7.3.11 y 7.3.12). En el experimento 1 la mayor actividad se presentó al inicio del cultivo sin mostrar diferencias estadísticas entre tratamientos, sin embargo, como en todos los demás casos esta actividad se redujo para finalmente no detectarse actividad en todos los tratamientos. En el Cuadro 7.3.12 se observa que la mayor actividad se presentó al final del primer brote para todos los tratamientos.

**Cuadro 7.3.9 Actividad de Proteasas (UI/g sustrato seco) durante el cultivo *A. bisporus*, en compostas con suplementos basados en salvado (Exp 1)**

ETAPA DEL CULTIVO	Proteasas UI/gSS					
	Composta no suplementada	SUPLEMENTO				
		Rendi plus (Control)	SALVADO	Salvado + Gluten	Salvado + Aceite	Salvado + Gluten+Aceite
Siembra	3.6 ± 0.1 <sup>a</sup>	4.4 ± 0.1 <sup>c</sup>	4.7 ± 0.1 <sup>d</sup>	5.3 ± 0.2 <sup>e</sup>	3.7 ± 0.1 <sup>a</sup>	4.0 ± 0.1 <sup>b</sup>
Inducción	1.7 ± 0.3 <sup>a</sup>	3.1 ± 0.3 <sup>b</sup>	3.0 ± 0.4 <sup>b</sup>	3.6 ± 0.5 <sup>b</sup>	3.8 ± 0.9 <sup>b</sup>	3.4 ± 0.2 <sup>b</sup>
Brote 1*	2.5 ± 0.4 <sup>a</sup>	4.5 ± 0.1 <sup>d</sup>	2.4 ± 0.4 <sup>a</sup>	3.3 ± 0.02 <sup>bc</sup>	3.8 ± 0.2 <sup>c</sup>	3.2 ± 0.6 <sup>b</sup>
Brote 2*	65.8 ± 4.0 <sup>e</sup>	25.6 ± 6.0 <sup>b</sup>	44.8 ± 6.2 <sup>b</sup>	43.3 ± 3.5 <sup>b</sup>	28.9 ± 1.5 <sup>a</sup>	31.8 ± 5.2 <sup>a</sup>
Brote 3*	12.6 ± 2.4 <sup>b</sup>	5.5 ± 0.6 <sup>a</sup>	22.9 ± 3.6 <sup>c</sup>	10.5 ± 1.9 <sup>b</sup>	29.0 ± 4.4 <sup>d</sup>	13.9 ± 2.6 <sup>b</sup>

\* Muestreo al final del brote correspondiente

Letras diferentes en la misma fila indican diferencia significativa entre tratamientos (p=0.01)

**Cuadro 7.3.10 Actividad de Proteasas (UI/g sustrato seco) durante el cultivo *A. bisporus*, en compostas con suplementos basados en salvado (Exp 2)**

ETAPA DEL CULTIVO	Proteasas UI/gSS					
	Composta no suplementada	SUPLEMENTO				
		Rendi plus	SALVADO	Salvado + Gluten	Salvado + Aceite	Salvado + Gluten+Aceite
Siembra	0.58 ± 0.02 <sup>d</sup>	0.25 ± 0.04 <sup>b</sup>	0.37 ± 0.04 <sup>c</sup>	0.17 ± 0.01 <sup>ab</sup>	0.24 ± 0.07 <sup>b</sup>	0.10 ± 0.01 <sup>b</sup>
Inducción	28.3 ± 0.02 <sup>a</sup>	32.1 ± 0.6 <sup>b</sup>	28.6 ± 2.0 <sup>a</sup>	28.6 ± 1.6 <sup>a</sup>	29.6 ± 2.1 <sup>ab</sup>	28.9 ± 1.5 <sup>a</sup>
Brote 1*	19.7 ± 3.5 <sup>b</sup>	19.0 ± 3.0 <sup>b</sup>	17.8 ± 2.7 <sup>b</sup>	9.3 ± 1.1 <sup>a</sup>	13.2 ± 1.1 <sup>a</sup>	10.2 ± 1.3 <sup>a</sup>
Brote 2*	12.3 ± 2.0 <sup>a</sup>	11.0 ± 1.5 <sup>a</sup>	72.1 ± 11.7 <sup>c</sup>	30.2 ± 4.2 <sup>b</sup>	12.3 ± 1.8 <sup>a</sup>	12.2 ± 2.3 <sup>a</sup>
Brote 3*	19.5 ± 5.0 <sup>bc</sup>	18.2 ± 1.8 <sup>b</sup>	15.7 ± 1.1 <sup>ab</sup>	18.1 ± 3.7 <sup>b</sup>	11.7 ± 2.1 <sup>a</sup>	24.9 ± 2.7 <sup>c</sup>

\* Muestreo al final del brote correspondiente

Letras diferentes en la misma fila indican diferencia significativa entre tratamientos (p=0.01)

**Cuadro 7.3.11 Actividad de Lipasas (UI/g sustrato seco) durante el cultivo *A. bisporus*, en compostas con suplementos basados en salvado (Exp 1)**

ETAPA DEL CULTIVO	Lipasas UI/gSS					
	Composta no suplementada	SUPLEMENTO				
		Rendi plus (Control)	SALVADO	Salvado + Gluten	Salvado + Aceite	Salvado + Gluten+Aceite
Siembra	0.030 ± 0.012 <sup>a</sup>	0.021 ± 0.018 <sup>a</sup>	0.029 ± 0.014 <sup>a</sup>	0.032 ± 0.009 <sup>a</sup>	0.028 ± 0.008 <sup>a</sup>	0.038 ± 0.012 <sup>a</sup>
Inducción	0.017 ± 0.011 <sup>a</sup>	0.014 ± 0.013 <sup>a</sup>	0.019 ± 0.010 <sup>a</sup>	0.013 ± 0.003 <sup>a</sup>	0.029 ± 0.016 <sup>a</sup>	0.013 ± 0.004 <sup>a</sup>
Brote 1*	0.004 ± 0.007 <sup>a</sup>	0.002 ± 0.002 <sup>a</sup>	0.010 ± 0.007 <sup>ab</sup>	0.006 ± 0.001 <sup>ab</sup>	0.014 ± 0.004 <sup>b</sup>	0.008 ± 0.001 <sup>ab</sup>
Brote 2*	0.003 ± 0.001 <sup>b</sup>	0.000 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.001 ± 0.0003 <sup>a</sup>	0.002 ± 0.0007 <sup>a</sup>	0.002 ± 0.0005 <sup>ab</sup>	0.002 ± 0.004 <sup>ab</sup>
Brote 3*	ND	ND	ND	ND	ND	ND

