



Revista Cubana de Ciencia Agrícola

ISSN: 0034-7485

rcca@ica.co.cu

Instituto de Ciencia Animal  
Cuba

Valiño, Elaine; Elías, A.; Carrasco, Taimí; Albelo, Nereida  
Efecto de inoculación de la cepa *Trichoderma viride* 137 en el bagazo de caña de azúcar  
autofermentado

Revista Cubana de Ciencia Agrícola, vol. 37, núm. 1, 2003, pp. 43-49  
Instituto de Ciencia Animal  
La Habana, Cuba

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193018072007>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

## Efecto de inoculación de la cepa *Trichoderma viride* 137 en el bagazo de caña de azúcar autofermentado

Elaine Valiño, A. Elías, Taimí Carrasco y Nereida Albelo

*Instituto de Ciencia Animal. Apartado Postal 24. San José de las Lajas, La Habana*

Se realizó un experimento para determinar el efecto de inoculación de la cepa *Trichoderma viride* 137 y las interacciones que se producen entre ésta y la carga microbiana del bagazo de caña de azúcar, fermentado con su propia microbiota. Se utilizó bagazo autofermentado por 21 d. Se aplicó un diseño completamente aleatorizado con arreglo factorial (3 x 6) y tres repeticiones con tres variantes: I) Bagazo autofermentado, restituyendo la humedad a 70 % + inóculo del hongo, II) Variante I + urea y minerales y III) Bagazo autofermentado estéril + inóculo del hongo I + urea y minerales. El segundo factor que se consideró fue el tiempo de fermentación (0, 1, 2, 3, 4, 5 d). No hubo cambios notables en la carga microbiana al restituir la humedad al sustrato. El efecto del inóculo del hongo en la fibra fue similar al causado por la propia microbiota de la caña. Las diferencias en la actividad celulolítica sólo se hallaron en la fracción soluble con 5.80 UI/g de MS de exo B 1-4 glucanasa. Estos resultados demuestran que hay una fuerte interacción entre la microbiota normal del bagazo y el efecto que produce la inoculación de la cepa *Trichoderma viride* 137 en la fibra, debido a que éste es muy similar, aun cuando se observan diferencias al no adicionar nutrientes. Se comprobó además, la potencialidad hidrolítica de la cepa *Trichoderma viride* 137 en la fibra del bagazo cuando no ha sido tratada, sobretodo en la fracción soluble.

Palabras clave: *bagazo, fermentación sólida, Trichoderma viride*.

La producción animal sólo será sostenible para los países tropicales si se armoniza la producción agrícola, se aprovechan los residuos y se establece una adecuada práctica biotecnológica que permita mejorar y aprovechar los productos, subproductos y residuos agroindustriales (Elías *et al.* 1990).

El bagazo es el producto de la fracción insoluble de la caña de azúcar después de extraído su jugo. Este representa cerca del 25 % de la caña cultivada y se destina básicamente a sustituir combustible fósil. De esta forma, en la operación industrial se puede disponer entre 10 y 40 % del bagazo sobrante, en función de la eficiencia energética del central y de los esquemas que se apliquen para producir azúcar crudo (Figueroa y Ly 1990).

Actualmente es un reto el uso de residuos lignocelulósicos como fuente energética y su inclusión a niveles superiores en raciones para la dieta animal, debido a que anualmente se producen en gran volumen y tienen alto contenido de fibra. Esta característica disminuye

considerablemente la digestibilidad en los animales. La utilización de microorganismos para disminuir los niveles de fibra y enriquecer el contenido proteico de los desechos es una alternativa para utilizar éstos como materia prima ecológica y barata, además hacen más asequible el proceso tecnológico (Valiño 2001).

Por esto, el objetivo de este estudio fue determinar el efecto de inoculación de la cepa *Trichoderma viride* 137 y las interacciones que se producen entre ésta y la carga microbiana del bagazo de caña de azúcar fermentado por 21 d con su propia microbiota.

