

Utilización de residuos de cosecha y subproductos agrícolas en la producción de alimentos para animales rumiantes.

Utilization of crop residues and agricultural byproducts in feed production for ruminant animals.

Alexis Ferrer¹
Cateryna Aiello²
Olga Bravo³
Anselmo Ledesma¹
Irene Zabala¹
Miguel Dávila¹

Resumen

En los últimos años la cría de animales se ha visto afectada por los costos de los alimentos concentrados, principalmente en aquellas unidades de producción que emplean pastos como fuente principal de alimento de sus rebaños. Esta situación está asociada fundamentalmente a la irregular distribución de las lluvias a lo largo del año. La conservación de los pastos es la alternativa que hasta ahora se ha utilizado. Sin embargo la calidad de los henos producidos hace que cada día deban utilizarse alimentos concentrados y suplementos proteicos para poder suministrar los requerimientos nutricionales al animal, trayendo como consecuencia una disminución del rendimiento de la unidad de producción. En este trabajo se presenta una alternativa no tradicional, que puede aumentar de forma inmediata y significativa el volumen de alimentos energéticos disponibles para la alimentación de rumiantes. Esta propuesta está basada en los resultados obtenidos de la evaluación de un material lignocelulósico, el bagacillo de caña de azúcar, con el fin de utilizarlo para la producción de proteína microbiana para alimento animal. Se conoce ya que este tipo de materia no presenta problemas de accesibilidad para la degradación por enzimas de microorganismos, por ejemplo, los presentes en el rumen de los animales rumiantes. Por esta razón se recurre a pre-tratamientos fisicoquímicos, bioquímicos y microbiológicos. De estos, se han escogido entre los fisicoquímicos, la adición de álcali y agua, y entre los microbiológicos, la

1 Laboratorio de Alimentos. Departamento de Química Facultad Experimental de Ciencias. Universidad del Zulia. Estado Zulia.

2 Laboratorio de Química Analítica. Ciclo Básico. Facultad de Ingeniería. Universidad del Zulia. Estado Zulia

3 Universidad Francisco de Miranda. Estado Falcón.

adición de hongos celulolíticos. La técnica de fermentación en estado sólido (FES) fue la seleccionada para evaluar la digestibilidad microbiana y se utilizaron dos tipos de hongos: un hongo productor de un complejo celulásico extracelular, *T. reesei* QM 9414, y un hongo con su complejo adherido a la pared celular, *Ch. cellulolyticum*, ambos ampliamente reconocidos como buenos degradadores de los sustratos lignocelulósicos.

Palabras claves: bagacillo de caña, proteína microbiana, hongos celulolíticos, digestibilidad

Abstract

In the last years, animal breeding has been affected by cost of concentrated food, mainly in those production units that use grass as principal source for animal feeding. This situation is strongly associated with the irregular distribution of the rainy season during the year. Preservation of the grass is the one alternative that, to this moment, has been used. However the quality of the grass with such process involve the use of concentrated food and protein supplements to fulfill the nutritional requirements of the animal, representing a lower yield for producers. In this work, a non-conventional alternative is presented that could rapidly increase the volume of energetic food available for ruminant feeding. This proposal is based in results obtained from an evaluation of lignocellulosic material sugar cane bagasse pith, for animal feeding. This kind of material does not have problems in the accessibility for the degradation with microbial enzymes, for example, by the ones present in the ruminal animals. For this reason, some physicochemical, biochemical and microbiological pre-treatments have been used. From those, water and alkali addition and cellulolytic fungi addition have been chosen. The technique of solid-state fermentation (FES) was selected to evaluate the microbial digestibility and two fungi was used, *T. reesei* QM 9414 with an extracellular cellulose complex and *Ch. cellulolyticum* with cellulolytic enzymes adhered to the cell wall.

Key words: Sugarcane bagasse, microbial protein, cellulolytic fungi, digestibility

Introducción

El déficit alimenticio en las zonas tropicales durante la época seca es característico de las productoras ganaderas que utilizan pastos y forrajes como fuente principal de alimentos de sus animales. Esta situa-

ción se presenta debido a la irregular distribución de las lluvias, principalmente en las zonas de tipo bosque seco y muy seco tropical, que causa una irregular producción del forraje, gran producción y excedentes duran-

te la época lluviosa, seguidos de un déficit durante la época seca, en la cual se da una mala alimentación de los animales, causando pérdidas al productor.

La alternativa tradicional usada para solventar este problema y hacer más rentables las unidades de producción ha sido la conservación de forrajes, ensilaje o henificación, aprovechando así el excedente de la época lluviosa, sin embargo, en cualquiera de los casos la calidad final del material está determinada por la calidad del forraje y por la manipulación del mismo.

La henificación es una de las prácticas más adoptadas por los productores de la región zuliana (36), pero para aplicar esta técnica se debe esperar a que finalice el período de lluvias. En la región El Laberinto, el heno es la base principal del alimento en la ración de los animales durante la época seca y el inicio del período de lluvia. La especie forrajera más utilizada para la henificación en esta región es el pasto Guinea (*Panicum maximum*). La calidad nutritiva del heno depende de ciertos factores y condiciones, principalmente de la calidad del forraje al momento del corte. Lo más recomendable es realizar el corte alrededor de la época de floración del pasto (40). Cuando el pasto aumenta en edad el contenido proteico disminuye aumentando el porcentaje de los componentes de la pared celular, celulosa, hemicelulosa y lignina, esto ocasiona que la digestibilidad de los pastos se reduce. Las condiciones climáticas, sol y lluvia, durante el pro-

ceso de secado y empacado, así como el período de almacenamiento causan disminución de la calidad del heno. Las condiciones ambientales prevalecientes en la región zuliana hacen muy difícil la obtención de henos de muy buena calidad que permitan por si solos garantizar una buena producción animal, lo cual hace necesario el uso de suplementos para mejorar la calidad del alimento suministrado a los animales. La utilización del heno debe planificarse en función de su calidad, del tipo de animal alimentarse y de la producción animal esperada (37).

