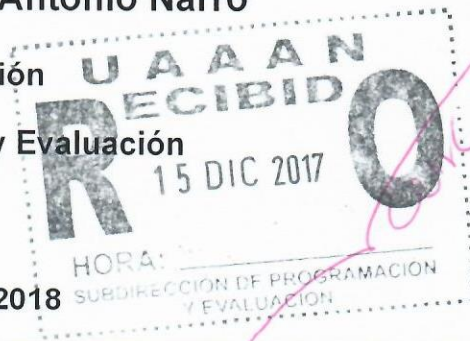




Dirección de Investigación

Subdirección de Programación y Evaluación



Proyecto de Investigación 2018

Unidad:	3624	División:	Ciencia Animal	Departamento:	Ciencia y Tecnología de Alimentos
Tema (ANA/PEP):	estratégico Biotecnología				
Línea de investigación:	Biotecnología de Alimentos				
Título del proyecto:	Bio-alternativas en la degradación de lignina para incrementar el valor nutritivo de ingredientes fibrosos utilizados en la alimentación de rumiantes				
Presupuesto solicitado (Máximo \$75,000)	\$75,000.00	El proyecto es:	Nuevo	Continuación	X
Tipo de investigación:	Básica	Aplicada	X	Tecnológica	
Vinculación:	Si	X	No	Fondos concurrentes:	
Cooperante(s) :					
Entidad (es):	Coahuila	Municipio (s):	Saltillo		
Localidades:	Buenavista Saltillo				
A realizar durante el año(s):	2018				

Participantes		Adscripción (Clave Depto.)	Expediente No.	Firma
Responsable	Dr. Mario Alberto Cruz Hernández.	3624	3867	
Colaborador:	Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez	3624	3724	
Colaborador:	Dra. Dolores Gabriela Martínez Vázquez	3624	3869	
Colaborador:	Dr. Jesús Manuel Fuentes Rodríguez	3621	993	
Colaborador:	Dr. Armando Robledo Olivo	3624	4041	
Colaborador:				
Colaborador:				
		Nivel estudios	Matrícula	Firma
Tesista:	Rafal Martínez	licenciatura		
Programa Docente:	ICTA			
Tesista:				
Programa Docente:				
Tesista:				
Programa Docente:				

	Vo. Bo.	Autoriza
Firma y sello		
Nombre	Dra. Dolores Gabriela Martínez Vázquez Jefe de Departamento	Dr. Armando Robledo Olivo Subdirector de Programación y Evaluación

- Cada Jefe de Departamento deberá dejar copia para su archivo

Protocolo para Proyecto de Investigación 2017

Título del proyecto

Bio-alternativas en la degradación de lignina para incrementar el valor nutritivo de ingredientes fibrosos utilizados en la alimentación de rumiantes

Introducción

Históricamente, la lignina se ha asociado de forma negativa con el valor nutritivo de las distintas fuentes alimenticias altas en fibra utilizadas en distintos sistemas de producción pecuaria. Lo anterior debido a que la lignina ejerce un efecto negativo directo sobre la digestión total y un efecto indirecto consecuencia de impedimentos físicos que limitan el acceso de los microorganismos ruminales a las zonas degradables de la fibra.

A pesar de que en el ámbito de la nutrición animal el estudio sobre la degradación de la lignina ha sido reducido en relación a otras perspectivas biotecnológicas, existe evidencia natural y antecedentes científicos de que procesos químico-biológicos pueden ser aplicados con el objeto de reducir las limitantes que se presentan en la utilización de ingredientes fibrosos. Dichas limitantes en la degradación de la lignina radican en la hidrofobicidad, la estructura aleatoria, compleja y carente de enlaces hidrolizables comunes.

En el contexto de generar nuevas alternativas para la nutrición animal el primer punto a considerar sobre la degradación de la lignina es que a pesar de su amplia producción y distribución a nivel mundial, su descomposición es realizada por un número restringido de organismos, principalmente hongos y dentro de estos se destacan los *Basidiomicetos*. Es aquí donde surge la importancia de generar nuevas perspectivas biotecnológicas para incrementar el valor nutritivo de residuos agrícolas o ingredientes con alto contenido de fibra, en los cuales, la lignina representa una limitante para su eficaz aprovechamiento.

Objetivos

Objetivo general

Mejorar el valor nutritivo de ingredientes de baja calidad a través de la inclusión de hongos lignilolíticos como un pre-tratamiento.