### Materiales y Métodos

*Sustrato para la fermentación.* Bagazo de caña de azúcar del Complejo Agroindustrial (CAI) "Amistad con los pueblos" localizado en Güines, provincia La Habana. El bagazo se obtuvo inmediatamente después de la molida.

*Diseño experimental.* Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con arreglo

factorial (3 x 6) y tres repeticiones. Los factores estudiados fueron:

*Variante I.* Bagazo autofermentado con un tiempo de 21 d, restituyendo a 70 % su humedad, inoculado con la cepa *Trichoderma viride* 137.

*Variante II.* Variante I + minerales y urea a 70 % de humedad, inoculado con la cepa *Trichoderma viride* 137.

*Variante III.* Bagazo de caña de azúcar autofermentado estéril + el inóculo de la cepa *T. viride* 137 a 70 % de humedad.

Las muestras de bagazo en las tres variantes fueron tomadas a los 0, 1, 2, 3, 4 y 5 d; el tiempo fue el segundo factor que se consideró.

Se utilizó la cepa *Trichoderma viride* 137 con actividad celulolítica, aislada en el Departamento de Biotecnología del Instituto de Ciencia Animal.

*Indicadores químicos estudiados.* El proceso de fermentación se siguió mediante el estudio del fraccionamiento de la fibra vegetal (AOAC 1995), proteína verdadera (Bernstein citado por Meir 1986), proteína bruta (AOAC 1995), NH<sub>3</sub> (Conway 1957) y pH de la fermentación, determinado en un pH metro digital (CD 70). Los datos se expresaron en porcentaje de materia seca. Los ácidos grasos volátiles y el ácido láctico se determinaron por cromatografía gaseosa en meq/L y mmol/mL, respectivamente.

*Aislamiento de bacterias y levaduras.* Se emplearon medios de cultivo según el grupo fisiológico a aislar. Las bacterias se aislaron en el medio de cultivo Nutriente-agar (Berger 1984), las levaduras en el medio de cultivo Extracto de Malta-agar con la adición de cloranfenicol (0.1 %), según Kreger (1984).

*Caracterización e identificación de hongos.* Los aislamientos de hongos, a partir de la caña autofermentada, se caracterizaron hasta nivel genérico, según Booth (1977) y Barnett y Hunter (1989). Se siguió el criterio de Klich y Pitt (1988) para el género *Aspergillus*, el de Pitt (1988) y Klich y Pitt (1992) para *Penicillium* y para el género *Trichoderma*, el criterio de Bisset

(1991). Se realizó el análisis de distribución y se obtuvieron las densidades relativas para los géneros aislados de los sustratos (Smith 1980).

Los hongos celulolíticos se aislaron en el medio de cultivo Celulosa-agar al 2 % (Mandels *et al.* 1976) con la adición de cloranfenicol (0.1 %).

El conteo microbiano se expresó en unidades formadoras de colonias por gramo de materia seca (ufc/g de MS).

*Enzimas determinadas.* Carboximetilcelulosa (CMCasa, 1,4 β-D-glucan 4 glucanohidrolasa, endo1,4 β glucanasa) que mostró actividad hidrolítica en la carboximetilcelulosa y papel de filtro celulasa (PFasa, exo1,4 β-D- glucanasa, 1,4 β-D glucan cellobiohidrolasa) que mostró actividad hidrolítica en la celulosa cristalina.

Se utilizó el método descrito por Mandels *et al.* (1976). Los azúcares reductores se estimaron según Miller (1959).

Las actividades de las enzimas se determinaron, calcularon y expresaron en unidades internacionales por mililitro (UI/mL). Esta unidad refiere los micromoles de glucosa liberados por minuto de reacción, en las condiciones del ensayo de actividad (Mandels *et al.* 1976). Estos datos se expresaron también en unidades internacionales por gramo de materia seca (UI/g de MS), se tuvo en cuenta el volumen de extracción y los gramos de sustrato fermentado.