El consumo voluntario del alimento por el animal está ligado a muchos factores tanto de origen animal: capacidad ruminal, tasa de remoción de la ingesta, genotipo, estado fisiológico, lactación, preñez, edad, tamaño corporal, alimentación previa y estado nutricional del animal, como de origen vegetal: estructura física y química del forraje (12, 27, 28, 34, 38). Cuando se tiene un déficit de proteína, el consumo voluntario de alimento disminuye como consecuencia de alteraciones en los mecanismos de control o debido a que la flora ruminal ha reducido la tasa de digestión (27). Es importante mantener un adecuado nivel de nitrógeno en el animal para que no baje el consumo. Para que no ocurra una disminución del consumo de alimento por el animal el nivel mínimo requerido de proteína cruda es de 7 por ciento, manteniéndose de esta forma un balance de nitrógeno positivo.

Taller Alternativas para la Alimentación del Ganado Bovino durante el Período Seco

Los henos producidos en la región zuliana son de regular a mala calidad. Contenidos de proteína cruda de 5.2 por ciento fueron encontrados en henos cosechados de diciembre a febrero en la zona El Laberinto (37). Estudios en henos de la zona El Laberinto cosechados en dos épocas del año dieron como resultado que en la primera época (diciembre a febrero) el contenido de proteína cruda osciló entre 5.62 y 8.44 por ciento y en la segunda época (veranito de San Juan) osciló entre 5.37 y 6.89 por ciento (29). Dada la variación que puede encontrarse en el porcentaje de proteína cruda en los henos elaborados y a su baja calidad, la unidad de producción debe conocer la calidad del heno elaborado y establecer programas de alimentación considerando los requerimientos de alimentación de cada grupo o rebaño. Los nutrientes consumidos por el animal están en función del alimento consumido, del valor alimenticio y de la eficiencia de utilización del alimento digerido. El heno sólo no es adecuado dada su calidad y el uso de suplementos aumenta el costo de alimentación de la unidad de producción.

Se ha considerado el mejoramiento de pastos lignificados, pues su producción ya está establecida, pero tradicionalmente se les utiliza frescos y el ganado los consume por pastoreo directo, prácticas que disminuyen notablemente la productividad de las siembras y el aprovechamiento del alimento por el animal.

Una alternativa que presenta la mayor probabilidad de éxito es el

mejoramiento del heno de baja calidad. Para esto se propone someter el heno cosechado y que resulte de baja calidad, a un proceso fermentativo, que permitiría incrementar la digestibilidad y calidad proteica del mismo, de modo que se pueda minimizar el uso de alimentos concentrados de alto costo y por consiguiente obtener un mayor rendimiento de las unidades de producción.

El proceso comenzaría con el acondicionamiento del heno, que sería la molienda y tamizado del mismo hasta un tamaño que podría estar entre 6-10 mm, luego se sometería a un pre-tratamiento químico opcional, según las necesidades y características del material, hasta ahora se presentan dos vías con gran potencialidad, lavado y humedecimiento con agua y explosión térmica con amoníaco (Proceso AFEX). El siguiente paso sería someter esta fibra pre-tratada a un proceso de fermentación con hongos celulolíticos.

Lograr incrementar el contenido proteico y la digestibilidad del heno implica obtener mayor producción de volumen por hectárea y mayor consumo de materia seca digerible por cabeza de ganado. Este tipo de tecnología ayudaría a reforzar la implementación de las prácticas intensivas de cría tan urgentes y necesarias para así aumentar la producción pecuaria en el país.

La tecnología que generaría este proyecto y los productos de ella derivados, entrarían a llenar un vacío en la producción agropecuaria sin sustituir o competir con otros

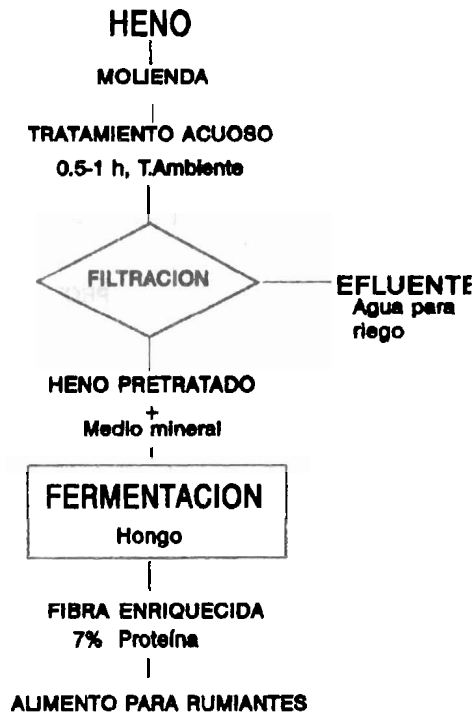


Figura 1. Mejoramiento del heno por tratamiento acuoso

insumos, debido a la alta demanda existente. Este proyecto puede generar tecnología blanda, es decir, un proceso que puede ser utilizado a nivel de finca, lo que redundaría en un aumento de rentabilidad a nivel de producción. A nivel social la contratación de personal para el manejo de la tecnología en el campo contri-

buiría a aumentar el nivel de empleo y remuneración.