Objetivos específicos:

- Identificar el hongo con mayor potencial de degradación sobre diferentes sustratos.
- Implementación de una técnica para el pre-tratamiento de fuentes fibrosas a mayor escala.
- Evaluar los niveles de degradación de los ingredientes tratados con hongos lignilolíticos mediante prueba de digestibilidad *in vivo* y prueba de comportamiento.

Hipótesis

La aplicación de hongos lignilolíticos como pre-tratamiento al forraje mejora su valor nutritivo.

La pared celular vegetal contiene celulosa, hemicelulosa, pectina y un polímero fenólico llamado lignina. La celulosa es el polisacárido más abundante en la naturaleza y el principal constituyente de la pared celular vegetal proveyéndole rigidez. La celulosa está formada por unidades de D-glucosa unidas por enlaces β 1-4 que forman cadenas poliméricas lineales de aproximadamente 8000-12000 unidades de glucosa (Alexander, 1967). Las hemicelulosas, son los segundos polímeros en importancia, tienen una composición heterogénea de varios tipos de unidades de azúcar. Las hemicelulosas son usualmente clasificadas de acuerdo al residuo de azúcar principal en la estructura del polímero.

Por otra parte, la pared de celulosa es reforzada por la lignina, un polímero insoluble, complejo y ramificado de unidades fenilpropano, las cuáles se unen por enlaces éter o carbono-carbono formando una extensa red dentro de la pared celular vegetal, estos enlaces hacen que sea un polímero recalcitrante. Este polímero es el producto de la condensación de varias moléculas y no es formado por vía enzimática, lo cual determina que su estructura sea altamente variable, dependiendo el tipo de planta, su estado fenológico y tasa fotosintética (Leonowicz *et al.*, 1999).

1.1 Lignina

La lignina es uno de los biopolímeros más abundantes en las plantas y junto con la celulosa y la hemicelulosa conforma la pared celular de las mismas en una disposición regulada a nivel nano-estructural, dando como resultado redes de lignina-hidratos de carbono. La composición o distribución de los tres componentes en esas redes varía dependiendo del tipo de planta (Gellerstedt y Henrinksen, 2008).

La lignina forma parte estructural de todas las plantas vasculares y al igual que muchos otros componentes de la biomasa, se forma mediante la reacción de fotosíntesis. La lignina está considerada como un recurso renovable asequible y de potencial uso industrial (Gellerstedt y Henrinksen, 2008).

1.1.1. Unidades estructurales de la lignina

La definición estructural de la lignina nunca ha sido tan clara como la de otros polímeros naturales tales como celulosa y proteínas, debido a la complejidad que afecta su aislamiento, análisis de la composición, y la caracterización estructural. El problema de una definición precisa para la lignina se asocia con la naturaleza de sus múltiples unidades estructurales, las cuales no suelen repetirse de forma regular, dado que la composición y estructura de la lignina varían dependiendo de su origen y el método de extracción o aislamiento utilizado (Lu y John, 2010).

Según la definición estructural de lignina dada por Lu y John (2010) (que es generalmente la más aceptada) las ligninas tienen las siguientes características:

- ✚ Son polímeros vegetales contruidos a base de unidades de fenilpropanoides.
- ✚ Presentan la mayor parte de los grupos metoxilo contenidos en la madera.
- ✚ Son resistentes a la hidrólisis ácida, fácilmente oxidables, solubles en bisulfito o álcalis calientes, y fácilmente condensables con fenoles.
- ✚ Cuando se hace reaccionar con nitrobenzeno en una solución alcalina caliente, las ligninas producen principalmente vainillina, siringaldehído y p-hidroxibenzaldehído en función del origen de las ligninas.
- ✚ Cuando se colocan a ebullición en una solución etanólica de ácido clorhídrico, las ligninas forman monómeros del tipo "cetona de Hibbert" (mezcla de cetona aromáticas resultantes de la ruptura de los principales enlaces éter (β -O-4) entre unidades de lignina).

En general, las ligninas son copolímeros que se derivan principalmente de tres unidades fenilpropanomonoméricas (monolignoles) básicas: alcohol p-cumarílico, alcohol coniferílico y alcohol sinapílico (Gellerstedt y Henrinksen, 2008).

2. Contexto actual sobre la investigación de la lignina

La multifuncionalidad química de la lignina, imparte a ésta, propiedades muy variadas y permiten un apreciable número de transformaciones químicas. Estas transformaciones, a su vez, le permiten a la lignina ser estudiada y utilizada para diversos fines, sin embargo, la mayor parte de las investigaciones y aplicaciones sobre lignina ubican especialmente en dos grandes sectores: la industria médica y la papelera, siendo escasas las aplicaciones en el área de nutrición animal, debido especialmente a su nula digestibilidad.