A partir de los datos obtenidos, se calculó la productividad de la producción de las enzimas (PFasa y CMCasa), que se definió como la cantidad de enzima que libera un micromol de azúcar reductor por gramo de materia seca inicial por hora de fermentación (μmol/g de MS/h). La actividad específica se definió como la cantidad de enzima (PFasa y CMCasa) que libera un micromol de azúcar reductor por miligramo (μmol·mg<sup>-1</sup>).

La proteína soluble se midió en el sobrenadante del cultivo, según el método de Lowry *et al.* (1951). Los resultados se expresaron en mg·mL<sup>-1</sup>. La productividad proteica estuvo definida como la cantidad de proteína que se produce por gramo de materia seca por hora de fermentación (mg/g de MS/h).

### Resultados y Discusión

Los resultados muestran las interacciones que se produjeron entre la carga microbiana del bagazo autofermentado y el efecto de la inoculación, después de 21 d de autofermentado. Según nuestras condiciones experimentales, no hubo cambios notables en el bagazo autofermentado, con la adición de nutrientes y sin ella en el conteo de bacterias. Estas no sobrepasaron los  $27 \times 10^8$  y  $45 \times 10^8$  ufc/g de MS respectivamente, aun cuando les fue restituida la humedad necesaria para incrementar la actividad microbiana y favorecer la actividad enzimática de la cepa 137 inoculada (figura 1). La viabilidad en la población de levaduras se afectó grandemente, ya que no hubo crecimiento en los tiempos de fermentación estudiados. La población de hongos celulolíticos tampoco sobrepasó los  $2.3 \times 10^8$  ufc/g de MS, después de inocular una concentración de esporas de hongos de  $15 \times 10^7$  ufc/mL.

nas colonias de *Penicillium*. Es importante destacar que en este tiempo no aparecen colonias de *Fusarium*, lo que puede responder a una mayor exigencia de nutrientes para su crecimiento. Estos están en déficit debido a la competitividad por el sustrato de otros grupos microbianos, durante la fermentación.

Al comprobar la efectividad hidrolítica de las enzimas secretadas por *T. viride* 137, al eliminar la microbiota del bagazo, se obtuvo un efecto muy similar al producido en la fibra por la microbiota normal del bagazo, según los resultados de la composición bromatológica.

Estos análisis indicaron que no hubo diferencias en los valores de FAD, FND, lignina y celulosa; pero sí al compararlos con el bagazo almacenado sin la adición de nutrientes (figura 2). Se comprobó la disminución de cuatro unidades porcentuales en cada indicador con respecto al bagazo sin la adición de nutrientes,

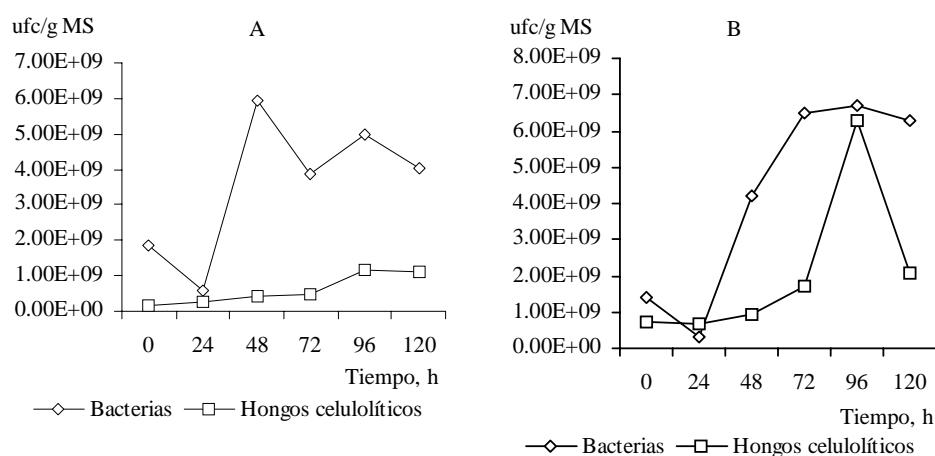


Figura 1. Carga microbiana en el bagazo de caña de azúcar autofermentado sin nutrientes (A) y con nutrientes (B)

En el resultado de los géneros identificados en los hongos aislados, independientemente del inóculo utilizado, se observó que el género *Aspergillus* prevaleció durante las primeras 96 h de fermentación, solamente en el bagazo autofermentado se identificaron algu-

excepcionales en la lignina en la que se mantuvieron constantes.