Esta alternativa se presenta con gran viabilidad, dados los resultados que se han obtenido de las numerosas investigaciones han sido realizadas con materiales lignocelulósicos con un contenido de nitrógeno

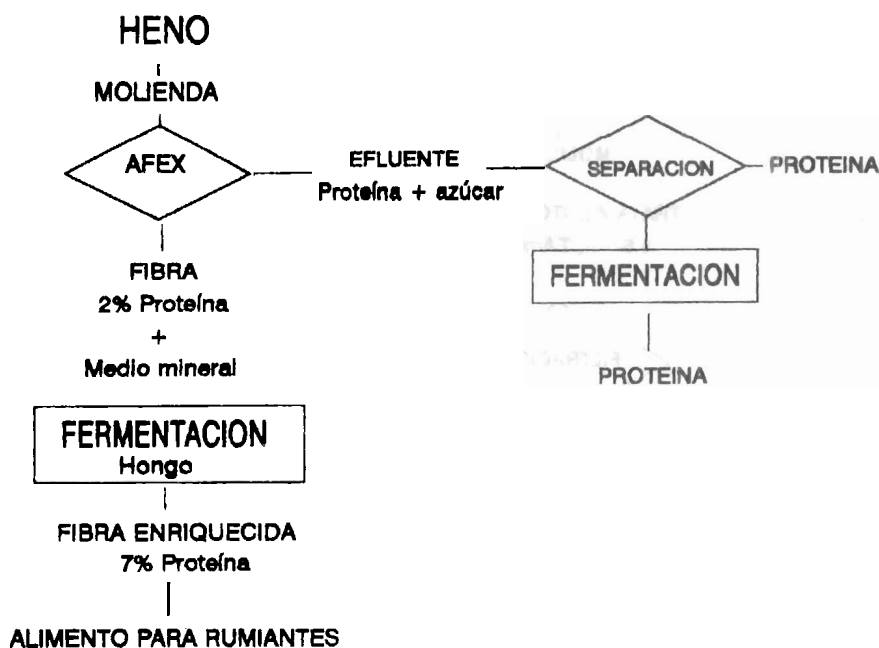


Figura 2. Mejoramiento del heno por el proceso AFEX

inicial muy bajo. La utilización de los desechos lignocelulósicos que año tras año se vienen acumulando en los alrededores de fábricas, industrias y fincas, enriquecidos con proteína microbiana y suplementos minerales, resulta ser una alternativa bastante atractiva para la alimentación de animales, particularmente de rumiantes, ya que la mayoría de estos materiales, ricos en lignocelulosa, difícilmente digeribles, son muy abundantes en Venezuela y en otros países del área y constituyen un gran potencial para suministrar energía a la dieta de los animales. Estudios realizados sobre la dispo-

nibilidad y localización de los residuos lignocelulósicos en Venezuela, con miras a posteriores estudios de producción de proteína microbiana, enzimas y metabolitos, muestran que los residuos con mayor potencialidad de uso son el follaje de sorgo, el bagazo y bagacillo de caña de azúcar y el follaje de maíz, no existiendo entre ellos diferencias significativas en cuanto a las posibilidades de su aprovechamiento. Sin embargo, para la producción de proteína microbiana y enzimas se recomienda el uso del bagacillo de caña de azúcar y el follaje de sorgo (5).

El bagacillo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) es un desecho agroindustrial que contiene aproximadamente 30% de celulosa (14) es altamente recomendable para este propósito debido a la continua generación de grandes cantidades, facilidad de recolección, nivel de fibra y digestibilidad.

La celulosa es el mayor componente de estos materiales y está asociada a la lignina y hemicelulosas, lo cual dificulta su aprovechamiento por el animal y su degradación es muy difícil. Para promover la hidrólisis e incrementar su utilización por los microorganismos y mejorar la digestibilidad de los materiales lignocelulósicos se han propuesto una diversidad de tratamientos, entre los cuales se encuentran tratamientos con álcali, ácidos, solventes orgánicos, sulfito, amonio, lavado y humedecimiento con agua, explosión térmica con vapor y molienda. Todos los materiales lignocelulósicos son particularmente complejos y variables en su composición y estructura, por lo que un estudio de tratamientos que potencialmente puedan mejorar la digestibilidad y accesibilidad de la celulosa, debe ser específico para cada uno. Una revisión detallada de diversos tratamientos aplicados a materiales lignocelulósicos ha sido realizada por Ferrer y col., 1990. Es importante destacar que el objetivo no es exclusivamente eliminar la lignina, en algunos casos bastará con romper los enlaces que la unen a los polisacaridos digeribles así como provocar hinchamiento de la estructura de éstos. Además cuando el ob-

jetivo es producir un alimento para rumiantes, no será satisfactoria la eliminación de la lignina, si ésta viene acompañada de eliminación apreciable de carbohidratos energéticos como la celulosa y la hem. celulosa. Uno de los tratamientos físico-químicos mas ensayados y reportados en la literatura es el tratamiento con hidróxido de sodio. Concentraciones entre el 4 y 8 por ciento (g NaOH/100 g material seco) son las más reportadas, aunque para residuos de caña de azúcar la más recomendada es la del 5 por ciento. Sin embargo no puede establecerse un tratamiento óptimo sin considerar el tiempo de contacto, la relación líquido/sólido y la temperatura, ya que estos parámetros inciden tanto sobre los efectos del tratamiento como en la economía del proceso (14). El lavado y/o humedecimiento con agua como tratamiento causa expansiones de la estructura capilar de la celulosa y como consecuencia, un aumento del área superficial, haciendo así más accesible el sustrato al ataque enzimático y microbiológico (3,4,6). Este tratamiento ha sido poco ensayado, pero dado los bajos costos del mismo es muy recomendable su estudio.