2.1. Lignina en la nutrición animal

A diferencia de otros sectores en el campo de la nutrición animal la lignina históricamente ha representado

Procedimiento Experimental

Etapa 1:

Para iniciar el proyecto, se realizarán pruebas degradativas con 2 hongos lignilolíticos (*Lentinula edodes* y *Pleurotus ostreatus*) sobre 3 sustratos diferentes (rastros de maíz, sorgo y avena) con el fin de determinar cuál combinación (hongo-sustrato) genera mayor nivel de degradación de la lignina

Etapa II:

Para evaluar el efecto del hongo sobre los diferentes sustratos, estos últimos serán analizados químicamente (FC, FDN, FDA, PC y lignina) antes y después de las pruebas.

Etapa III:

Los sustratos con mayor nivel de degradación pasaran a las pruebas de digestibilidad *in vivo* en rumiantes. Como indicador del nivel de degradación de la lignina se evaluará representativamente el nivel de degradación de la fibra. Se evaluarán los forrajes seleccionados de las pruebas degradativas comparados contra los forrajes no pre-tratados.

Diseño experimental

Los resultados serán analizados mediante la aplicación de un diseño completamente al azar con tres tratamientos (los sustratos con mayor nivel de degradación para cada hongo, más un tratamiento testigo), utilizando 5 repeticiones por tratamiento.

Cronograma de actividades

Actividad a realizar	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Obtención y preparación del hongo	X											
Análisis químico de sustratos	X											
Pruebas degradativas		X	X									
Análisis químico de sustratos				X								
Preparación a escala de sustratos						X	X					
Evaluación <i>in vitro</i> (digestibilidad)								X				
Evaluación <i>in vivo</i> (digestibilidad)									X			
Obtención de datos								X	X			
Análisis de resultados										X		
Preparación de escritos (artículos)											X	X

Cronograma de distribución de presupuesto para el 2018.

Actividad por realizar	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Cotización de reactivos	X											
Evaluación de reactivos y materiales		X	X									
Distribución de presupuesto autorizado				X	X							
Solicitud de presupuesto mediante requisiciones y anticipos					X	X		X				

5.-Productos esperados

- Desarrollo de una técnica para el pre-tratamiento de fuentes fibrosas a mayor escala.
- Dos publicaciones internacionales
- Una tesis de doctorado.