Los resultados en los indicadores bromatológicos no expresaron la máxima capacidad de acción celulolítica en el bagazo. Una de las causas pudiera ser la barrera física de la

lignina y otra, los métodos analíticos que no han sido bien estandarizados en la determinación de fermentaciones en estado sólido, fundamentalmente en la de sustratos delignificados por hongos. Según Reid (1998), los resultados de algunos estudios de fermentación por esta vía dificultan la interpretación, porque no se informan los datos críticos de la fermentación, ni la pérdida en materia seca durante la fermentación y las digestibilidades del producto están informadas comúnmente en porcentaje del producto final y no del inicial. Además, no se aclaran las bases que han sido utilizadas.

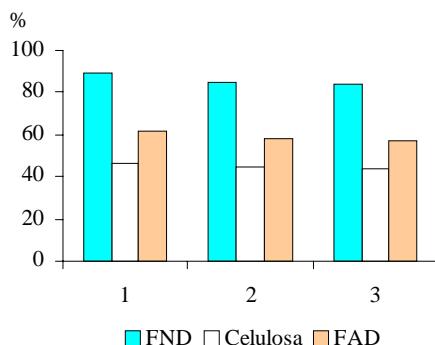


Figura 2. Variaciones en el contenido de FND, Celulosa y FAD en bagazo de caña autofermentado sin nutrientes (1), con nutrientes (2) y sin microbiota e inoculado con *T. viride* 137 (3)

Pham *et al.* (1997) informaron una reducción del 30 % del contenido de lignina del bagazo de caña con la cepa *Lentinus edodes* BIOT 3036<sup>a</sup>, lo que mejoró la digestibilidad del producto final. Chahal (1997) halló una reducción del 85 % de lignina con la cepa *T. reesei* MCG80, con un previo tratamiento. Gupta y Madamwar (1997), con una mezcla de cultivos de *Aspergillus*, mejoró la digestibilidad después de 8 d de fermentación, utilizando también un pretratamiento del bagazo con hidróxido de calcio (2 %).

Se observó además, un ligero aumento en la proteína bruta (figura 3), la proteína verda-

dera y en el contenido celular, lo que hizo notables las diferencias ( $P < 0.001$ ) en el contenido de la proteína soluble en las tres variantes, con respecto al tiempo de fermentación (figura 4) y en la actividad enzimática celulolítica (figura 5).

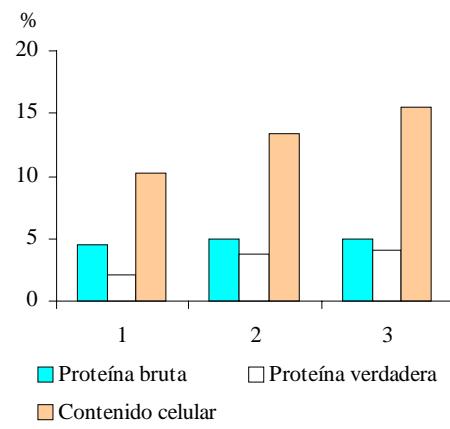


Figura 3. Variaciones en el contenido de PB, PV y contenido celular en bagazo de caña autofermentado sin nutrientes (1), con nutrientes (2) y sin microbiota e inoculado con *T. viride* 137 (3)

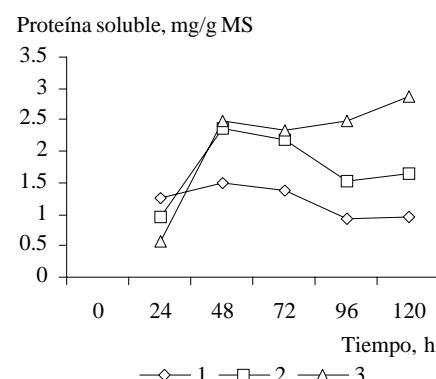


Figura 4. Contenido de proteína soluble en el bagazo autofermentado sin la adición de nutrientes (1), con nutrientes (2) y sin microbiota e inoculado con *T. viride* 137 (3)