\* Muestreo al final del brote correspondiente ND= No Detectada

Letras diferentes en la misma fila indican diferencia significativa entre tratamientos (p=0.01)

**Cuadro 7.3.12 Actividad de Lipasas (UI/g sustrato seco) durante el cultivo *A. bisporus*, en compostas con suplementos a base de salvado (Exp 2)**

ETAPA DEL CULTIVO	Lipasas UI/gSS					
	Composta no suplementada	SUPLEMENTO				
		Rendi plus	SALVADO	Salvado + Gluten	Salvado + Aceite	Salvado + Gluten+Aceite
Siembra	ND	ND	ND	0.001 ± 0.004 <sup>a</sup>	0.004 ± 0.007 <sup>a</sup>	0.007 ± 0.004 <sup>a</sup>
Inducción	0.006 ± 0.003 <sup>a</sup>	0.009 ± 0.005 <sup>a</sup>	0.005 ± 0.003 <sup>a</sup>	0.004 ± 0.001 <sup>a</sup>	0.007 ± 0.002 <sup>a</sup>	0.008 ± 0.003 <sup>a</sup>
Brote 1*	0.007 ± 0.005 <sup>a</sup>	0.014 ± 0.002 <sup>a</sup>	0.010 ± 0.006 <sup>a</sup>	0.007 ± 0.0031 <sup>a</sup>	0.011 ± 0.007 <sup>a</sup>	0.008 ± 0.003 <sup>a</sup>
Brote 2*	0.001 ± 0.001 <sup>b</sup>	0.001 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.001 ± 0.001 <sup>a</sup>	0.002 ± 0.002 <sup>a</sup>	0.002 ± 0.0003 <sup>a</sup>	0.001 ± 0.0003 <sup>a</sup>
Brote 3*	0.005 ± 0.003 <sup>a</sup>	0.006 ± 0.003 <sup>ab</sup>	0.013 ± 0.002 <sup>c</sup>	0.008 ± 0.0003 <sup>ab</sup>	0.009 ± 0.002 <sup>b</sup>	0.009 ± 0.001 <sup>b</sup>

\* Muestreo al final del brote correspondiente ND= No Detectada

Letras diferentes en la misma fila indican diferencia significativa entre tratamientos (p=0.01)

## 8 DISCUSIÓN

La suplementación en el cultivo de *Agaricus bisporus* representa una oportunidad para incrementar los niveles de producción en la industria champiñonera. El análisis de la producción por brote y de la producción total acumulada en este trabajo mostró que los suplementos basados en una fuente de polisacáridos (S) tuvieron diferencias con respecto a la composta no suplementada, pero tuvieron una producción total menor con respecto a los tratamientos con una fuente de proteína y lípidos. A su vez, la combinación de polisacáridos con proteína (SG) y de polisacáridos con aceite (SA) presentaron un incremento en la producción. Finalmente, los tratamientos Rp y la mezcla de SGA, presentaron la mayor producción total, esto sugiere la importancia de una fuente simultánea de materiales ricos en proteína y lípidos para incrementar la producción.

De acuerdo a Royse *et al.*, (2007) el uso del suplemento SoyPlus®, de liberación lenta en un nivel de suplementación de 3.7% permitió una producción total de 25.7 kg/m<sup>2</sup>. Esta producción es similar a nuestro tratamiento de composta no suplementada; sin embargo, en el presente trabajo para los suplementos Rp y SGA la producción total que se encontró fue superior en 27%. La diferencia se observó en los valores ballados en los brotes sucesivos; en el primer brote, la producción con los suplementos propuestos, fue superior en un 10%; mientras que en el segundo brote, las producciones con suplementos (Rp, S, SG, SA y SGA) fueron superiores en 50%, y finalmente, los valores del tercer brote coinciden a lo reportado por estos autores.

Petrenko y Bisko (2002), con un suplemento basado en frijol de soya, incorporado a la siembra, reportan un incremento del 7% en la producción de *A. bisporus*, mientras que bajo las condiciones del presente estudio se logró un incremento del 28%. Esto puede estar relacionado con el uso de suplementos con alto nivel proteínico (frijol de soya), en los cuales el corrimiento se afecta por el sobrecalentamiento de la composta.

Dentro de las ventajas reportadas en el uso de suplementos se destaca la reducción de los tiempos para obtener la primera cosecha. En este trabajo se encontró que la cosecha se consiguió a los 32d para el 80 % de las bolsas inoculadas, estos valores pueden estar determinados por las

condiciones del cultivo (cepa, calidad de la composta y suplementos, temperatura, humedad, tierra de cobertura, riegos, ventilación, entre otros). Estos valores representan una ventaja si se comparan con lo reportado por Vijay *et al.* (2002) quienes obtuvieron que los días transcurridos para iniciar la cosecha son de 34 d, para el cultivo con suplemento y de 43 d para la composta no suplementada.

Trabajos Anteriores (Gerrits, 1986), mencionaron que se mejora el efecto de la suplementación al momento de aplicar los suplementos cuando se coloca la tierra de cobertura, sin embargo, esto estará en función de la calidad de la composta e instalaciones donde se cultiva, de forma que se evite el sobrecalentamiento del sustrato, bajo las condiciones de este experimento en el cual se suplemento a la siembra, los datos obtenidos indican que en todos los tratamientos, indistintamente de la fuente nutricional (proteína, lípidos, polisacáridos y sus mezclas) mostraron un efecto positivo al incrementar la producción con respecto a la composta no suplementada.

Como se mencionó el uso de suplementos debe de estar condicionado por la aplicación de algún tratamiento desinfectante, el cual evite contaminaciones tempranas en la composta, especialmente *Trichoderma*, *Aspergillus* y *Penicillium*, para las condiciones de nuestros experimentos no se observaron problemas de mohos competidores hasta los primeros dos brotes. La presencia de *Trichoderma* se notó al finalizar el cultivo, pero sin ser exclusivo de los tratamientos suplementados, esto sugiere que se tuvo una desinfección adecuada y una fuente de contaminación externa a las bolsas.

En cuanto a las actividades enzimáticas, se observó que la actividad de celulasas producidas por el micelio de *A. bisporus* mostró diferencias en la etapas de cultivo según el tipo de suplementación, pero se presentó una relación directa con los valores de producción y los niveles de actividad de estas enzimas. Es interesante notar que independientemente del tiempo donde se logró la máxima producción (Experimento 1, primer brote; Experimento 2, segundo brote) correspondió con los mayores niveles de celulasas para todos los tratamientos. Incluso para el último brote se presentaron valores de actividad de celulasas en el experimento 1 más bajos (4.5 y 6.6 UI/gSS) que en el experimento 2 (12.6 y 32.6 UI/gSS); esta diferencias también se



correlacionan con niveles de producción entre los dos experimentos: de 1.9 a 4 kg/m<sup>2</sup> (Exp 1) y de 4.3 a 7.9 kg/m<sup>2</sup> (Exp 2).