6.-Literatura citada

- Acero, P. A., Meneses, M. M., Romero, L. A. M., Rivas, M. D. M., Gama, B. R., Loera, O. 2008. Ventajas de la fermentación sólida con *Pleurotus sapidus* en ensilajes de caña de azúcar. Archivos de Zootecnia, vol. 57, núm. 217, 2008, pp. 25-33, Universidad de Córdoba, España.
- Alexander, M. 1967. Introduction to soil microbiology. Jhon Wiley & Sons, Inc., pp. 197-215. New York. E.U.
- Bach, A. y S. Calsamiglia. 2006. La fibra en los rumiantes: ¿Química o física? XXII Curso de Especialización FEDNA. Universidad Autónoma de Barcelona. pp 16.
- Beauchemin, K.A., Colombatto, D., Morgavi, D.P. 2004. A rationale for the development of feed enzyme products for ruminants. Can J Anim Sci 84: 23-36.
- Bedford, M.R. 2000. Mode of action of feed enzymes. J. Appl. Poult. Res. 2:85-92.
- Castañeda, V. M., Meneses, M. M., Miranda, R. L. A., Loera, C. O. 2011. Producción de gas *in vitro* y desaparición de la materia seca del cultivo sólido con hongos ligniolíticos. Agrociencia. 44:917-929. México.
- Chávez-Sifontes, M. y M. E. Domine. 2013. Lignina, estructura y aplicaciones: métodos de despolimerización para la obtención de derivados aromáticos de interés industrial. Avances en Ciencias e Ingeniería. 4(4), 15-46.
- Collins, P. and Dobson, A. 1997. Regulation of Laccase Gene Transcription in *Trametes versicolor*. Applied and environmental microbiology, 78:3444-3450.
- Dávila, G., R. Vázquez. 2006. Enzimas ligniolíticas fúngicas para fines ambientales. Mensaje Bioquímico, Volúmen 30. Universidad Autónoma de México. Cd. Universitaria, México.
- Dean, D.B. 2009. Perspectivas del uso de enzimas fibrolíticas exógenas. ¿Se justifica su uso en ganaderías doble propósito? Capítulo LXVII. Desarrollo sostenible de la ganadería doble propósito. Ediciones Astro Data S.A.
- Duarte, P. M. A. 2011. Evaluación de la producción de enzimas lignolíticas por hongos de la pudrición blanca en fermentación semisólida utilizando desechos agroindustriales como sustrato. Tesis Maestría. UIS. Colombia.
- Duran, N. y Esposito, E. 2000. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. Appl.d Cat. B: Environ. 28:83-89.
- Escalona, C.L., Ponce, P. I., Estrada, M. A., Solano, S. G., Ricardo, S.O. y Cutiño, E.M. 2001. Cambios en la composición bromatológica del garanver + *Pleurotus ostreatus*. Rev. Prod. Anim., 13: 21-24.
- Gellerstedt, G. y G. Henriksson, 2008. Lignins: Major sources, structure and properties. En M. Naceur Belgacem, & A. Gandini (Edits.), Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources (págs. 201224). Amsterdam: Elsevier B.V.
- Hatakka, A. 1994. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi production and role in lignin degradation, FEMS Microbiol Rev 1994; 13: 125-135.
- Jung, H. G., D. R. Mertens y A. J. Payne. 1997 Correlation of Acid Detergent Lignin and Klason Lignin with Digestibility of Forage Dry Matter and Neutral Detergent Fiber; Journal of Dairy Science 80: 1622 – 1628
- Kung, L. Jr., Cohen, M.A., Rode, L.M., Treacher, R.J. 2002. The effect of fibrolytic enzymes sprayed onto forages and fed in a total mixed ration to lactating dairy cows. J Dairy Sci 85: 2396-2402.
- Leonowicz, A., M. Matuszewska, J. Luterek, D. Ziegenhagen, M. Wojtas-Wasilewska, N. Cho, M. Hofrichter y J. Rogalski. 1999. Biodegradation of lignin by White-rot fungi. Fungal Genetics and Biology. 27: 175-185.
- Lu, F. y R. John. 2010. Lignin. In S. Run-Cang, Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biochemicals and Biofuels. First ed., pp. 169-207. Amsterdam: Elsevier B.V.
- Lucas, R., Robles, A., Gálvez, A., García, T., Pérez, R., y Álvarez, G., 2001. Biodegradación de la celulosa y la lignina Universidad de Jaen, primera edición. 14-28, 31-33, 65-69.
- McAllister, T.A., Hristov, A.N., Beauchemin, K.A., Rode, L.M., Cheng, K.J. 2001. Enzymes in Ruminant Diets. In: Enzymes in farm animal nutrition. Eds. MR Bedford, GG Partridge. CABI International, UK. pp. 273-298.
- Mertens, D. R. 2001. Fibra efectiva FDN y su uso en la formulación de raciones para vacas lecheras. En simposium internacional en bovinos. 2., 2001. Lavras.UFLA-FAEPE de 2001. 25-36.
- Mthiyane, D. M. N., Nsahlai, I. V. and Bonsi, M. 2001. The nutritional composition, fermentation characteristics, in sacco degradation and fungal pathogen dynamics of sugarcane tops ensiled with broiler litter with or without water. Anim.Feed Sci. Tech., 94: 171-185.
- Paszczynski, A., R. L. Crawford, and V.-B Huynh. 1995. Manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*:

- purification. *Methods Enzymol.* 161:264-270.
- Quintero, D. C. J., Feijoo, C. G., Lemar, R. M. J. 2006. Producción de enzimas ligninolíticas con hongos *Basidiomicetos* cultivados sobre materiales lignocelulósicos. *VITAE. Revista de la facultad de química farmacéutica.* Vol. 13. No. 2. Colombia.
- Rangel, O.S. 2012. Estudio del efecto de enzimas ligninolíticas y celulolíticas obtenidas del hongo *Pleurotus ostreatus* sobre una gramínea forrajera tropical. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química y Ambiental Bogotá D.C., Colombia
- Tuomela, M., M. Vikman, A. Hattaka y M. Itävaara. 2000. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. *Bioresearch Technology.* 72: 169-183.
- Universidad Santo Tomás, UST. 2008. Factores que afectan la digestibilidad del forraje. Unidad 4. Sistema de educación abierta. Colombia.
- Van Soest, P. J., 1994. *Nutritional Ecology of the Ruminant.* 2ndCed. Cornell University Press, Ithaca, NY.