

1995-C

089017882

# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

---

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
Y AGROPECUARIAS  
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES



EVALUACIÓN DE LAS VINAZAS TEQUILERAS COMO  
SUSTRATO PARA EL CULTIVO EN ESTADO SÓLIDO Y  
LÍQUIDO DE HONGOS FILAMENTOSOS

---

**TESIS PROFESIONAL**  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
LICENCIADO EN BIOLOGÍA  
P R E S E N T A :  
JAIME ALBERTO MADRIGAL PULIDO  
ZAPOCAN, JALISCO. JULIO DEL 2000

---



# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

COORDINACIÓN DE CARRERA DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

COMITÉ DE TITULACIÓN

**C. JAIME ALBERTO MADRIGAL PULIDO  
P R E S E N T E .**

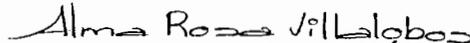
Manifestamos a Usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de TESIS con el título "EVALUACIÓN DE LAS VINAZAS TEQUILERAS COMO SUSTRATO PARA EL CULTIVO EN ESTADO SÓLIDO Y LÍQUIDO DE HONGOS FILAMENTOSOS", para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicho trabajo al M.C. ARMANDO ARIAS GARCÍA, y como asesor al BIOL. SERGIO FAUSTO GUERRA.

**A T E N T A M E N T E  
" PIENSA Y TRABAJA "**

Las Agujas, Zapopan, Jalisco, 12 de abril del 2000

  
**DRA. MÓNICA ELIZABETH RIOJAS LÓPEZ  
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**

  
**DRA. ALMA ROSA VILLALOBOS ARÁMBULA  
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**

c.c.p. M.C. ARMANDO ARIAS GARCÍA.- Director del Trabajo.  
c.c.p. BIOL. SERGIO FAUSTO GUERRA.- Asesor del Trabajo.  
c.c.p. Expediente del alumno

MERL/ARVA/mam\*

DRA. MONICA ELIZABETH RIOJAS LOPEZ  
PRESIDENTE DEL COMITE DE TITULACION  
LA DIVISION DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y AMBIENTALES  
LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA  
PRESENTE.

Por medio de la presente, nos permitimos informar a Usted, que habiendo revisado el trabajo de tesis que realizó el (la)  
Sr. C. JAIME ALBERTO MADRIGAL PULIDO con el título :  
EVALUACION DE VINAZAS TEQUILERAS COMO SUSTRATO PARA EL CULTIVO EN ESTADO SOLIDO Y  
LIQUIDO DE HONGOS FILAMENTOSOS

deramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorización de  
sión y en su caso programación de fecha de exámenes de tesis y profesional respectivos.

Sin otro particular, agradecemos de antemano la atención que se sirva brindar a la presente y aprovechamos la ocasión para  
rte un cordial saludo.

ATENTAMENTE,  
Las Agujas, Zapopan, Jal., a 14 de Julio de 2000 .

EL DIRECTOR DE TESIS

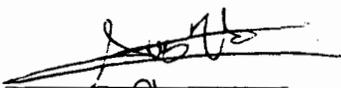
  
M. en C. ARMANDO ARIAS GARCIA  
NOMBRE Y FIRMA

EL ASESOR

  
BIOL. SERGIO FAUSTO GUERRA  
NOMBRE Y FIRMA

MODALES

M. en C. LUIS VILLASEÑOR IBARRA  
NOMBRE COMPLETO

  
FIRMA

M. en C. OLIVIA RODRIGUEZ ALCANTAR  
NOMBRE COMPLETO

  
FIRMA

M. en C. RAMON RODRIGUEZ MACIAS  
NOMBRE COMPLETO

  
FIRMA

## **DEDICATORIA**

**Esta tesis esta dedicada a mis padres:**

**Hermelinda Pulido Gómez**

**Rogelio Madrigal Barajas**

**y a mis hermanos:**

**Patricia Madrigal Pulido**

**Margarita Madrigal Pulido**

**Leticia Madrigal Pulido**

**José Ignacio Madrigal Pulido**

**Gustavo Madrigal Pulido**

**Oscar Madrigal Pulido**

**Guillermo Madrigal Pulido**

**Gracias por todo su apoyo y comprensión.**

## **AGRADECIMIENTOS**

**A la M. en C Laura Guzmán Dávalos y la Dr. Mónica E. Riojas López por sus consejos y puntos de vista que han sido de gran importancia a lo largo de mi formación académica.**