De acuerdo a Wood (1977) la actividad de las celulasas se diferencia de la actividad de las lacasas por que permanecen en bajos niveles hasta después de la aparición de los primeros cuerpos fructíferos. Este autor también señala que sí se presenta una relación entre los niveles de producción y la cantidad de celulasas producidas en la composta, de hecho cuando no se induce la formación de carpóforos los niveles de esta actividad no se incrementan.

Bajo las condiciones de este experimento los valores de actividad de celulasas para todos los tratamientos a los 48 d (final del segundo brote) mostraron valores desde 11 UI/gSS hasta 14.9 UI/gSS, este nivel de actividad fue similar a lo reportado por Ayala *et al.*, (2007), quienes evaluaron la actividad de esta enzima en extractos líquidos obtenidos de composta a los 50 d después de siembra, reportando una actividad de 17 UI/gSS. Estas diferencias pueden deberse a la calidad de la composta y al tiempo de muestreo, por consiguiente a la etapa de producción del cuerpo fructífero.

Los niveles de actividad de xilanasas indican un incremento en la actividad asociada con la colonización del sustrato sobre la composta, pero esta actividad enzimática se expresa aunque no se haga la inducción de los cuerpos fructíferos, sin que haya una relación con los incrementos en la producción (Wood, 1977).

En este trabajo los niveles de actividad de xilanasas presentaron valores variables con respecto al incremento en la producción en los dos primeros brotes para todos los tratamientos. Para la producción en el tercer brote en el caso de los tratamientos Rp la actividad de xilanasas se correlacionó la producción mayor en el tercer brote (7.9 y kg/m<sup>2</sup>). Qinnghé *et al.*, (2004) mencionaron que la producción de estas enzimas es estimulada en un medio rico en nitrógeno, de acuerdo a lo anterior, para los dos experimentos los valores de mayor actividad de esta enzima al final del ciclo de cultivo se encuentran en los tratamientos con Rp y SGA.

Por otro lado la mayor actividad de lacasas en todos los tratamientos se observó al momento de inducir la formación de los cuerpos fructíferos, esto coincide a lo reportado por otros autores (Leonard,1971; Wood y Goodenough 1977; Bonnen *et al.*,1994), quienes mencionaron que las lacasa participan en el metabolismo antes de que aparezcan los cuerpos fructíferos. Rimko *et al.*, (2003) sugieren que la actividad de esta enzima está relacionada a la degradación de la lignina de la composta para incrementar la disponibilidad de nutrientes (celulosa y hemicelulosa) para el crecimiento de *A. bisporus*.

De acuerdo a nuestros resultados los tratamientos Rp y SGA presentaron la mayor actividad de lacasas a la inducción, mostrando una relación con un incremento en la cantidad de cuerpos fructíferos para el primer brote. Los tratamientos donde los niveles de actividad estuvieron entre 53 y 81 UI/gSS representaron el número mayor de piezas para el primer brote (374 y 434), mientras que los tratamientos con valores de lacasas entre 27 y 33 UI/gSS representaron un número de piezas menor (272 y 306). Randle (1986) encontró que el micelio produce lacasas y crece favorablemente en respuesta a la suplementación de la composta.

En el transcurso del cultivo, después de la inducción, los niveles de actividad de lacasas declinan rápidamente, después de que aparecen los cuerpos fructíferos, aunque la actividad no desaparece completamente, esto concuerda a lo reportado por Wood y Fernor (1981). Según Salmones y Mata (2005) los valores de esta actividad se vuelven a incrementar al final del ciclo de cultivo cuando hay contaminación por *Trichoderma*, quizás como un mecanismo de defensa de *A. bisporus*.

En todos los tratamientos la actividad de proteasas por el micelio de *A. bisporus* mostró variaciones a lo largo del ciclo de cultivo, en ambos experimentos se observó que la actividad proteolítica es diferente de acuerdo a la etapa de cultivo. En el primer experimento todos los tratamientos mostraron mayor actividad al final del segundo brote, mientras que en el segundo experimento solo los tratamientos con S y SG mostraron ese mismo perfil, para el resto de los tratamientos (composta no suplementada, Rp, SA y SGA) la mayor actividad se presentó al momento de la inducción.

De acuerdo a los resultados obtenidos bajo las condiciones de este experimento los niveles de actividad para proteasas no están relacionados con los valores de producción. Esto concuerda a lo reportado por Burton *et al.*, (1994) quienes encontraron que la actividad proteolítica en el micelio permaneció baja y varió poco en el ciclo de cultivo, estos autores no excluyen la posibilidad de variaciones de las proteasas originadas por el micelio debido a que pueden tener varios roles en el mecanismo del ciclo, como control para regular los niveles de enzimas en el micelio o para generar componentes nitrogenados de bajo peso molecular para la nutrición del hongo. Wood y Goodenough (1977), evaluaron proteasas alcalinas en la composta de *A.bisporus* sin encontrar que los cambios en los niveles de actividad se asocien con la productividad.

Bajo las condiciones de análisis de lipasas en este trabajo, no se detectó dicha actividad de *A. bisporus*. Todos los tratamientos mostraron la misma tendencia, no se observó algún efecto en los niveles de esta actividad adicionando una fuente de aceite, es decir, la producción de lipasas por *A. bisporus* en la composta fue mínima (menor a 1 UI/gSS).

Bozom *et al.*, (1999) observaron que al adicionar materiales lipídicos al sustrato se logró un incremento del 20 al 60% en la producción. sin embargo, no se encontró una relación con el incremento en la producción y los niveles de actividad de lipasas. Al parecer la adición de lípidos en la composta y su incremento en la producción está asociado a la etapa de elaboración de la composta, en donde los organismos termofílicos aprovechan la fuente de aceite produciendo mayor proteína microbiana durante la fase II de composteo (Royse *et al.*, 1982).

## 9 CONCLUSIONES

En este trabajo se encontró un suplemento (basado en salvado de maíz, gluten y aceite de soya) capaz de lograr rendimientos de champiñón ( $\text{kg/m}^2$ ) similares a los que se obtuvieron con Rendi Plus (suplemento comercial). De la misma manera se evidenció la necesidad de los suplementos para aumentar los niveles de producción. Esto indica que *A. bisporus* requiere de una fuente de aceite y proteína de forma simultánea para producir un incremento en el rendimiento y que con una fuente de polisacáridos, como es el salvado, es posible formular un suplemento equivalente al tradicionalmente empleado a base de frijol de soya quebrada. Esto abre nuevas posibilidades para desarrollar fórmulas de suplementos alternos a los comerciales para la producción comercial de champiñones.