Aún no se ha encontrado un tratamiento que sea efectivo y económico, que sea capaz de aumentar el desdoblamiento de la lignocelulosa en el rumen o la accesibilidad de la celulosa al ataque enzimático o de microorganismos.

La factibilidad de estos procesos de tratamiento depende principalmente de bajos costos de la mate-

ria prima, bajos costos de energía y operación y bajos costos de inversión, en otras palabras, tecnología de bajo costo. En este sentido la mejor alternativa tecnológica la ofrecen los procesos donde el crecimiento microbiano se realice sobre sustratos sólidos pre-tratados. En el tratamiento microbiológico de sustratos lignocelulósicos han sido probados un gran número de microorganismos, con capacidad de atacar, consumir o hidrolizar celulosa, lignina o hemicelulosa. Se ha encontrado que la deslignificación biológica tiene un alto grado de correlación con el aumento de la digestibilidad de los sustratos (20,21,32). Una ventaja adicional de esta alternativa es el mejoramiento de la calidad del sustrato ya que se le adiciona nitrógeno proteico con la biomasa del microorganismo utilizado (1, 3, 4, 6, 7, 10, 14). Sin embargo no parece recomendable aumentar el contenido proteico del sustrato a expensas de la energía metabolizable proporcionada por la celulosa presente, a menos que el aumento de digestibilidad causado por los tratamientos sea superior al 55 por ciento (14, 29). Un aumento de digestibilidad es buen indicador del mejoramiento del sustrato, pero no del mejoramiento nutricional absoluto del alimento, ya que éste depende de muchos factores que incluyen la palatabilidad, la capacidad del rumen, tiempo de residencia y toxicidad del material para la flora ruminal. Además de estos factores debe considerarse también la susceptibilidad de los polisacáridos a ser hidrolizados enzimáticamente. La digestibilidad de los materiales lignocelulósicos es

un término sumamente amplio y controversial, que se utiliza como una medida del valor de los alimentos, pretende definir la susceptibilidad real que tiene un alimento de ser aprovechado por un animal.

La tecnología desarrollada para utilizar desechos lignocelulósicos como sustratos de fermentación para producir enzimas y bioproteínas, además de aliviar problemas de orden alimentario, reduce la cantidad de desechos, disminuyendo así los riesgos de contaminación. Los procesos de fermentación en estado sólido (FES) son los más utilizados. El término FES ha sido utilizado para definir cualquier proceso de fermentación realizado sobre sustrato sólido o semi-sólido, o bien que ocurra en soportes nutricionales inertes que faciliten al microorganismo la utilización de nutrientes (2). Se considera que la fermentación en estado sólido describe la transformación microbiológica de materiales biológicos en su estado natural, en contraste con la fermentación sumergida, la cual se lleva a cabo en soluciones diluidas o suspensiones. El crecimiento sobre superficies sólidas es característico de hongos que destruyen la materia orgánica, alimentos y materiales alimenticios, así como de algunas bacterias que participan en compostaje y ensilaje.

El sistema de fermentación en estado sólido, ofrece ventajas sobre el sumergido, entre las cuales se destacan, a) reducción del volumen de medio líquido por unidad de sustrato, b) la baja humedad requerida para máximo rendimiento de pro-

ducto minimiza los problemas de contaminación bacteriana, c) no se adicionan grandes cantidades de agua al material biológico, el volumen de fermentación permanece pequeño, menos manipulaciones son necesarias y el costo de remoción de agua al final de la fermentación se elimina, d) las condiciones bajo las cuales se da el crecimiento del hongo son más parecidas a las encontradas en su hábitat natural y las esporas del hongo pueden ser utilizadas directamente en la fermentación, e) el producto deseado puede extraerse fácilmente y como es concentrado puede secarse e incorporarse directamente dentro de un alimento para animales, f) el espacio requerido por los equipos de fermentación es relativamente pequeño en comparación con los utilizados en fermentación sumergida. La tecnología es sencilla y de bajo costo. A pesar de todas estas ventajas, también se conoce de las dificultades existentes en cuanto al control de la humedad, aireación y pH, así como la remoción del calor generado y el escalamiento de los procesos de laboratorio a operaciones a gran escala (2, 8, 19, 31, 35.).

Diferentes microorganismos, con capacidad de hidrolizar celulosa, hemicelulosa o lignina, han sido recomendados para la producción de proteína utilizando materiales lignocelulósicos como sustratos de fermentación. *Trichoderma reesei* **QM 9414** es uno de los microorganismos más ampliamente estudiado y ha sido usado en numerosas investigaciones tanto para la producción de celulasa como de proteína microbia-

na. Uno de esos estudios corresponde a la evaluación de este hongo en fermentación sumergida de bagazo de caña de azúcar tratado con álcali (3) y sus resultados en cuanto a la producción de proteína son objeto de comparación en este trabajo. *T. reesei* es un hongo excretor de un complejo enzimático de celulasa de gran actividad, concretamente la cepa **QM 9414** es un mutante cuyo poder de producción de celulasa es cuatro veces mayor que la cepa original QM 6a (22, 23). *Chaetomium cellulolyticum* ha sido señalado como uno de los mejores microorganismos para la producción de proteína microbiana debido a su capacidad para utilizar eficientemente los materiales lignocelulósicos (7, 11, 18, 26, 33). *Ch. cellulolyticum* presenta características ventajosas para la producción de proteína microbiana, tales como termotolerancia, alto poder de penetración en las fibras de celulosa, capacidad de degradación de celulosa y hemicelulosa, inocuidad y alta velocidad de crecimiento (10, 11, 26). *Ch. cellulolyticum* ha mostrado ser óptimo para la producción de proteína mientras que *T. reesei* es el mejor productor de celulasa extracelular (33). Parece que *Ch. cellulolyticum* solo produce cantidades adecuadas de celulasa para producir intermedios asimilables, celobiosa y glucosa, para la producción de biomasa. Así la síntesis de celulasa se detiene cuando el crecimiento se alcanza, mientras que *T. reesei* continúa produciendo enzimas. Se ha encontrado que la composición de aminoácidos de *Ch. cellulolyticum* es generalmente mejor que la de *T. reesei* y se com-

para favorablemente con la alfalfa, harina de soya y con la proteína de referencia de la soya (26).