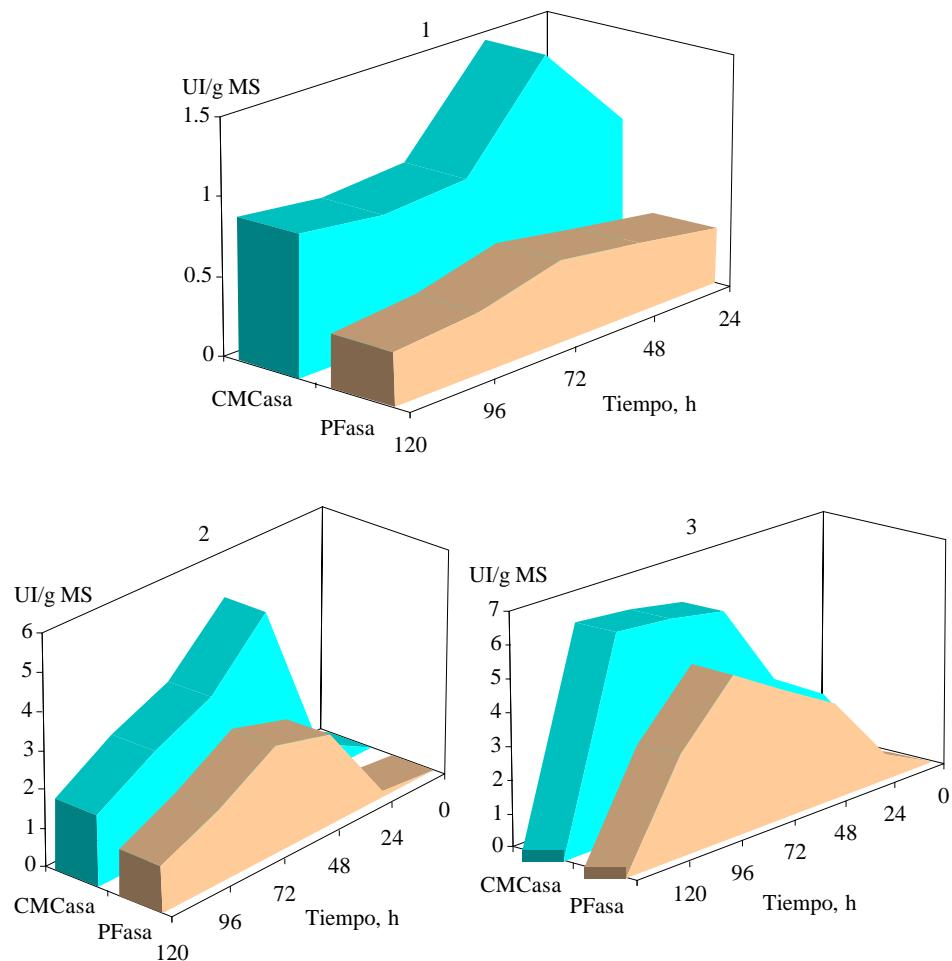


Figura 5. Cinética enzimática de la cepa *T. viride* 137 en bagazo de caña autofermentado sin la adición de nutrientes (1), con nutrientes (2) y estéril (3)

El tiempo máximo de producción de las enzimas PFasa y CMCasa en el bagazo autofermentado durante 21 d, sin nutrientes, fue a las 72 h (0.048 UI/g de MS) y 48 h (0.49 UI/g de MS), respectivamente; la productividad en esos tiempos fue muy baja (figura 5). En el bagazo autofermentado con la adición de nutrientes, la secreción enzimática es 3.9 y 5.8 veces mayor para CMCasa y PFasa. Las productividades en este tiempo fueron de 0.048 UI/g de MS/h y 0.038 UI/g de MS/h.