Durante el ciclo de cultivo los niveles de actividad enzimática mostraron diferencias entre tratamientos (distintas mezclas de suplementación) para un mismo tiempo de muestreo. Los niveles mayores de actividad de celulasas se presentaron al final del brote con mejor producción (1<sup>er</sup> brote experimento 1; 2<sup>o</sup> brote experimento 2), mostrándose una correlación entre los niveles de producción y la actividad enzimática, la cual disminuyó en los brotes subsecuentes. Entre tratamientos se encontraron diferencias en los niveles de actividad para cada tiempo de muestreo.

La actividad de xilanasas fue la mayor a los 61 d para los tratamientos con mejor producción (Rp y SGA), siendo estos tratamientos los que mostraron una producción para el 3<sup>er</sup> brote superior. Esta tendencia se presentó en los dos experimentos realizados, con la salvedad de que la producción con SGA en el experimento 2 no fue superior al resto de los tratamientos. Esto mostró que la actividad de xilanasas no estuvo directamente involucrada con los incrementos en la producción. Con estos resultados se observa que el proceso de maduración del champiñón está asociado a la acción de enzimas lignocelulolíticas, aunque es necesario evaluar otras posibles correlaciones entre las distintas actividades enzimáticas con variables de producción y calidad de los champiñones.

Los niveles de actividad enzimática para las lacasas mostraron diferencias entre los tiempos de muestreo. En todos los tratamientos los niveles más altos fueron al momento de inducir la

formación de cuerpos fructíferos (25 d). En el tratamiento con SGA se obtuvo el valor más alto comparado contra la composta no suplementada. Durante las siguientes etapas del cultivo los niveles de las lacasas disminuyen, sin desaparecer completamente, aunque la actividad se incrementó de nuevo para todos los tratamientos al fin del tercer brote (61 d). Esto sugiere que la actividad vuelve a incrementarse debido a un mecanismo de defensa de *A. bisporus* contra la posible invasión en el sustrato de mohos antagonistas.

La actividad de proteasas no mostró correlación con los niveles de producción en las diferentes etapas. Las diferencias en el rendimiento podrían estar establecidas por el tipo de suplementación, mostrando una característica en la variación de actividades de las enzimas degradantes de sustrato a lo largo del ciclo de cultivo.

## 10 RECOMENDACIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos bajo las condiciones de este experimento, es recomendable aplicar algún tratamiento de desinfección de los materiales alternos en la suplementación, considerando también la calidad de la composta. Por otro lado, es necesario ampliar las pruebas con los ingredientes propuestos en esta tesis, por ejemplo, moviendo la concentración de la suplementación, monitoreando la temperatura del sustrato, la producción y número de piezas obtenidos. Se recomienda realizar un análisis químico proximal a la composta a través del ciclo de cultivo para conocer el consumo de materia orgánica por parte de *A. bisporus*. Es importante también realizar un estudio de costos para conocer el beneficio económico obtenido con el uso de estos nuevos materiales, similarmente se podrían obtener enzimas de interés biotecnológico.

## 11 REFERENCIAS

- **Aguilar**, A. Ana. 2001. La Biotecnología de producción de hongos comestibles: alternativa para el desarrollo agrícola y rural en México. Tesis Doctor en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Puebla, 2001. Especialidad de postgrado: Estrategias para el Desarrollo Agrícola Regional.
- **Alexopoulos**, C. J.; Mims CH. W. 1985. Introducción a la micología. Ediciones Omega S.A. Barcelona España. pp. 1-5; 421 -427; 453- 473.
- **Álvarez**, De la Cuadra Jacobs. 1992. Biotecnología hoy. CONACYT, SEP. México. pp. 67-82.
- **Amycel**, 2007. En línea: <http://amvcel.com/> Visitado el 03 de Diciembre 2007.
- **AOAC**. 1980. Official Methods of Análisis. 13<sup>th</sup> edn. Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C.
- **Ávila**, Mayo Horacio. 2005. Enzimas fibrolíticas de *Pleurotus ostreatus* y su actividad en rastrojo de maíz. Tesis de la Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Programa de Ganadería.
- **Ayala**, Maricela; Sergio González; Carlos Vázquez; Germán Mendoza; Marcos Meneses; Octavio Locra. 2007. Actividad enzimática de extractos líquidos del residuo de cosecha de *Agaricus bisporus* cultivados en fermentación sólida. XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Morelia, México Junio 2007.
- **Baldrian**, Petr; Jiri Gabriel. 2003. Lignocellulose degradation by *Pleurotus ostreatus* in the presence of cadmium. FEMS Microbiology Letters 220: 235-240.
- **Beyer**, David M.; Harry Muthersbaugh. 1996. Nutrient supplements that influence later break yield of *Agaricus bisporus*. (En línea) <http://www.mushworld.com/search/search.asp?menu=O&so=t> (visitado el 03 de septiembre de 2007).
- **Bonnen**, Alice, M.; Lori H. Antón; Ann B. Orth. 1994. Lignin-Degrading Enzymes of the Commercial Button Mushroom, *Agaricus bisporus*. Applied and Environmental Microbiology. 60 (3): 960-965.
- **Boozom**, Pascale M.; Anna Nicolaou; M. Wilfred; William A. Gibbons. 1999. NMR Lipid profile of *Agaricus bisporus*. Phytochemistry 50 (8): 1311-1321.