En este trabajo se presenta la evaluación de un sustrato lignocelulósico, el bagacillo de caña de azúcar, con el fin de utilizarlo para la producción de proteína microbiana para ali-

mento animal. El bagacillo de caña de azúcar fué sometido a pre-tratamientos alcalino y acuoso. El proceso de fermentación en estado sólido fué el seleccionado y se realizaron pruebas con *T. reesei* y *Ch. cellulolyticum*.

Materiales y métodos

Sustrato: Se utilizó bagacillo de caña de azúcar, todo de un mismo lote, proveniente del Central Azucarero "El Palmar" ubicado en el Estado Aragua.

Pre-tratamientos del sustrato: El bagacillo de caña de azúcar se pre-trató con álcali y con agua, a diferentes relaciones Líquido/Sólido (L/S). El Cuadro 1 presenta el diseño experimental de los pre-tratamientos del sustrato.

ocasión se recuperaron por filtración, utilizando un filtro Oklahoma. El tratamiento acuoso (BTAL) se realizó bajo las mismas condiciones que el tratamiento alcalino, utilizando agua destilada. Una vez tratados los sustratos se sometieron a un proceso de secado a 80°C por 48 h y se guardaron bajo refrigeración hasta el momento de su uso.

Cuadro 1. Diseño Experimental: Pre-tratamientos del sustrato

Tratamientos	Relación Líquido/Sólido		
	1	2	5
AGUA	BTAL-1	BTAL-2	BTAL-5
ALCALI	BTL-1	BTL-2	BTL-5
NINGUNO		BNT	

El tratamiento con álcali (BTL) se realizó con NaOH grado técnico y se usaron 5 g de NaOH por cada 100 g de bagacillo seco y agua hasta obtener la relación líquido/sólido deseada. Se dejó en reposo por 30 min a la temperatura ambiente del laboratorio (29°C). Se lavó tres veces con agua acidulada a pH 2 y en cada

Microorganismos:

Trichoderma reesei QM 9414, se mantiene en cuñas de agar papa con 0.025 por ciento de glucosa (13) y a 28°C cubre la superficie con esporas de color verde en tiempos de 5-7 días. Para lograr una abundante esporulación se preparó una suspen-

sión de esporas agregando 10 ml de agua destilada estéril a una cuña de agar papa con esporas y luego se inocularon fiolas de 250 ml con arroz previamente lavado, escurrido y esterilizado a 121°C por 20 min. Una vez inoculadas las fiolas se incubaron a 28°C por 4 días, al cabo de los cuales se observa que el arroz está completamente lleno de esporas que le confieren una coloración verde intenso. Para preparar la suspensión de esporas se agrega agua destilada estéril y luego se realiza el conteo en la Cámara de Neubauer para determinar su concentración. Para todas las fermentaciones con *T. reesei* QM 9414, el inóculo fue de 10^6 esporas/g de sustrato. La cantidad de esporas a inocular se pasó a medio mineral de Mandels-Weber (23) para provocar su germinación, ahorrando tiempo

de fermentación. Las esporas se incubaron a 28°C y 150 rpm de agitación por un tiempo que oscila entre 10 y 24 horas, determinándose por observaciones al microscopio y tomándose como criterio que el tamaño de la hifa formada sea aproximadamente igual al diámetro de la espora (17).

Chaetomiun cellulolyticum ATCC 32319 se mantiene a 37°C en cuñas de agar conejarina (ATCC-340). la superficie del agar se llena de ascosporas de color negro en tiempos de 4-6 días. Para las fermentaciones se usa un inóculo micelial de 2 por ciento en peso (1). Se remueven ascosporas de una cuña de agar conejarina con 10 ml de medio mineral Mandels-Weber (23) que contiene 0.1% de extracto de levadura y 1% de glucosa y se prepara una suspensión

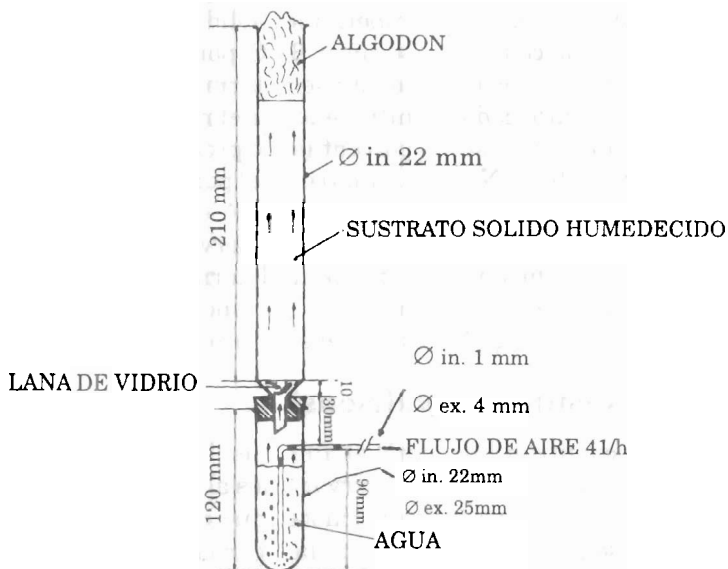


Figura 3. Diseño de las columnas de fermentación

de 2×10^6 esporas/ml. Esta suspensión se añade a una fiola de 250 ml con 90 ml del mismo medio y se incuba por 48 h a 37°C y 250 rpm. Con 10 ml de esta suspensión micelial se inocula una fiola de 250 ml con 100 ml de medio mineral Mandels-Weber con 0.1% de extracto de levadura, 0.1% de glucosa y 1% de bagacillo de caña de azúcar, se incuba por 48 h a las mismas condiciones. La concentración final del micelio se ajusta a 3% p/v por eliminación de parte del líquido.