**A mi director de tesis el M. en C. Armando Arias García por su paciencia y por compartir conmigo su conocimiento.**

**A mi asesor Sergio Fausto Guerra.**

**A las del club de Lulú: Gabriela Romo, Mónica Pichardo, Blanca Flores, Erika Plasencia y Angeles Esquibel, por su amistad y los momentos agradables.**

**A mis compañeros de la generación 95-99**

**A Teresa Cuevas Arias**

**A Olga Avalos García por la importancia que ha tenido su amistad en mi vida, Gracias.**

**EVALUACION DE LAS VINAZAS TEQUILERAS COMO SUSTRATO  
PARA EL CULTIVO EN ESTADO SÓLIDO Y LIQUIDO DE HONGOS  
FILAMENTOSOS.**

## INDICE

### RESUMEN

1. INTRODUCCION	1
2. ANTECEDENTES	
2.1. Proceso de elaboración del tequila	3
2.2. Residuos generados en la producción de tequila	7
2.2.1. Mielés amargas	
2.2.2. Bagazo	
2.2.3. Vinazas tequileras	
2.2.4. Utilización de las vinazas tequileras	
2.3. Generalidades e importancia de los hongos	11
2.3.1. Fisiología y valor nutricional de los hongos	
3. HIPOTESIS	15
4. OBJETIVOS	16
5. MATERIAL Y METODOS	17
5.1. Medios de cultivo	
5.1.1. Medio sólido	
5.1.2. Medio líquido	
5.2. Condiciones de cultivo en estado sólido	
5.3. Condiciones de cultivo en estado líquido	
5.4. Consumo de azúcar	
5.4.1. Curva patrón de azúcar	
5.5. Análisis de resultados	
6. RESULTADOS Y DISCUSION	21
6.1. Cultivo en estado sólido	
6.2. Cultivo en estado líquido	
7. CONCLUSIONES	35
8. RECOMENDACIONES	36
9. LITERATURA CITADA	37
10. ANEXOS	42

## RESUMEN

Se elaboraron medios de cultivo con vinazas tequileras para evaluar el crecimiento de diversos hongos filamentosos en estado sólido y líquido. El medio en estado sólido se preparó con una concentración de 10% a 50% de vinazas tequileras y se utilizaron 14 cepas de hongos filamentosos. Se obtuvo crecimiento en todas los medios de cultivo en las diferentes concentraciones de vinazas tequileras, excepto en la mas alta que fue del 50%. La mayor velocidad de crecimiento se obtuvo con la cepa P1 en PDA, 10% y 20% de vinazas tequileras con 8.7 cm, 8.7 cm y 8.6 cm, la C1 con 8.5 cm en 10% de vinazas y la 121 produjo un crecimiento de 8.5 cm y 8.4 cm en 10% de vinazas y PDA. La mayor producción de biomasa fue de 30.1 mg/caja en PDA, seguida por el medio con 20% de vinazas tequileras con 22.6 mg/caja. En 10%, 30% y 40% se obtuvieron 14.5 mg/caja, 12.7 mg/caja y 4.2 mg/caja, respectivamente y en 50% no se presento crecimiento. La mejor cepa fue la P1 con un diámetro de 8.7 cm y una producción de biomasa de 22.0 mg/caja.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el medio sólido se preparó un medio líquido con 20% de vinazas tequileras, se elevo el pH de 4 a 5 y se agitó (0 y 100 rpm) para evaluar el crecimiento de las cepas P1 y C1. La mayor producción de biomasa se presento en la cepa P1 con 362.8 mg/matraz en un pH de 5 y 100 rpm mientras que para la cepa C1 se obtuvo una mayor producción de biomasa con 313.1 mg/matraz a un pH de 5 y una agitación de 0 rpm. Se observó que la cepa C1 produjo una decoloración del medio líquido elaborado con las vinazas tequileras y una agitación de 100 rpm.

Las vinazas tequileras a una concentración de 20% resultaron ser un buen medio de cultivo para el crecimiento de los hongos filamentosos obteniéndose hasta 30.1 mg/caja.