- **Bradford**, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- **Braverman**, J.B.S. 1980. *Introducción a la bioquímica de alimentos*. Ed. El manual moderno S.A. de C.V. México D.F.- Santafé de Bogotá.
- **Burton**, Kerry S; Jonh B.W. Hammond; Takahisa Minamide. 1994. Protease activity in *Agaricus bisporus* during periodic fruiting (flushing) end sporophore development. *Current Microbiology* 28: 275-278.
- **Carroll**. A.D.; L.C. Schisler. 1976. Delayed release nutrient supplement for mushroom culture. *Applied Environmental Microbiology* 31: 499-503.
- **CCI. 2007**. Corporación Colombiana Internacional. Bogota, Colombia. Setas y hongos. (En línea)  
[http://www.agronet.gov.co/www/docs\\_agronet/200511314480\\_perfil\\_producto\\_setas.pdf](http://www.agronet.gov.co/www/docs_agronet/200511314480_perfil_producto_setas.pdf)  
(visitado el 03 de septiembre de 2007).
- **Chacón**, Ovando S.L.; K.N. Waliszewski. 2005. Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. *Universidad y Ciencia* 21 (42): 113-122.
- **Chao**, Ema E.; Hans E. Gruen. 1987. Intracellular activity of mycelial proteinases during fruit-body development in *Flammulina velutipes*. *Canadian Journal Botanical* 65 (3): 518-525.
- **Chaplin**, M.F.1986. Monosaccharidos. *Carbohydrate Analysis. A practical approach*. Press, England. p 1-36.
- **Dahlberg**, Kart R. 2004. Carbohydrate-Based Mushroom Supplements. *Mushroom News* 52 (7): 6-10.
- **De Groot**, Piet W.J.; Danielle E.J.W.; Basten A.; S.M. Sonnenberg.; Leo J.L.D van Griensven; Jaap Visser y Peter J. Schaap. 1998. An Endo-1,4-β-Xylanase-encoding Gene from *Agaricus bisporus* is regulated by compost-specific factors. *Journal of Molecular Biology*. 277 (2): 273-284.
- **Deshpande**, V. 1991. Proteinase in fungal morphogenesis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 8(3): 242-250.
- **Díaz**. Zagoya J.C.; Hicks Gómez J.J. 1995. *Bioquímica*. Interamericana, McGraw Hill. México. p. 80-142.



- **Fiore, P.** y Albarracín M. 1997. Compost y tierra de cobertura para el cultivo del champiñón (*Agaricus brunnescens* Peck., *A. bisporus*). Rev. FAC. Agron. (LUZ) 1998, 15: 230 - 241. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía.
- **García, M. I;** M.P. Rizo; F.Cruz: M. Gutiérrez; A. Larqué-Saavedra. 1997. Evaluación de la presencia de reguladores de crecimiento vegetal en una muestra no convencional (composta). Productos Naturales. Vol. 3: Perspectivas Biotecnológicas. 1997, p 116-128 UAM. Iztapalapa.
- **Gayosso, Canales Martha.** 2001. Caracterización de los componentes de un extracto de primordios de *Pleurotus ostreatus* que inducen su fructificación. Tesis de Maestría en Ciencia: Área Biotecnología. Universidad de Colima. Julio 2001.
- **Gea, A.** Francisco J.; Tello M.J. 1997. Micosis del cultivo del champiñón. Ediciones Mundi-Prensa, España.
- **Gerrits, J.P.G.** 1986. Supplementation with formaldehyde treated Soya bean meal. Mushroom Journal 61: 169-174.
- **Guzmán, Gastón.** 1985. Hongos. Ed. Limusa. México pp. 3 - 12.
- **Hellmut, Steineck.** 1987. Cultivo comercial del champiñón. Zaragoza, España. Ed Acribia. 142 pp.
- **Kapich, A.N.;** Prior B.; Botha A.; Galkin S; Lundell T, Hatakka A. 2004. Effect of lignocellulose-containing substrate on production of ligninolytic peroxidases in submerged cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. Enzyme Microbiology Technology 34: 187-195.
- **Kenji, Iiyama;** Bruce A. Stone; Barry J. Macauley. 1994. Compositional Changes in Compost during Composting and Growth of *Agaricus bisporus*. Applied and Environmental Microbiology. 60 (5): 1538-1546.
- **Kues, Ursula.** 2000. Life history and development processes in the basidiomycete *Coprinus cinereus*. Microbiology and Molecular Biology 64 (2): 316-353.
- **Lahmann, Oscar.** 2007. Evolución de la industria del champiñón *Agaricus bisporus* en Latinoamérica. José E. Sánchez, Daniel J. Royse y Hennifer Leal Lara (eds). Colegio de la Frontera Sur. Tapachula, Chiapas. México. Noviembre 2007. p 167 - 177.

- **Leake, J.R.;** Read D.J. 1990. Proteinase activity in mycorrhizal fungi. II The effects of mineral and organic nitrogen sources on induction of extracellular proteinase in *Hymenoscyphus ericae* (Read) Korf & Kernan. *New Phytol.* 116: 123-128.
- **Leonard, T.J.** 1971. Phenoloxidase activity and fruiting body formation in *Schizophyllum commune*. *Journal Bacteriology* 106: 162-167.
- **Loera, Octavio;** Córdova Jesús. 2003. Improvement of xylanase production by a parasexual cross between *Aspergillus niger* strains. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 46 (2): 177-181.
- **Martínez-Carrera, D.;** P. Morales; M. Sobal; M. Bonilla; W. Martínez. 2007. México ante la globalización en el siglo XXI: el sistema de producción consumo de los hongos comestibles. Capítulo 6.1, 20 pp. *In: El Cultivo de Setas Pleurotus spp. en México.* J.E. Sánchez, D. Martínez-Carrera, G. Mata y Hermilo Leal (Eds.). ECOSUR-CONACyT, México D.F.
- **Membrillo, Isabel;** Carmen Sánchez; Marcos Mencses; Ernesto Favela; Octavio Loera. 2005. Effect of substrate particle size and additional nitrogen source on production of lignocellulolytic enzymes by *Pleurotus ostreatus* strains. XI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Mérida, México Septiembre 2005.
- **Meraz-Romero, Edgar;** Sergio S. González-Muñoz; Germán D. Mendoza-Martínez; Marcos Mencses-Mayo; Mario A. Cobos-Peralta; Octavio Loera. 2006. Buffer pH clarified ruminal liquid effects on stability o fan exogenous fibrolytic enzyme. ADSA-ASAS Joint Annual Meeting. Minneapolis, Minesota, USA. Julio 2006.
- **Miller, G.L.** 1959. The use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry.* 31: 426-428.
- **Montgomery, Douglas.** 2003. Diseño y análisis de experimentos. Ed. LIMusa Willey. Segunda edición. Arizona, USA.
- **Moore, David;** Jonathan B.L.; Peter W.; David L. 1998. Fungal Morphogenesis. *Development and cell Biology serics.* Cambridge University Press. p 71-133
- **Moore, D.;** S W. Chiu. 2002. Tropical Mycology. Macromycetes. Ed. CABI Publishing. Watling Roy, J.C. Frankland. A.M. Ainswort. S. Isaac. c.H. Robinson (eds). pp 167-182.
- **Nieto, T. A. Ellis.** 1986. Characterization of extracelular metallo and serine proteases of *Aeromonas hydrophila*. *Gen. Microbiology* 132: 1975-1979.