Fermentaciones

Las fermentaciones se realizaron en una Unidad de fermentadores de columna a escala de laboratorio (30). Esta consiste de 30 columnas de vidrio con entrada individual de aire saturado de agua a un flujo de 4 l/h, colocadas en un baño de agua a temperatura controlada por un sistema automático de control VENTROL, Termotrol 2000. Cada columna tiene una capacidad de 25-30 g de material sólido húmedo empacado suavemente. Las fermentaciones se realizaron a la relación Carbono/Nitrógeno de 10 y la cantidad de medio mineral agregada por gramo de sustrato se calculó en base a la humedad de saturación del sustrato. En las fermentaciones con *T. reesei* **QM**

9414 se utilizó el medio Mandels-Weber y temperatura de 28 °C y con *Ch. cellulolyticum*, el medio Chahal-Gray modificado (9) y temperatura de 37 °C. Todas las fermentaciones se realizaron por duplicado.

Tratamiento de las muestras

Cada día se retiraron dos columnas tomadas al azar. Previo a los análisis todo el contenido de las mismas se colocó en un recipiente y fue uniformizado. El pH fue medido en un suspensión de 5 g de este material sólido en 50 ml de agua destilada estéril (30). El contenido de humedad se determinó mediante el uso de 10 g de este material y una Balanza de humedad (OHAUS Scale Corporation, modelo 6010). Estos 10 g se mezclan con el resto del material sólido y se someten a un lavado para remover el nitrógeno residual, se recuperan los sólidos por filtración, se secan a 80°C por 24 h y posteriormente se determina el contenido de nitrógeno por el método Kjeldahl. El porcentaje de proteína cruda (PC) se estimó como el porcentaje de nitrógeno por 6.25. A cada muestra se le realizaron observaciones al microscopio para determinar el estado del micelio y la esporulación del hongo sobre el sustrato.

Resultados y discusión

El Cuadro 2 se encuentran los valores del contenido de proteína de la fibra al final de las fermentaciones. A lo largo del proceso el contenido de proteína aumentó hasta obtenerse un máximo, valor que determi-

na el final de las fermentaciones. Observaciones al microscopio permiten conocer que este máximo coincide con la aparición de estructuras reproductivas de cada hongo.

Cuadro 2. Porcentaje de proteína al final de las fermentaciones

SUSTRATO	PORCENTAJE DE PROTEINA	
	<i>T. reesei</i> QM 9414	<i>Ch. cellulolyticum</i>
BNT	7.25	4.34
BTL-5	8.19	7.00
BTAL-5	6.94	6.44

* El contenido de proteína del bagacillo sin tratar ni fermentar es de 2.03 por ciento.

Los resultados muestran que la fermentación en estado sólido realizada a nivel de laboratorio en columnas usando *T. reesei* QM 9414 y *Ch. cellulolyticum* detecta diferencias apreciables entre los pre-tratamientos aplicados al bagacillo. Tanto el pre-tratamiento alcalino como el acuoso realizado a L/S de 5, produjeron un incremento significativo del porcentaje de proteína después de la fermentación. Basta con fermentar el bagacillo (BNT) con *T. reesei* para triplicar su contenido proteico, sería conveniente investigar si este valor 6.94 por ciento de proteína obtenido con BTAL es limitante en pruebas en vivo, en relación al consumo voluntario por parte del animal.

En otro estudio se determinó la digestibilidad en muestras de BNT sin fermentar y fermentado con *T. reesei* y se observó que la digestibilidad ruminal aumento de 15.43 a 25.48 por ciento, lo cual corresponde a un incremento de 65 por ciento (15). Este resultado demuestra que el aumento producido en la digestibilidad por el incremento del contenido proteico del bagacillo al ser sometido a una fermentación con *T. reesei* se produce a pesar de que la

celulosa disminuye. También se demuestra que la proteína del hongo es altamente digerible en el rumen.

Resultados similares fueron obtenidos por fermentación sumergida (FS) de bagacillo de caña de azúcar, de un mismo lote y pre-tratado con álcali a las mismas condiciones (3, 13).

El Cuadro 3 presenta los resultados de la producción de proteína obtenida por fermentación de bagacillo de caña de azúcar tratado con álcali (BTL-5) y no tratado (BNT) todo de un mismo lote, por ambas técnicas fermentativas. Los datos de FES provienen de este trabajo, mientras que los de FS de los reportados por Aiello (3). El aumento de la producción de proteína debido al tratamiento alcalino, es de 12-13 por ciento para ambas técnicas de fermentación. Se observa también que la producción de proteína por fermentación sumergida es superior y similar, tanto para bagacillo tratado con álcali (12-12.5 por ciento). Esto parece indicar que la fermentación sumergida es la técnica adecuada para alcanzar mayores niveles de proteína en el bagacillo. Sin embargo la producción obtenida de fibra enri-

Cuadro 3. Comparación de la producción de proteína por fermentación sumergida y sólida.

