



Uso de basidiomicetos nativos en la biotransformación del pasto buffel (*Cenchrus ciliaris*) para mejorar la calidad nutricional

Use of native Basidiomycetes in the biotransformation of buffel grass (*Cenchrus ciliaris*) to improve the nutritional quality

Guadalupe Estefanía Medina González¹, Hugo Bernal Barragán¹, Carlos E. Hernández-Luna²,
Carlos A. Hernández-Martínez¹, Guadalupe Gutiérrez-Soto¹

¹Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Agronomía, Laboratorio de Nutrición y Calidad de Alimentos. Francisco Villa s/n Ex Hacienda El Canadá, CP. 066054, Gral. Escobedo, N. L., México. ²Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Química. Laboratorio de Enzimología. Av. Pedro de Alba esq. Av. Manuel Barragán. Ciudad Universitaria, CP 66451, San Nicolás de los Garza, N. L., México

RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó la capacidad de tres basidiomicetos lignocelulolíticos nativos del Noreste de México para producir enzimas degradadoras de los principales componentes de la pared celular vegetal, así como su potencial en la biotransformación de pasto buffel (*Cenchrus ciliaris*) para mejorar su calidad nutrimental. En medio sólido se determinó el potencial lignocelulolítico y los títulos de celulasas, xilanasas y lacasas. Se realizó biotransformación en bloques de pasto buffel y el análisis de fibra y proteína a los 30 días de fermentación. Se observó que los basidiomicetos redujeron el contenido de fibra detergente neutro (NDF) en los bloques tratados. *Trametes maxima* mostró mayor capacidad lignolítica, ya que redujo el 14.2% del contenido de lignina del pasto. *Pycnoporus sanguineus* CS2 y *T. hirsuta* CS5 disminuyeron el contenido de celulosa (21.6 y 19.8% respectivamente), y hemicelulosa (17.1 y 14.2% respectivamente), con respecto al control. El tratamiento con los hongos *P. sanguineus* CS2 y *T. hirsuta* CS5 incrementó en 31% el contenido de proteína del pasto. Estos resultados sugieren que las cepas nativas de basidiomicetos incrementan la biodisponibilidad de nutrientes del pasto buffel y por consiguiente mejoran su calidad nutricional.

PALABRAS CLAVE: celulasas, lacasas, *Trametes* spp., xilanasas

ABSTRACT

The aim of the present work was to evaluate the capability of three native basidiomycetes from the Northeast region of Mexico to produce enzymes able to break down the main components of plant cell wall and their effect on the biotransformation of buffel grass (*Cenchrus ciliaris*) in order to increase its nutritional quality. Lignocellulolytic potential was evaluated on solid media and the biotransformation of buffel grass slabs was performed. Titer of cellulases, xylanases, and laccases were determined, as well as the fiber and protein content in the slabs. The basidiomycete reduced neutral detergent fiber (NDF) content on treated slabs. *Trametes maxima* CU1 showed the greatest lignolytic capability reducing 14.24% the lignin content of grass. *Pycnoporus sanguineus* CS2 and *T. hirsuta* CS5 reduced the content of cellulose (21.6 and 19.8% respectively), and hemicellulose (17.1 and 14.2% respectively) in comparison to the control. Treatment with fungi *P. sanguineus* CS2 and *T. hirsuta* CS5 increased in 31% the protein content of grass. These results denote that basidiomycetes increased nutrients bioavailability of buffel grass, hence increasing its nutritional quality.

KEYWORDS: cellulases, laccases, *Trametes* spp., xylanases

Recibido / Received: 22/02/2015

Aceptado / Accepted: 22/04/2016

Autor para correspondencia / Corresponding author:

Guadalupe Gutiérrez Soto
ggutierrez0402@gmail.com

En las regiones tropicales y subtropicales, la alimentación del ganado bovino, ovino y caprino está basada en los pastos y forrajes, debido a la eficiencia con la cual estos animales digieren el material vegetativo y por ser un insumo más económico que los alimentos concentrados. El pasto buffel (*Cenchrus ciliaris* L.) es un recurso forrajero introducido en el Noreste de México, que cubre aproximadamente 1,000,000 ha (Gómez-de la Fuente *et al.*, 2007). Sin embargo, se ha detectado variabilidad en el contenido proteico y en los valores de digestibilidad de su pared celular, dependiendo de la variedad y del estadio fisiológico en el que se cosecha. Además de bajos valores de contenido nutricional en condiciones de sequía y de latencia invernal (Bernal *et al.*, 2009), afectando el aporte proteico y energético a los animales que lo consumen.