- **Pandey**, Ashok. 2004. Concise Encyclopedic of Bioresource Technology. Ed. The Worth Press. 2004, New York. p. 265-278.
- **Papinutti**, Victor Leandro; Luis A. Diorio; Flavia Forchiassin. 2003. Degradación de la madera de álamo por *Fomes sclerodermeus*: producción de enzimas ligninolíticas en aserrín de álamo y cedro. Revista Iberoamericana de Micología 20: 16-20.
- **Petrenko**, B.F.; N.A. Bisko. 2004. Influence of the addition of soybean supplements to the compost on the yield of *Agaricus bisporus*. Science and Cultivation of edible and medicinal fungi. Rinker & Royse (eds), Romaine, Keil.
- **Ponee**, Noyola T.; Pérez Avalos O. 2002. Celulasas y Xilanasas en la industria. XXX Aniversario de Biotecnología y Bioingeniería. Avance y perspectiva 21: 273-276.
- **Purkharthofer**, H.; M. Sinner; W. Steiner. 1993. Cellulase-free xylanase from *Thermomyces lanuginosus*: Optimization of production in submerged and solid state culture. Enzyme Microbiology Technology 15: 677-682.
- **Qinnghe**, Cai; Yue Xiaoyu; Niu Tianguai; Ji Cheng; Ma Qiugang. 2004. The screening of culture condition and properties of xylanase by white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. Process Biochemistry 39: 1561-1566.
- **Randle**, Phyllis. 1986. Mushroom yield response to supplementation of synthetic composts at spawning. Scientia Horticulturae. 29: 309-315.
- **Rimko**, Ten Have; Hilde Wijgaard; Nicole A.E Aries-Kronenburg; Gerben Straatsma; Peter J. Schaap. 2003. Lignin degradation by *Agaricus bisporus* accounts for a 30% increase in bioavailable holocellulose during cultivation on compost. Journal Agricultural & Food Chemistry 51: 2242-2245.
- **Rinker**, D.L. 1991. Alternative additives, supplements, and casing amendments for *Agaricus bisporus*. Science and Cultivation of edible fungi. Maher (Ed.), Balkema, Rotterdam. p 781-789.
- **Royse**, Daniel J.; Sanchez J.E.; Robert B. Beelman; James Davidson. 2007. Re-supplementing and re-casing mushroom (*Agaricus bisporus*) compost for a second crop. World Journal Microbiology & Biotechnology. En línea <http://www.springerlinf.com/content/> (visitado el 16 de Agosto de 2007).
- **Royse**, Daniel. 2007a. Consumo y producción de *Agaricus bisporus* en el mundo. Cuiivo, Mercadotecnia e Inocuidad Alimenticia de *Agaricus bisporus*. José E. Sánchez, Daniel J.

- Royse y Hermilo Leal Lara (eds). Colegio de la Frontera Sur. Tapachula, Chiapas. México. Noviembre 2007. p 7 - 17
- **Royse**, Daniel J.; S.L. Fales; K. Karunanandaa. 1991. Influence of formaldehyde-treated soybean and commercial nutrient supplementation on mushroom (*Pleurotus sajor-caju*) yield and un vitro dry matter digestibility of spent substrate. Applied Microbiology & Biotechnology 36: 425-429.
  - **Royse**, Daniel J.; L.C. Schisler; P.J. Wuest. 1982. Spawning to casing in comercial mushroom production. Penn State Handbook for commercial mushroom growers. Paul J. Wuest & Glenn D. Bengtson (eds). p 43-48.
  - **Salmones**, Dulce; Gerardo Mata. 2005. Efecto de la presencia de compuestos solubles de lignina y fenoles sobre la producción de lacasa y biomasa en cultivos de *Pleurotus* spp. Revista Mexicana de Micología 21: 63-69.
  - **Sánchez**, V. Ernesto; Royse D.J; Hernández G. 2004. Desarrollo de substratos no composteados para la producción de *Agaricus bisporus*. Rev. Tips.2004.
  - **Sánchez**, Tito; Jorge León; Juan Woolcott; Catherine Arauco. 2004a. Proteasas extracelulares producidas por bacterias marinas aisladas de aguas contaminadas con efluentes pesqueros. Revista Peruana de Biología 11 (2): 179 -- 186.
  - **Schisler** , L.C.; J.W. Sinden. 1962. Nutrient supplementation of mushroom compost at spawning. Mushroom Science 5: 150-164.
  - **Stamets**, Paul. 1993. Growing gourmet & medicinal mushroom. Ed.Ten Speed Press & Mycomedia. Berkeley, CA. 553 pp
  - **Stoller**, B.B. 1979. Synthetic casing for mushroom beds. Mushroom Science 10 (2): 187-286.
  - **Sylvan**, 2007. En línea <http://www.silvaninc.com/Products/supplements.html> Visitado el 03 de Diciembre de 2007
  - **Turner**. E.M. 1974. Phenoloxidase activity in relation to substrate and development stage in the mushroom *Agaricus bisporus*. Trans. British Mycol. Soc. 63: 541-547.
  - **Van Griesven**, L.J.L.D. 1988. The cultivation of mushroom. History and development. Mushroom Experimental Station, Horst, The Netherlands, 515 pp

- **Vázquez**, G.M.; A. Alemán; N.G. Arozarena; A. Carmona; J.M. Barba; R.G. Campos. 1997. Estudio comparativo de compostas II. Análisis microbiológico. Productos Naturales. Perspectivas Biotecnológicas. 3: 129-132
- **Vedder**, P.J.C. 1996. Cultivo moderno del champiñón. Ediciones Mundi-Prensa. Barcelona, España.
- **Vijay**, B.; S.R. Sharma; T.N. Lakhanpal. 2002. Effect of treating post-composting supplements with different concentrations of formaldehyde on the yield of *Agaricus bisporus*. The 4<sup>th</sup> ICMBMP. World Society and Mushroom Biology Mushroom products.
- **Vladimir**, Elisashvili; Michel Penninckx; Eva Kachlishvili; Mikheil Asatiani; Giorgi Kvesitadze. 2006. Use of *Pleurotus dryinus* for lignocellulolytic enzymes production in submerged fermentation of mandarin peels and tree leaves. Enzyme and Microbial Technology 38: 998-1004.
- **Wach**, M.P.; Wheeler D.W. 1998. Mushroom supplements: what they are & why we use them. Mushroom News 46 (7): 10-16.
- **Wainwright**, M. 1995. Introducción a la Biotecnología de los Hongos. Ed. Acirbia, S.A. España.
- **Wayne**, W. Daniel. 2005. Bioestadística: Bases para el análisis en ciencias de la salud. Ed. LIMUSA, Wiley. Cuarta edición en español.
- **Weil**, D.A.; R.B. Beelman; D.M. Beyer. 2004. Effect of adding a micronutrient-rich supplement to compost on yield and quality of *Agaricus bisporus*. Science and Cultivation of edible and medicinal fungi. Rinker & Royse (eds), Romaine, Keil. p 365-371.
- **Whiteford**, J.R.; David A. Wood; Christopher F. Thurston. 2000. Characterization of Xylanases produced in liquid and compost cultures of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. Mycological Research, 104 (7): 810-819.
- **Wood**, D.A.; P. W. Goodenough. 1977. Fruiting of *Agaricus bisporus*. Changes in extracellular enzyme activities during growth and fruiting. Archives of Microbiology 114: 161-165.
- **Wood**, D.A. 1980. Production, purification and properties of extracellular laccase of *Agaricus bisporus*. Journal Gen. Microbiology 117: 327-338.