## 1 INTRODUCCIÓN

El tequila es una bebida asociada tradicionalmente con México y más particularmente con el estado de Jalisco. Esta es una bebida que su materia prima es el *Agave tequilana* Weber, var. *azul* el cual tarda más de 7 años en madurar y es producida en un territorio protegido por la denominación de origen que comprende el estado de Jalisco y algunos municipios de los estados de Michoacán, Guanajuato y Nayarit (SECOFI, 1994).

El auge de la industria tequilera va en aumento, y el crecimiento de la producción de tequila se ha elevado hasta alcanzar 190.6 millones de litros en 1999 (Cámara Regional de Industria Tequilera, 1999).

En el proceso de producción del tequila son generados residuos que se convierten en un problema para los productores así como para el medio ambiente. El tratar de controlar o eliminar los residuos obtenidos genera gastos extras a los productores, que en la mayoría de los casos no cumplen con los requerimientos de las normas oficiales en el control de la generación de contaminantes, ya que no cuentan con los métodos necesarios que resuelvan estos problemas.

Uno de estos desechos, las vinazas tequileras, son generados durante la destilación del tequila y por lo general son arrojadas en grandes cantidades a los afluentes de los ríos sin ningún tipo de tratamiento. Debido a sus características físicas y químicas constituyen un contaminante ambiental; no obstante, son ricas en nutrimentos y pueden ser aprovechadas en distintas formas evitando que se desperdicien, además de disminuir los problemas de contaminación en los lugares en donde son arrojados.

El aprovechamiento de las vinazas tequileras ha sido poco estudiado, debido a los inconvenientes en los métodos para darles uso, ya que económicamente resultan ser poco prácticos para su utilización.

El presente trabajo pretende utilizar las vinazas tequileras como fuente de nutrimentos para elaborar medios de cultivo en estado sólido y líquido que permita el crecimiento de hongos filamentosos. Asimismo es interesante identificar las condiciones para obtener un mayor crecimiento del micelio en los medios de cultivo elaborados con vinazas tequileras y seleccionar la mejor cepa para disminuir la contaminación generada por las vinazas de las industrias tequileras

## 2 ANTECEDENTES

### 2.1 Proceso de producción del tequila

El tequila es una bebida alcohólica tradicional en México que se obtiene de la destilación del jugo fermentado del agave (*Agave tequilana* Weber var. *azul*) a diferencia de otras bebidas nacionales. Así se tiene que para la elaboración del mezcal en Oaxaca se utiliza *Agave potatorum* Zooc, para el pulque se obtienen los azúcares de *A. atrovirens* Karw. ex Salm y *A. salmiana* Otto. ex Salm. En los últimos 30 años el tequila ha pasado de ser una bebida regional a una bebida de aceptación nacional y es una de las bebidas con mayor reconocimiento y crecimiento en los mercados de exportación, principalmente en Estados Unidos y Europa.

La producción de tequila ha tenido un vertiginoso aumento en los últimos 10 años, pasando de 78.5 millones de litros en 1989 a 190.6 millones de litros en 1999. Del volumen de tequila producido en 1999, se exportaron 97.3 millones de litros y para consumo nacional fueron 93.3 millones de litros (Figura 1) (Cámara Regional de Industria Tequilera, 1999).

Los tipos de tequila que se producen son: el blanco, el cual se envasa al final del proceso de destilación sin agregarle otra sustancia. El dorado, que es el tequila blanco con un compuesto color caramelo para obtener esa tonalidad. El reposado y añejo. en este caso el tequila blanco es mantenido en contenedores de madera, preferentemente de roble, por un espacio de 2 meses, en el caso del reposado y 12 meses para el añejo.

El proceso de elaboración de tequila consiste de cuatro principales pasos que son el cocimiento, el molido, la fermentación y la destilación.