Lo anterior ha llevado a buscar estrategias que mejoren la disposición de componentes para incrementar su valor nutricional. Un ejemplo son las enzimas lignocelulolíticas para desarrollar preparaciones comerciales aplicables en dietas de animales (Beauchemin *et al.*, 2003), contribuyendo a una mejor asimilación, mejorando la producción de leche y la conversión alimenticia.

La producción de estas enzimas se ha limitado a pocas cepas de hongos, a pesar de que se han reportado diferencias en el tipo de enzimas presentes, así como en sus propiedades funcionales y cinéticas, incluso en individuos de la misma especie (Baldrian, 2005). En el presente trabajo se exploró el potencial lignocelulolítico, de carbohidrasas y amilolítico de cepas nativas de *Trametes maxima* CU1, *Pycnoporus sanguineus* CS2 y *T. hirsuta* CS5, para su potencial aplicación en el incremento de la biodisponibilidad de nutrientes del pasto buffel; como referencia se utilizó una cepa de *T. versicolor* UAMH8272.

Las tres cepas nativas utilizadas para el presente trabajo fueron reportadas previamente como buenas productoras de celulasas, xilanasas y lacasas en medio sólido (Gutiérrez-Soto *et al.*, 2015). Sin embargo, esta fue realizada cualitativamente utilizando una escala de signos en función del crecimiento y área de reacción, lo que no permitió hacer un análisis estadístico de los datos obtenidos. Por lo que en el presente trabajo se propone la estimación de un índice de actividad enzimática (I_{ae}) que arroje datos que puedan ser analizados estadísticamente, contribuyendo a una mejor comprensión del comportamiento metabó-

lico de los hongos y explorar su aplicación en el mejoramiento de la calidad nutrimental del pasto buffel.

El ensayo se realizó de acuerdo a la metodología de Sin *et al.* (2002), usando un medio base (Peptona 0.1%, Extracto de levadura 0.01% y Agar 1.6%). Como fuente de carbono se utilizaron los sustratos carboximetil celulosa, xilano y almidón (al 2%), para la detección de celulasas, xilanasas y amilasas, respectivamente. Éstas se revelaron al tercer día utilizando una solución de yodo-yoduro de potasio. Se midió el diámetro de crecimiento e hidrólisis para calcular un índice de actividad enzimática (I_{ae}). El I_{ae} para la lacasa, se estimó considerando la oxidación de la siringaldazina (0.02%) en el medio base. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. La detección de enzimas modificadoras de lignina (EML) fue realizada en el medio base con el colorante Poly R-478 0.04%, cuya degradación total en menor tiempo fue asociado a un alto potencial lignolítico (Hernández-Luna *et al.*, 2008). Los datos se analizaron con un modelo estadístico no paramétrico (Kruskal-Wallis) al día 3, 5, 7 y 15.

Posteriormente se prepararon 8 bloques de 300 g de pasto buffel, con un tamaño de partícula de 1 cm, el sustrato se colocó en bolsas de polipropileno. Se esterilizaron en dos ocasiones a 121 °C, por 60 minutos, se dejaron enfriar y se inocularon con 5 mL de un cultivo de cinco días de crecimiento (homogenizado en cuatro ciclos de 25 segundos), de cada uno de los aislados; se consideró un tratamiento control sin inóculo. Se tomaron muestras de 10 g de cada bloque por tratamiento a la cuarta semana de biotransformación para determinar las fracciones de fibra (celulosa, hemicelulosa, lignina), contenido de materia seca (MS) y proteína. El contenido de NDF (Fibra detergente neutro) y ADF (Fibra detergente ácido) se determinó utilizando el analizador de fibra ANKOM²⁰⁰⁰ (Ankom Technology, EUA) con la técnica propuesta por Van Soest *et al.* (1991). Por medio de un análisis de varianza (ANOVA) se compararon los resultados de I_{ae} , contenido de MS, NDF, ADF, celulosa, hemicelulosa, lignina y proteína.