- **Wood, D.A.;** T.R. Fermor. 1981. Nutrition of *Agaricus bisporus* in compost. Mushroom Science XI. Proceedings of the eleventh International Congress on the Science and Cultivation of edible fungi. Australia. p 63-71.
- **Wuest, Paul j.;** David Beyer. 1996. Manufactured and recycled materials used as casing in (*Agaricus bisporus*) mushroom production. Mushroom Biology and Mushroom products. Royse (ed). 1996 Penn State University.

## 12 ANEXOS

### CURVA ESTÁNDAR DE CELULASAS

A partir de una solución de glucosa 10 mM diluida en buffer de citratos 50 mM (pH 4.8) y con los datos obtenidos de las lecturas de absorbancia ( $\lambda$  540 nm) se elaboró la siguiente curva de calibrado para glucosa (Figura 4).

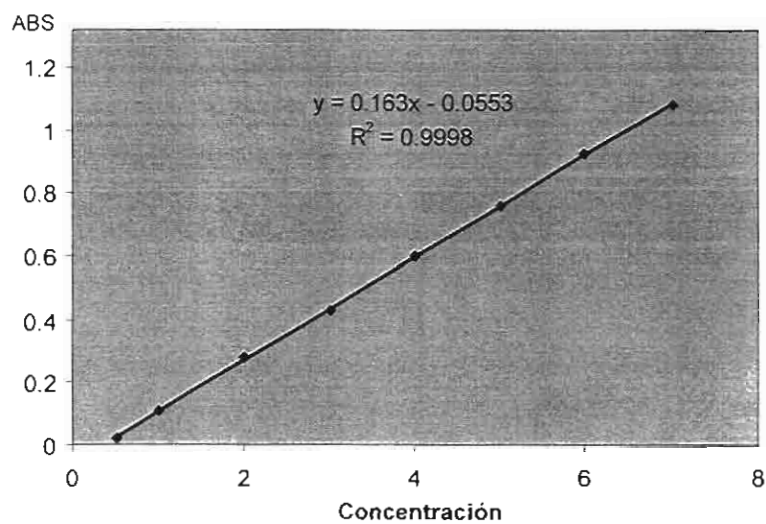


Fig 4. Curva estándar de celulasas (glucosa  $\mu\text{mol/mL}$ .)

Para todas las curvas estándar realizadas (glucosa, xilosa, seroalbúmina, tirosina y *p*-Nitrofenol), a partir de las figuras se obtuvo la línea de regresión, los parámetros de la pendiente y la ordenada al origen de la ecuación de la recta.

$$y = mx + b$$

Donde:

y = absorbancia

x = concentración de azúcares reductores

b = ordenada al origen

## CURVA ESTÁNDAR DE XILANASAS

Se utilizó una solución de xilosa 10 mM diluido en buffer de citratos 50 mM (pH 5.3). A partir de la media de la absorbancia ( $\lambda$  540 nm) se elaboró la curva estándar para xilosa. La Figura 5 representa los valores que se utilizaron para el cálculo de las absorbancias.

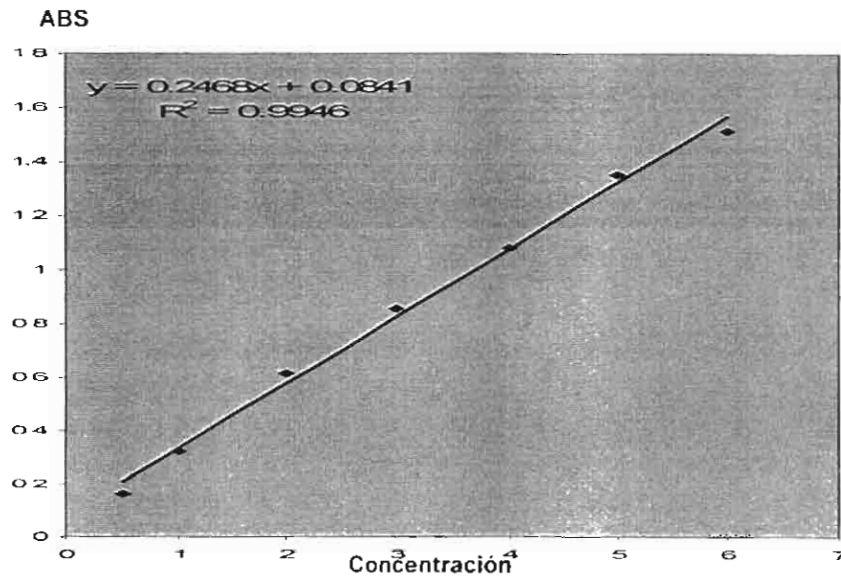


Fig 5. Curva estándar de xilanasas (xilosa  $\mu\text{mol/mL}$ ).



## CURVA ESTÁNDAR DE PROTEÍNA SOLUBLE

A partir de una solución de seroalbúmina (BSA) bovina (1mg/1mL) diluida en buffer de citratos 50 mM (pH 5.3), se elaboró la curva estándar para BSA (Figura 6). La curva se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por Bradford (1976).