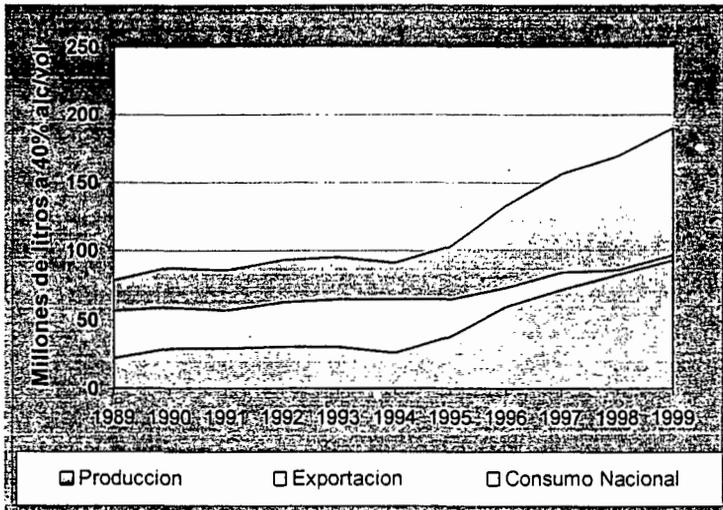


Figura 1. Exportación y consumo nacional de la producción de tequila de 1989 a 1999.

### Cocimiento de las cabezas de agave

Las cabezas del agave son transportadas del campo hacia la fábrica, en donde se da comienzo al proceso de producción del tequila. Las cabezas de agave con pesos de entre 20 y 60 kg son cortadas reduciendo su tamaño, con el fin de optimizar el proceso de cocido, además de facilitar su transporte. Las piezas obtenidas al cortar las cabezas son introducidas en hornos o autoclaves para su cocimiento.

El cocimiento del agave cumple tres propósitos: lograr en la inulina y otros componentes de la planta un efecto de hidrólisis a azúcares libres, principalmente fructosa, por medio de la alta temperatura y de un pH bajo. La caramelización de algunos azúcares, así como de compuestos presentes que contribuyen de manera significativa al sabor y olor final del tequila.

El cocimiento del agave se lleva a cabo de dos maneras: una rústica, en hornos contruidos con ladrillos, en los cuales es inyectado vapor durante 36 h hasta alcanzar una temperatura de 100° C. Al termino de este periodo el agave es dejado en el horno 2 días más para completar su cocimiento.

Otra manera es el uso de autoclaves de acero que tienen una eficiencia de cocimiento superior los hornos de ladrillo. En la autoclave se coloca el agave y se inyecta vapor condensado durante una hora para lavarlo. El líquido resultante es conocido como "mieles amargas" que es retirado de la autoclave. Después se inyecta vapor durante 6 h para obtener una presión de 1.2 kg/cm<sup>2</sup> y una temperatura de 121° C. Finalmente el agave es mantenido en la autoclave durante una hora más para completar su cocimiento. En ambos procedimientos de cocción es obtenido un jarabe el cual posteriormente se mezcla con el jugo obtenido en el molido.

### **Molido de las cabezas de agave**

Después del cocimiento, el agave se lleva a molinos parecidos a los utilizados en la industria cañera, pero de menor tamaño, en donde se muele para la extracción del jugo. El jugo obtenido es mezclado con el jarabe colectado durante el cocimiento así como con otros azúcares (entre ellos los de caña) en un porcentaje que no excede el 49%, de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana en materia de bebidas alcohólicas (SECOFI, 1994). Con el proceso de molido se produce un subproducto llamado bagazo, que representa cerca del 40% del peso del agave (Cedeño, 1995).

### **Fermentación**

Después de formular la correcta mezcla de jugo de agave con los otros componentes, este se mantiene a una temperatura de 30 °C y es inoculado con una cepa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* a un volumen del 5% al 10%. La producción de

alcohol etílico así como otros compuestos organolépticos o sus precursores, que contribuyen al sabor y olor final del tequila, se forman durante la etapa de fermentación. El proceso de fermentación puede durar 20 h (proceso rápido) hasta tres días (proceso lento). La formación de los componentes organolépticos es mayor en una fermentación lenta, como consecuencia el sabor y en general la calidad del tequila obtenido es superior.

### **Destilación del mosto fermentado**

El proceso de destilación comprende la separación y concentración del alcohol del mosto fermentado. Los métodos más comunes de destilación utilizados en la industria tequilera son las ollas de destilación y columnas de rectificación.