En paralelo se cuantificaron los títulos de las carbohidrasas CMCasas, Avicelasas, β -D-glicosidasas y xilanasas (Miller, 1959), así como de lacasa (Abadulla *et al.*, 2000) presentes en los bloques al día 8 al 30.

En la Tabla 1 se muestran los resultados de la producción de celulasas, xilanasas, y lacasas de las cepas nativas y de la cepa de



referencia *Trametes versicolor* en medio sólido. En la producción de celulasas, las tres cepas nativas mostraron diferencias significativas con respecto a la cepa de referencia. *Pycnoporus sanguineus* CS2 y *T. maxima* CU1 fueron las mejores productoras de celulasas, seguidas por *T. hirsuta* CS5. En la producción de xilanasas *T. hirsuta* CS5 fue la de mejor desempeño ($p < 0.05$). Todas las cepas produjeron lacasa, sin embargo *T. maxima* CU1 fue la mejor productora, así como la de mayor potencial lignolítico.

La producción de enzimas modificadoras de lignina (EML) se detectó a partir de 3 días en *T. maxima* CU1 y a partir de los 5 días en los otros dos basidiomicetos nativos (Tabla 2).

En los bloques de sustrato biotransformados, las tres cepas produjeron CMCasas, avicelosas, β -D-glicosidasa, xilanasas y lacasas. Si bien, todas se detectan a partir del cuarto día, los títulos más altos en general se detectaron del día 8 al 15 de producción (datos no mostrados). Para las tres cepas de basidiomi-

cetos los títulos más altos de actividad enzimática fueron de β -D-glicosidasas (Tabla 3). En tanto que la mejor cepa productora de xilanasas fue *T. hirsuta* CS5 (113 U/l). *T. maxima* CU1 presentó los títulos más altos de lacasa (8 U/l) bajo estas condiciones de cultivo (Tabla 3).

En la Tabla 4 se presentan los resultados de NDF, ADF, hemicelulosa, celulosa, lignina y proteína de los bloques de sustrato biotransformados. *T. maxima* CU1, *P. sanguineus* CS2 y *T. hirsuta* CS5 redujeron en 4.0, 6.5 y 6.2%, respectivamente, el contenido de NDF con respecto al control. Sin embargo, no hubo diferencia ($p > 0.05$) en el contenido de ADF. *T. maxima* CU1, *P. sanguineus* CS2 y *T. hirsuta* CS5 redujeron 10.7, 17.0 y 14.2%, respectivamente ($p < 0.05$), el contenido de hemicelulosa. *P. sanguineus* CS2 y *T. hirsuta* CS5 disminuyeron significativamente ($p < 0.05$) el contenido de celulosa en un 21.6 y 19.8%, respectivamente en comparación al control. *T. maxima* CU1 fue

Tabla 1. Índice de reacción (I_{ae}^*) de celulasas, xilanasas y lacasas en placa

Cepa	Celulasa [§]	Xilanasas [§]	Lacasa [§]
<i>Trametes versicolor</i> UAMH 8272	1.032 ^c	1.096 ^b	1.006 ^b
<i>Trametes maxima</i> CU1	2.271 ^{ab}	1.077 ^b	1.137 ^a
<i>Pycnoporus sanguineus</i> CS2	2.559 ^a	1.083 ^b	1.000 ^b
<i>Trametes hirsuta</i> CS5	1.900 ^b	1.188 ^a	1.019 ^b
SEM	0.132	0.019	0.012
p	0.000	0.011	0.000

Los valores se analizaron con un ANOVA. *Índice de actividad enzimática (I_{ae})= diámetro de reacción (cm)/diámetro de crecimiento (cm). [§]Reacción revelada con solución de yodo al tercer día de crecimiento. [¶]Reacción evidenciada por la oxidación de siringaldazina en el medio, al tercer día.