Estos valores fueron inferiores a los obtenidos en la cuantificación de las enzimas celulásas en el bagazo hidrolizado con la cepa 137 para la enzima endoglucanasa (15.36 UI/g de MS en 53.96 h) y para la exoglucanasa (1.41 UI/g MS en 66.64 h), esto pudiera asociarse a la microbiota del bagazo, la que puede ser una barrera para la acción de estas enzimas y para la posible acción de proteasas.

Sin embargo, hubo un mejor resultado al eliminar la microflora natural del bagazo, aun-

que bromatológicamente no hubo diferencias con relación al bagazo sin tratamiento en autoclave. Las diferencias en la acción del inóculo sólo se observaron en la fracción soluble.

La cantidad máxima de enzimas secretadas fue de 6.10 UI/g de MS de CMCasa y 5.8 UI/g de MS de PFasa y las productividades enzimáticas se duplicaron. Estos valores son comparables con los del bagazo hidrolizado, por lo que la efectividad en la hidrólisis enzimática aplicada y la física es muy similar para cuantificar la potencialidad de la cepa estudiada.

La acción enzimática favoreció además, los valores de pH para la acción hidrolítica en el bagazo (figura 6). En este experimento hubo mayor producción de ácido acético que en el bagazo fresco (6.2 meq/L) y el ácido láctico se mantuvo con valores similares. El amoníaco producido aumentó ( $P < 0.01$ ) con respecto al tiempo y entre las variantes utilizadas (figura 7). Despues de 72 h, el amoníaco aumentó en el

bagazo inoculado con la adición de nutrientes, debido probablemente al ligero incremento de las poblaciones de bacterias.

También se observó, un descenso del amoníaco al eliminar la microbiota, siguiendo la dinámica de crecimiento del hongo. Esto podría atribuirse a su característica ureolítica. Según Trejo-Hernández *et al.* (1991), estos resultados pueden deberse también a la germinación de las esporas y al inicio del crecimiento apical (Peberdy 1994 y Archer 2000).

Los resultados muestran que hay una fuerte interacción entre el efecto de la microbiota normal del bagazo y el que produce la inoculación del hongo celulolítico en la fibra, éste es muy similar aun cuando se observan diferencias sin la adición de nutrientes. Se comprobó además, la potencialidad hidrolítica de la cepa *Trichoderma viride* 137 en la fibra del bagazo cuando ésta no ha sido tratada, sobretodo en la fracción soluble.

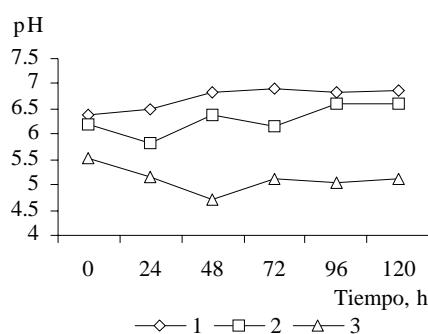


Figura 6. Variaciones del pH en bagazo de caña de azúcar autofermentado e inoculado con *T. viride* 137 sin la adición de nutrientes (1), con nutrientes (2) y sin microbiota (3)

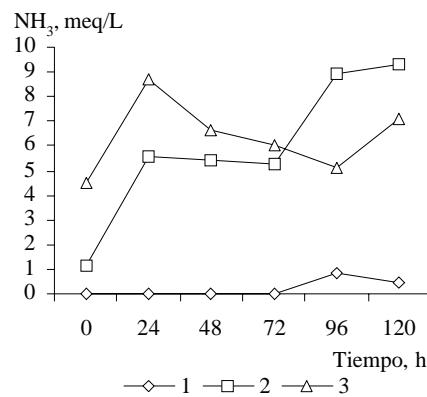


Figura 7. Variaciones del amoníaco en bagazo de caña de azúcar autofermentado e inoculado con *T. viride* 137 sin la adición de nutrientes (1), con nutrientes (2) y sin microbiota (3).

### Referencias

AOAC 1995. Official methods of analysis (16<sup>th</sup> ed.). Ass. Off. Agric. Chem. Washington, D.C.