TECNICA SUSTRATO	FES	FS	% AUMENTO
BNT	7.25	8.16	12.5
BTL	8.19	9.17	12.0
% AUMENTO	13.0	12.4	

quecida (bagacillo + proteína microbiana), tomando como base un mismo volumen de fermentación, sería aproximadamente 2.5 veces mayor en fermentación sólida. Esto representa economía en los procesos a gran escala, ya que se reduciría el tamaño de los reactores de fermentación, así como el efluente final ya que el producto puede usarse directamente y no habría necesidad de filtración o centrifugación.

T. reesei ha sido poco utilizado para la producción de proteína microbiana por fermentación en estado sólido, por lo general se ha preferido para la producción de enzimas debido a su complejo extracelular de ce-

lulasa de gran actividad. *Ch. cellulolyticum* presenta menor producción de proteína en comparación a *T. reesei* en todos los sustratos pre-tratados a L/S de 5, esto probablemente debido a dificultades en el control de humedad en las columnas, lo cual causó una temprana esporulación del hongo (6).

El Cuadro 4, presenta los valores finales de las fermentaciones de *Ch. cellulolyticum* con los diferentes sustratos pre-tratados. Se puede observar que el pre-tratamiento alcalino fue superior al acuoso. De ellos el BTL-1 presenta el mayor porcentaje de proteína (8.65 por ciento), el cual representa un aumento de 3.3 veces

Cuadro 4. Contenido de proteína al final de las fermentaciones de *Ch. cellulolyticum*.

SUSTRATO	PORCENTAJE DE PROTEINA
BNT	4.34
BTL-1	8.65
BTL-2	7.43
BTL-5	7.00
BTAL-1	6.31
BTAL-2	6.97
BTAL-5	6.44

en relación al contenido de proteína del bagacillo no tratado. Todos los sustratos pre-tratados con álcali, alcanzan o sobrepasan, después de la fermentación el nivel crítico de 7 por ciento, necesario para mantener el consumo voluntario de alimento por el animal.

El contenido proteico alcanzado en todas las fermentaciones con de los bagacillos pre-tratados, desde 6.31 hasta 8.65 por ciento, demuestra la conveniencia de realizar la evaluación "in vivo" de estos productos, ya que su potencial como alimento para rumiantes es muy alto. Tanto el pre-tratamiento alcalino como el acuoso producen productos alta-

mente enriquecidos con proteínas, por lo que se recomienda su evaluación técnico-económico. Estos resultados hacen que las propuestas que aparecen en las Figuras 1 y 2 presenten grandes probabilidades de éxito, dada la gran experiencia y conocimientos que el manejo del bagacillo de caña de azúcar y los procesos de fermentación en estado sólido han brindado (3, 4, 6, 13, 14, 15). Actualmente se continúa en la misma línea de investigación, tratando de mejorar los resultados ya obtenidos y escalando los procesos de laboratorio a procesos en escala piloto, con el fin de evaluar "in vivo" el producto obtenido.

Literatura citada

1. Abdullah, A. L., Tengerdy, R. P. y Murphy, V. G. Optimization of solid substrate fermentation on wheat straw. *Biotechnology and Bioengineering*, 27: 20-27, 1985.
2. Aido, K. E., Hendry, R. y Wood, B. J. B. Solid substrate fermentations. *Advanced of Applied Microbiology*, 28: 201-237, 1982
3. Aiello, M., C. Producción de celulasa por fermentación de bagazo de caña de azúcar. Universidad del Zulia. Facultad de Ingeniería. Escuela de Ingeniería Química. 1986 (Trabajo Especial de Grado)
4. Aiello, M., C. Producción de proteína microbiana por fermentación en estado sólido de bagacillo de caña de azúcar. Universidad del Zulia. Facultad de Ingeniería. División de Posgrado. Maestría en Ingeniería Química. 1992. (Tesis de Grado)
5. Alvarez, M. D., Ramírez, M., Carrizales., V. Primer informe técnico sobre la disponibilidad de residuos lignocelulósicos en Venezuela. Programa Regional de Biotecnología para América Latina y el Caribe. Comisión Nacional de Ingeniería Genética y Biotecnología. Proyecto "Degradación enzimática de residuos agroindustriales". 1988.
6. Bravo, O. M., Producción de proteína de *Chaetomium cellulolyticum* por fermentación en estado sólido. Universidad del Zulia. Facultad Experimental de Ciencias. División de Posgrado. Maestría en Microbiología. 1992. (Tesis de Grado)
7. Carrizales, V. y Saenz, D. Enriquecimiento proteínico del bagacillo de caña mediante cultivo semisólido de *Chaetomium cellulolyticum*. *Acta Cient. Venezolana*, 37: 580-586, 1986.
8. Cannel, E. y Moo-Young, M. Solid-state fermentation systems. *Process Biochemistry*, 15:24-28, 1980.
9. Chahal, D. S. y Gray W. D. In: Biodeterioration of lignocellulosic materials: microbial and allied aspects. H. H. Walter and J. S. Elphick, eds., Elsevier, London. 1968. p. 584
10. Chahal, D. S., Moo-Young, M. y Hillon, G.S. Bioconversion of wheat straw components into single-cell protein. *Canadian Journal of Microbiology*, 25: 793-797, 1979.