Tabla 2. Producción de enzimas modificadores de lignina (EML) en placa

Cepa	3 días	5 días	7 días	15 días
	Decolorado/n	Decolorado/n	Decolorado/n	Decolorado/n
<i>Trametes versicolor</i> UAMH 8272	0/3	0/3	0/3	0/3*
<i>Trametes maxima</i> CU1	3/3	3/3	3/3	3/3
<i>Pycnoporus sanguineus</i> CS2	0/3	3/3	3/3	3/3
<i>Trametes hirsuta</i> CS5	0/3	3/3	3/3	3/3
F (Kruskal-Wallis)	0.012	0.012	0.012	0.012

Índice de Decoloración (ID): La producción de EML se estimó por la decoloración del Poly R-478. Donde el mayor ID corresponde a la presencia de decoloración en un menor tiempo. El análisis de los datos se realizó con el modelo no paramétrico de Kruskal-Wallis. *Decoloración parcial.

Tabla 3. Lignocelulasas presentes en los bloques de pasto buffel (*Cenchrus ciliaris*) inoculado con basidiomicetos nativos

Cepa	CMCasas	Avicelulasas	β -D-glicosidasa (U/l)	Xilanasas	Lacasa*
<i>Trametes maxima</i> CUI	80	96	164	73	8
<i>Pycnoporus sanguineus</i> CS2	138	112	143	61	1.9
<i>Trametes. hirsuta</i> CS5	33	103	170	113	3.6

*La cuatificación de la lacasa se realizó por el método reportado por Abadulla *et al.* (2000). Todas las mediciones se realizaron por triplicado ($p < 0.05$) al día 15 de cultivo.

Tabla 4. Contenido (% base MS) de proteína y fracciones de fibra de pasto buffel (*Cenchrus ciliaris*) inoculado con diferentes cepas de hongos nativos

Tratamiento	NDF	ADF	Hemicelulosa	Celulosa	Lignina	Proteína
Control	75.62 ^a	45.74	29.88 ^a	28.81 ^{ab}	16.93 ^{ab}	4.76 ^b
<i>Trametes maxima</i> CUI	72.61 ^{ab}	45.95	26.66 ^b	31.43 ^a	14.52 ^b	5.46 ^b
<i>Pycnoporus. sanguineus</i> CS2	70.69 ^b	45.90	24.79 ^c	22.59 ^b	23.31 ^a	6.24 ^a
<i>Trametes hirsuta</i> CS5	70.92 ^b	45.27	25.65 ^{bc}	23.11 ^b	22.16 ^a	6.29 ^a
SEM	0.704	0.677	0.295	1.284	1.188	0.126
p	0.023	0.885	0.001	0.02	0.017	0.003

asociado con una reducción numérica ($p > 0.05$) del 14.2% en el contenido de lignina, con respecto al control. *P. sanguineus* CS2 y *T. hirsuta* CS5 incrementaron en 31% ($p < 0.05$) el contenido proteico del control (Tabla 3).

Tanto *P. sanguineus* CS2 y *T. hirsuta* CS5 produjeron mayores títulos de celulasas (principalmente avicelulasas) (Tabla 3), explicando el menor contenido de celulosa y hemicelulosa (Tabla 4). Estos resultados concuerdan con Dinis *et al.*, (2009), quienes concluyeron que las xilanasas y feruloilesterasas de basidiomicetos, son enzimas clave en la degradación de la matriz lignina-hemicelulosa. En el trabajo realizado por Shrivastava *et al.* (2011), también observaron una reducción del contenido de ADF, NDF, hemicelulosa, celulosa y lignina en paja de trigo fermentada con *Pleurotus ostreatus* y *Trametes versicolor*. Por otro lado, las cepas nativas incrementaron el contenido de proteína, sugiriendo un efecto positivo en la calidad nutricional.