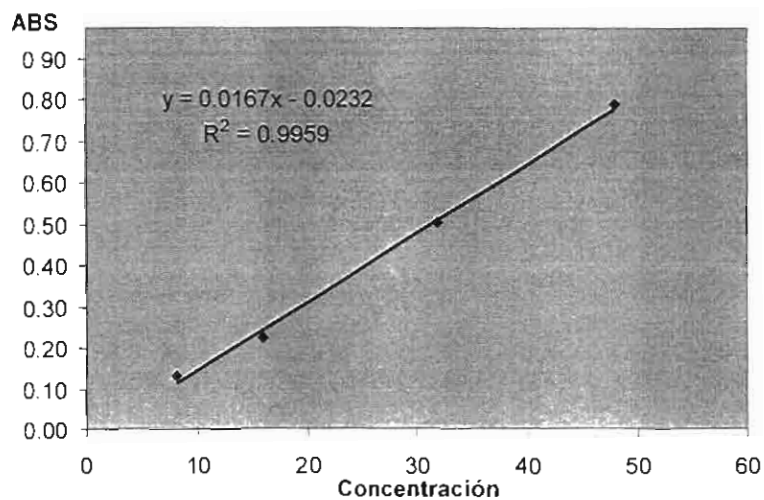


Fig 6. Curva estándar de proteína soluble (µg/mL)

### CURVA ESTÁNDAR DE PROTEASAS

Se elaboró la curva estándar para tirosina (Figura 7). A partir de una solución de tirosina (18.10 µg) diluida en HCl 0.2 M. Con NaOH se ajustó el pH (5.3).

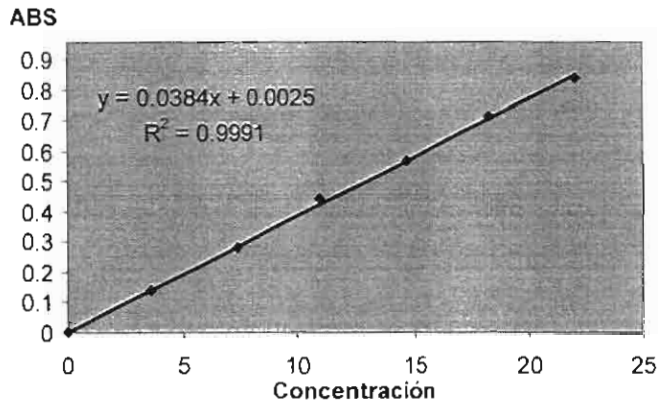


Fig 7. Curva estándar de proteasas (µg/mL)

### CURVA ESTÁNDAR DE LIPASAS

A partir de una solución de *p*-Nitrofenol (*p*-NP) 10 mM, diluido en 2- propanol se elaboró la curva estándar para *p*-NP (Figura 8).

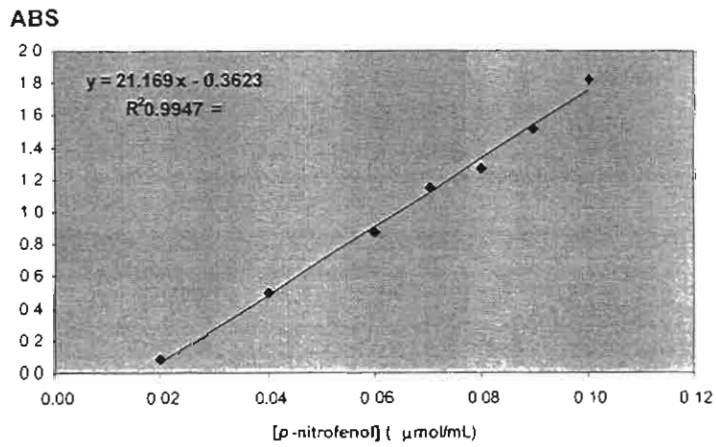


Fig. 8. Curva estándar lipasas

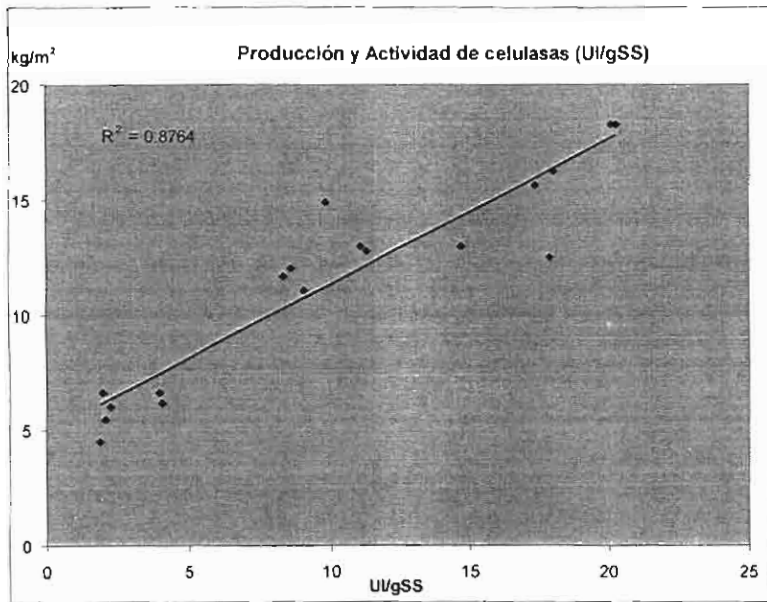


Fig. 9. Coeficiente de determinación entre producción y niveles de actividad de celulasas. Exp 1

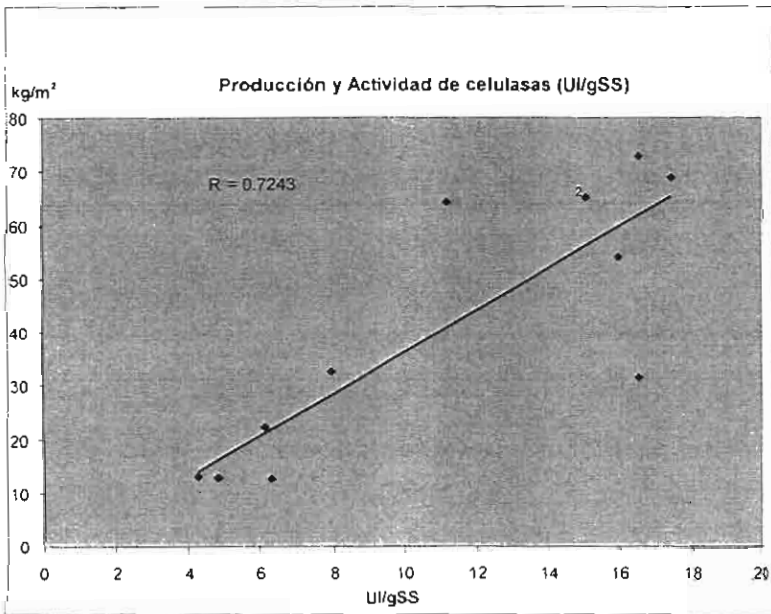


Fig 10. Coeficiente de determinación entre producción y niveles de actividad de celulasas. Experimento 2 (2º y 3º brote)