La olla de destilación es considerada como la forma más antigua de destilación utilizada. Consistente en una caldera que contiene el mosto fermentado, un espiral y un condensador o placa para el intercambio de calor. La destilación en ollas se lleva a cabo en dos pasos. En el primero, el mosto fermentado es destilado para incrementar la cantidad de alcohol presente en un 20% a 30 %, la primera fracción es separada y es conocida como “cabeza” la cual es rica en componentes que le dan muy buen sabor y olor al tequila, por lo que son mezcladas con el mosto destilado. La segunda fracción separada en la destilación es conocida como “cola”, esta le proporciona un fuerte sabor y olor al tequila. Cuando la concentración de la segunda fracción se encuentra por encima de 0.5 mg/ml se vuelve desagradable y es desechada.

En un segundo paso el líquido obtenido es destilado de nuevo, con el fin de obtener un producto final de 110° de alcohol si es vendido en bruto, reduciendo los gastos de transporte y de 80° de alcohol si es para envasar.

En el sistema de columna de rectificación, el mosto fermentado entra a la placa de alimentación y el líquido fluye por las diferentes bandejas de la columna, al inyectarse vapor en la columna se desprenden componentes volátiles del mosto. De acuerdo

a la volatilidad de los componentes, estos se condensan en la parte alta de la columna, entrando en bandejas en donde los líquidos pueden ser tomados o reciclados. Algunas veces el tequila obtenido de esta forma es mezclado con el de las ollas de destilación, ya que pierde los componentes que le dan sabor y aroma logrados en las ollas de destilación (Cedeño, 1995).

## **2.2 Residuos generados en la producción de tequila**

En cada una de las etapas del proceso de producción de tequila se generan residuos, que en la mayoría de los casos son un problema para los productores que no cuentan con métodos para su reutilización. Además, contaminan el medio ambiente, debido al volumen en que son vertidos y por sus características físicas y químicas. Estos residuos generados son las mieles amargas, el bagazo de maguey tequilero y las vinazas tequileras.

### **2.2.1 Mieles amargas**

En el cocimiento de las cabezas del agave, el líquido con el que se lava la superficie del agave y que es desechado, es conocido como "mieles amargas". No existen trabajos realizados con el fin de determinar la composición química de las mieles amargas, pero se estima que se componen por ceras, grasas, sales y pequeñas cantidades de azúcar. Estas han sido utilizadas como medio de cultivo en el crecimiento de hongos comestibles del género *Pleurotus* y *Lentinus* (Arias y Fausto, 1999).

### **2.2.2 Bagazo de agave tequilero**

El bagazo de agave tequilero es obtenido después de moler las cabezas del agave y representa cerca del 40% del peso total del agave molido. Está compuesto de celulosa, hemicelulosa, lignina, nitrógeno, pectinas y azúcares residuales (Cedeño, 1995),

por lo que ha sido utilizado en el cultivo de hongos comestibles (Guzmán-Dávalos *et al.*, 1987, Soto *et al.*, 1991), así como en la alimentación de ganado, fabricación de muebles o elaboración de ladrillos.

### 2.2.3 Vinazas tequileras

Las vinazas tequileras son el residuo obtenido después de destilar el mosto del agave fermentado. Están compuestas por fibrillas de agave, células de levadura agotadas, ácidos, esterres, alcoholes superiores y sustancias que dan color caramelo (Linerio *et al.*, 1999a). Son consideradas un producto contaminante debido a que son arrojadas a temperaturas cercanas a los 90°C, un pH menor a 4.0, y una elevada demanda bioquímica de oxígeno (DBO) en el agua de 40 g/l. Sin embargo, se ha encontrado en las vinazas tequileras un alto contenido de cenizas compuestas por fósforo, nitrógeno, potasio, calcio, magnesio y azúcares residuales, lo que las convierte en una fuente de nutrientes (Tabla 1) (Sánchez, 1991).

Se estima que por cada litro de tequila se generan de 10 a 15 litros de vinazas tequileras. De acuerdo a la producción de tequila durante 1999 que fue de 190.6 millones de litros, se estima una producción de 1906 a 2859 millones de litros de vinazas tequileras, las que en su mayoría fueron vertidas, principalmente, en arroyos, ríos y drenaje municipal.