A nivel mundial es reconocida la capacidad lignocelulolítica de los basidiomicetos de la pudrición blanca y su aprovechamiento en diversos procesos a nivel industrial (Elisashvili *et al.*, 2011). Sin embargo, en el sector pecuario son pocos los trabajos en los cuales aprovechen estos hongos, además de estar limitados a unos cuantos géneros (Ghorai *et al.*, 2009). Convencionalmente en el mejoramiento de la calidad nutricional de pastos y esquilmos para uso en la alimentación animal, requiere mayor degradación de lignina, hemicelulosa y celulosa que permita una mejor biodisponibilidad de nutrientes (Ribeiro *et al.*, 2012). Sin embargo, se ha reportado que dietas pobres en lignina y ricas en fibras solubles favorecen el establecimiento en el tracto gastrointestinal de floras nocivas, tales como *Clostridium* spp. y *Escherichia coli* que incrementan la morbilidad y mortalidad en los animales.



LITERATURA CITADA

- Abadulla, E., T. Tzanov, S. Costa, K. Robra, G. Gübitz, 2000. Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsute*. *Applied Environmental Microbiology* 66: 3357-3362.
- Baldrian, P., 2005. Fungal laccases: occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews* 30: 215-242.
- Beauchemin, K.A., D. Colombatto, D.P. Morgavi, W.Z. Yang, 2003. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve animal feed utilization by ruminants. *Journal of Animal Science* 8: E37-E47.
- Bernal, H., R.W. Blake, D.J.R. Cherney, M.E. Van Amburgh, 2009. Nutritive value of standing mature Buffel grass (*Cenchrus ciliaris*) for dry season feeding of cattle in Northeastern Mexico. *Journal of Animal Science* 87 (Suppl. 2): 226 (Abstr. T93).
- Dinis, M.J., R.M.F. Bezerra, F. Nunes, A.A. Dias, C.V. Guedes, L.M.M. Ferreira, J.W. Cone, G.S.M. Marques, A.R.N. Barros, M.A.M. Rodrigues, 2009. Modification of wheat straw lignin by solid state fermentation with white-rot fungi. *Bioresource Technology* 100: 4829-4835.
- Elisashvili, V., T. Torok, E. Kachlishvili, T. Khardziani, E. Metreveli, A. Kobakhidze, I. Berikashvili, 2011. Evaluation and regulation of the lignocellulolytic activity of novel white-rot basidiomycetes. *Global Journal of Biochemistry* 1: 134-141.
- Ghorai, S., S.P. Banik, D. Verma, S. Chowdhury, S. Mukherjee, S. Khowala, 2009. Fungal biotechnology in food and feed processing. *Food Research International* 42: 577-587.
- Gómez-de la Fuente, E., H. Díaz-Solís, A. Saldívar-Fitzmaurice, F. Briones-Encinia, V. Vargas-Tristán, W.E. Grant, 2007. Patrón de crecimiento de pasto Buffel [*Pennisetum ciliare* L. (Link) Sin. *Cenchrus ciliaris* L.] en Tamaulipas, México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* 45: 1-17.
- Gutiérrez-Soto, G., G.E. Medina-González, J.E. Treviño-Ramírez, C.E. Hernández-Luna, 2015. Native macrofungi that produce lignin-modifying enzymes, cellulases, and xylanases with potential biotechnological applications. *BioResources* 10: 6676-6689.
- Hernández-Luna, C.E., G. Gutiérrez-Soto, S.M. Salcedo-Martínez, 2008. Screening for decolorizing basidiomycetes in Mexico. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24: 465-473.
- Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31: 426-428.
- Ribeiro, L., V. Pinheiro, D. Outor-Monteiro, J. Mourão, R.M.F. Bezerra, A.A. Dias, R.N. Bennett, G. Marques, M.A.M. Rodrigues, 2012. Effects of the dietary incorporation of untreated and white-rot fungi (*Ganoderma resinaceum*) pre-treated olive leaves on growing rabbits. *Animal Feed Science and Technology* 173: 244-251.
- Shrivastava, B., S. Thakur, Y.P. Khasa, A. Gupte, A.K. Puniya, R.C. Kuhad, 2011. White-rot fungal conversion of wheat straw to energy rich cattle feed. *Biodegradation* 22: 823-831.
- Sin, M.K.W., K.D. Hyde, S.B. Pointing, 2002. Comparative enzyme production by fungi from diverse lignocellulosic substrates. *Journal of Microbiology* 40: 241-244.
- Van Soest, P.J., J.B. Robertson, B.A. Lewis, 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* 74: 3583-3597.