Taller Alternativas para la Alimentación del Ganado
Bovino durante el Período Seco

11. Chahal, D. S. y Moo-Young, M. Protein production and growth characteristics of *Chaetomium cellulolyticum* during solid state fermentation of corn stover. *Mycologia*, 75: 597-603, 1983.
12. Durand de P., S. Evaluación cuantitativa de los pastos Guinea (*Panicum maximum* Jacq. y Survenola (*Digitaria xumfolozi*, Hall). Universidad del Zulia. Facultad de Agronomía. División de Estudios para Graduados. 1982 (Tesis de Maestría).
13. Ferrer, A. Producción de celulosa y biomasa de bagacillo de caña de azúcar. *Ciencias*. 1: 129-135, 1984.
14. Ferrer, A., Aiello, C., Ledesma, A., Zabala, I. y Palmar, S. Primer informe técnico del proyecto CONICIT CNIGB-4. "Degradación enzimática de residuos lignocelulósicos: su utilización en la producción de enzimas y bioproteínas". Universidad del Zulia. 1990.
15. Ferrer, A., Aiello, C., Bravo, O., Ledesma, A., Zabala, I. y Dávila, M. Segundo informe técnico del proyecto CONICIT CNIGB-4. "Degradación enzimática de residuos lignocelulósicos: su utilización en la producción de enzimas y bioproteínas". Universidad del Zulia. 1992.
16. Griffin, H. L. Filter paper assay - effect of time and substrate concentration on cellulose activity. *Analytical Biochemistry*, 56: 621- 625, 1973.
17. Gutierrez R., M. Curso de Fermentaciones en medio sólido. Biotecnología para el aprovechamiento de residuos agroindustriales. X Curso Internacional de Ingeniería Bioquímica. Universidad Católica de Valparaíso, Chile 3-6 de Octubre, 1989.
18. Hetch, V., Schugerl, K. y Scheiding, W. Optimization of cellulose conversion into fungal cell mass. *Journal of Chemistry Technology and Biotechnology*, 33B: 231-240, 1983.
19. Hesseltine, C. W., Solid State fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 14: 517-532, 1972.
20. Kirk, T. K., Connors, W. L., Bleam, R. D., Hockett, W. T. y Zeikus, J. G. Preparation and microbial decomposition of synthetic (14-C)Lignins. *Proceeding of Natural Academy Science, N.S.A.*, 72: 2515-2519, 1975.
21. Kirk, T. K. y Chang, H. M. Decomposition of lignin by white-rot fungi. I. Isolation of heavily degraded lignins from decayed spruce. *Holzforschung*, 28: 790-794, 1978.
22. Mandels, M., y Weber, J. The production of cellulases. *Advances Chemical Series*. 95: 391-414, 1969.
23. Mandels, M., Weber, J. y Parizek, R. Enhanced cellulase production by a mutant of *Trichoderma viride*. *Applied Microbiology*, 1: 152-154, 1971.
24. Mandels, M., Andreotti, R. y Roche, Ch. Measurement of saccharifying cellulase. *Biotechnology and Bioengineering*, 6: 21-23, 1976.
25. Miller, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31: 423-428, 1959.
26. Moo-Young, M., Chahal, D. S., Swan, J. E. y Robinson, C. W. SCP production by *Chaetomium cellulolyticum*, a new thermotolerant cellulolytic fungus. *Biotechnology and Bioengineering*, 19: 527-538, 1977.
27. Moore, J. E. Determination of voluntary intake and digestion coefficients of cured forages. In: L. E. Harris (Ed) *Nutrition Research Techniques for Domestic and Wild Animals*. P. 510L., Logan, Utah, 1970
28. Moore, J. E. y Mott, G. O. Recovery of residual organic matter from "in vitro" digestion of forages. *Journal of Dairy Science*, 57: 1258-1259, 1974.
29. Osuna, D., Evaluación bromatológica de henos elaborados en la zona "El Laberinto". Universidad del Zulia. Facultad de Agronomía. Maracaibo-Venezuela, 1989.
30. Raimbault, M., y Alazard, D. Culture method to study fungal growth in solid fermentation. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 9: 199-209, 1980.
31. Rathbun, B. L. y Shuler, M. L. Heat and mass transfer effects in static solid-substrate fermentation: design of fermentation chambers. *Biochemistry Journal*, 127: 32-33, 1972.

32. Reid, I. D. Solid-state fermentations for biological delignification. *Enzyme Microbial Technology*, 11: 786-803, 1989.
33. Singh, A., Abibi, A. B., Darmwal, N. S. y Agrawal, A. K., Evaluation of chemical pre-treatment for biodegradation of agriculture lignocellulosic wastes by *Aspergillus niger*. *Mircen Journal*, 4: 473-479, 1988.
34. Smith, M. E., Neild, J. D., Hall, F. J. Pasture presentation. Proceedings Ruakura Farmers Conference. Hamilton, New Zealand, MAF.117 (Herbage Abstract, 53: 2548), 1983
35. Tengerdy, R. Solid Substrate fermentation. *Trends in Biotechnology*, 3: 96-99, 1987.
36. Timm, D. H. y Del Villar, A. Labores reai-zadas por el proyecto forrajero del plan MAC-GOBERNACION-LUZ. 1^{as} Jornadas Venezolanas sobre utilización intensiva de forrajes: CIDEZ- Maracaibo, Venezuela: 52-66, 1977
37. Ventura., M. La conservación del forraje en el trópico. Técnicas modernas de producción animal en el trópico. Simposio EXPOICA 80. Tegucigalpa, Honduras, 12-13 Mayo, 1980.
38. Waldo, D. R. Effect of forage quality on intake and forage-concentrate interactions. *Journal of Dairy Science*, 69: 617-631, 1986.
39. Zambrano, C., y Del Villar, A. La conservación de forraje en el estado Zulia. Universidad del Zulia, Facultad de Agronomía. Extensión Agrícola. Maracaibo-Venezuela, 1985
40. Zapata, A. O. Fuentes de alimentación para ganado de leche. *Revista ICA-Informa*, 14: 1-3, 1980.