Linerio *et al.*, (1999b) registraron el manejo de los desechos contaminantes generados en 18 de las 52 empresas tequileras existentes en el estado de Jalisco. De las 18 compañías estudiadas el 61% de ellas realizan algún tratamiento en las vinazas para su descarga final que es en el drenaje, arroyos y ríos y solamente un 29% lo utiliza para regar campos de cultivo para maíz y agave.

Tabla 1. Composición química de las vinazas tequileras

Compuesto	(g/l)
Sólidos totales	44-106
Nitrógeno	0.6-1.0
Azúcares totales	9-18
Azúcares reductores	2.0-10
Cenizas	14-28
CaO	0.5 - 0.8
MgO	2.0 - 4
K <sub>2</sub> O	6.4 - 7
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	1.4 - 3.2

Las empresas tequileras vierten las vinazas a una temperatura de 90°C, un pH de 4 y una cantidad de sólidos sedimentables de 44000 a 106000 mg/l y no cumplen con la norma oficial para la protección al ambiente en donde se requiere que la temperatura a la que deben ser arrojados los residuos es de 35°C, un pH de 6 a 9 y los sólidos sedimentables no deben de ser mayores a 1000 mg/l (Tabla 2) (Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente, 1999). Debido a lo anterior son multados económicamente y por norma se les exige la construcción de infraestructura adecuada para el tratamiento de los residuos antes de verterlos.

#### 2.2.4 Utilización de las vinazas tequileras

Algunas propuestas de utilización de las vinazas tequileras son: el reciclar y con ello se reduce el volumen de desecho a ser tratado, la aplicación directa en la tierra como irrigación y fertilizante, una evaporación o combustión que puede proveer de fertilizante y potasio, la producción de forraje de levadura, la obtención de un suplemento alimenticio para el ganado, y la disposición de nutrimentos que ofrecen las vinazas por medio de tratamientos biológicos, aeróbicos o anaerobios (Cedeño, 1995).

Tabla 2. Características fisicoquímicas de las vinazas tequileras en comparación con las permitidas por la ley general de equilibrio ecológico y protección al ambiente.

Factor	Máximo permitido	Vinazas tequileras
Temperatura	35°C	90°C
pH	6-9	4
Solidos sedimentables (mg/l)	1000	44000-106000

### Reciclamiento

Las vinazas tequileras, resultantes de la destilación del jugo de agave fermentado se les puede dar una recirculación al mezclar eficientemente hasta un 20% del volumen del desecho final obtenido, con el fin de sustituir la dilución de agua utilizada para preparar el mosto (Caicedo *et al.*, 1997). Así mismo Sánchez *et al.*, (1999) han propuesto el aprovechamiento de la alta temperatura con la que las vinazas son desechadas, por medio de intercambiadores de calor, reduciendo así la cantidad de vapor necesario en la columna de destilación.

### Aplicación en suelos agrícolas

Las vinazas de la caña de azúcar se han utilizado como agua de riego en suelos para el cultivo de la caña azúcar, con el fin de establecer las condiciones óptimas de pH y potasio y con ello se obtenga un buen crecimiento y una mayor producción (Sheehan y Greenfiel, 1980). Además se han utilizado para regar campos de arroz, con un aumento significativo de la producción de semilla (Chandler *et al.*, 1984).

Las vinazas tequileras son aplicadas directamente como irrigación y fertilizante en los suelos con cultivos de agave y maíz (Linerio *et al.*, 1999b). Pascoe *et al.*, 1999 mezclaron sólidos de las vinazas con bagazo para la siembra de especies de pino y crasuláceas, obteniendo un crecimiento comparable al de los substratos comerciales).

## **Incineración**

La evaporación o combustión de las vinazas tequileras es un método que se utiliza con el fin de recuperar el contenido de minerales y son utilizadas como fuente de fertilizante y potasio de un costo menor al producido comercialmente (Maiorella *et al.*, 1983).

## **Tratamientos biológicos**

Algunos de los tratamientos biológicos con posibilidad de utilizar las vinazas tequileras son la producción de biomasa y productos bioquímicos así como forraje de levadura debido al alto contenido de nutrimentos y minerales presentes en las vinazas (Sheehan y Greenfield, 1980). Una mezcla de vinazas tequileras con el alimento que se utiliza regularmente en los cerdos, resultó con un aumento significativo en la producción de proteína animal (Hernández *et al.*, 1999b). Se ha propuesto la utilización de vinazas tequileras como fuente de nutrimentos para bacterias y hongos en la obtención de proteína celular, por medio de tratamientos biológicos aeróbicos o anaerobios (Eder, 1976; Cedeño, 1995; Covarrubias *et al.*, 1997).