Archer, D. 2000. Filamentous fungi as microbial cell factories for food use. Current Opinion in Biotechnology. Elsevier Sci. 11:483

Barnett, H.L. & Hunter, B.B. 1989. Illustrate Genera Imperfect. Ed. Burges & Publishing Company. p.83

Bergey, S. 1984. Manual of Determinative Bacteriology. The William and Wilkins Co., Baltimore, USA.

Bisset, J. 1991. A revision of the genus-Trichoderma. II. Infrageneric Classification. Can. Journal Botany. 69:2357

Booth, C. 1977. Laboratory Guide To Identification of mayor species. Commonwealth Mycological Institute Kew, Surrey, England

Chahal, D.S. 1997. Solid-State Fermentation with *Trichoderma reesei* for cellulases Production. Applied and Environmental Microbiology. 49:205

Conway, E.J. 1957. Microdiffusion analysis and volumetric error. Ed. Crosby Lockwood, London.

Elías, A., Lezcano, O., Lezcano, P., Cordero, J. & Quintana, L. 1990. Reseña descriptiva sobre el desarrollo de una tecnología de enriquecimiento proteico en la caña de azúcar mediante fermentación en estado sólido. La Saccharina. Rev. Cubana Cienc. Agríc. 24:1

Figueroa, V. & Ly, J. 1990. Alimentación Porcina no convencional. Colección GEPLACEA. México. p. 215

Gupta, A. & Madamwar, D. 1997. Production of cellulolytic enzymes by coculturing of *Aspergillus ellipticus* and *Aspergillus fumigatus* grown on bagasse under solid state fermentation . Applied Biochemistry and Biotech. 62:267

Klich, M.A. & Pitt, J. 1988. A Laboratory Guide to the Common *Aspergillus* Species & their Teleomorphs. Published by Commonwealth Scientific & Industrial Research Organization. Division of Food Processing. p.1

Klich, M.A. & Pitt, J. 1992. A computer assisted synoptic key to common *Penicillium* & their Teleo-morphs. Published by Commonwealth Scientific & Industrial Research Organization. Division of Food Processing. p. 102

Lowry, O.H., Rosembrough, N.J. & Tandall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenolreagent. J. Biol. Chem. 193:265

Mandels, M., Andreotti, R.E. & Roche, C. 1976. Measurement of scarifying cellulose. Biotechnol. Bioeng. Symp. 6:1471

Meir, H. 1986. Laborpraktikure. Tierernahrung und, futtermitteln für Tierproduzenten. Verlag, Berlin

Miller, G.L. 1959. Use of dinitro-salicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31:426

Peberdy, J. 1994. Protein secretion in filamentous fungi- Trying to understand a highly productive black box. Reviews. Current Opinion in Biotechnology. Elsevier Sci. p. 50

Pham, C.B., Ramírez, T.J. & Sedano, S.A. 1997. Effect of solid-state fermentation by *Lentinus edodes* on the chemical composition and biodegradability of corn cobs. Biotechnol. 6:61

Pitt, J.I. 1988. A laboratory guide to common *Penicillium* species. Commonwealth Scientific and Industrial Research organization Division and Food Research. p. 184

Reid, I.D. 1998. Biodegradation of lignin. Journal Botanical. p. 73

Smith, G. 1980. Ecology and Field Biology. Ed by Harper & Row. New York. p. 835

Trejo-Hernández, M.R., Oriol, E., López-Canales, A., Roussos, S., Viniegra-González, G. & Raimbault, M. 1991. Producción de pectinas de *Aspergillus niger* por fermentación sólida sobre soporte. Micol. Neotrop. Appl. 4:49

Valiño, E. 2001. Perspectivas de utilización del bagazo biofermentado y extractos de enzimas en la alimentación animal. Taller Internacional "Perspectivas de uso del bagazo de la caña de azúcar en un programa efectivo de diversificación de la industria azucarera. Unión de Investigación-Producción de la celulosa del bagazo. La Habana, Cuba

**Recibido: 16 de octubre de 2001.**