### **2.3 Generalidades e importancia de los hongos**

Los hongos son organismos macroscópicos y microscópicos que viven sobre diferentes materiales orgánicos y poseen células con verdaderos núcleos. En su mayoría son filamentosos, a estos filamentos se le conocen como hifas, que se encuentran rodeadas por una pared de quitina. Las hifas presentan crecimiento apical y se ramifican periódicamente para formar el micelio. Carecen de clorofila, por lo que son heterótrofos, es decir, se alimentan de forma extracelular al digerir materia orgánica por medio de enzimas, para posteriormente absorber los nutrimentos. Se reproducen de manera sexual como

asexualmente, pero en cualquiera de los casos, el producto final es la formación de esporas (Alexopoulos, 1976; Deacon, 1988).

Los hongos cumplen una importante función en el equilibrio ecológico de la naturaleza al descomponer y transformar la materia orgánica en sustancias más sencillas. Se ha registrado que la actividad enzimática de los hongos es de gran utilidad en la obtención de etanol y ácido acético (Singh, *et al.*, 1992; Christakopoulos, *et al.*, 1990); en la producción de biogas (Bisaria, *et al.*, 1990) y la producción de proteína celular y ácido xilónico (Biswas, *et al.*, 1989).

En problemas de contaminación los hongos son utilizados en la degradación de compuestos químicos contaminantes, como el DDT (1,1,1, trichloro-2-2-bis clorofenil etano) (Bumpus y Aust, 1987), el pentacloronitrobenzeno (Lievremont *et al.*, 1996) y la Selenita ( $\text{SeO}_3^{2-}$ ) (Brady, *et al.*, 1996), a los cuales modifican convirtiéndolos en sustancias que no dañan el medio natural. Así mismo se han utilizados para la absorción y solubilización de metales pesados contaminantes del suelo como el Zn, Cd, Mg, Co, Al, los cuales toman y modifican al incluirlos en su metabolismo (Morley y Geoffrey, 1995; Sayer, *et al.*, 1995; Gharieb *et al.*, 1999).

Wainwright (1992) registró que algunas cepas de *Aspergillus* y *Chaetomium* son utilizados en los efluentes de fabricas de curtidos de piel, ya que producen enzimas que degradan los taninos y con esto es posible controlar la contaminación. Asimismo en la industria azucarera se desechan las melazas con meladanoidida, compuesto responsable del color y contaminación y se detectó que el hongo *Coriolus* descompone este compuesto logrando la decoloración de las melazas.

### 2.3.1 Fisiología y valor nutricional de los hongos

La mayoría de los hongos son mesófilos con una temperatura óptima entre 25 y 35° C. El pH en el que se desarrollan es amplio y varía de 5.5 a 7.5. esto es debido a

que es alterado en el medio por la absorción selectiva de nutrientes, la producción de CO<sub>2</sub> y NH<sub>3</sub> y/o mediante la producción de ácidos orgánicos. Requieren grandes cantidades de oxígeno, así como pequeñas cantidades de CO<sub>2</sub> para las reacciones de carboxilación. Para su desarrollo requieren de al menos un 70% de agua. La cantidad de luz en el crecimiento vegetativo de los hongos tiene pocos efectos, aunque si los puede tener en la esporulación (Deacon, 1988).

Los hongos son afectados en su crecimiento por la cantidad de nitrógeno y carbono disponibles, entre otras cosas, para la formación de enzimas, que son utilizadas en la degradación de compuestos químicos como la celulosa (Masaphy y Levanon, 1992); así como para la producción de exopolisacáridos, que le permiten al hongo adherirse al sustrato, prevenir la deshidratación y almacenar el exceso de nutrientes (Burns *et al.*, 1994).

En general los hongos presentan un alto contenido de proteína, aminoácidos esenciales, baja cantidad de grasas y fibras. En estudios sobre la composición química del hongo comestible *Agaricus bisporus*, se encontró que contiene un 26.3% de proteína cruda, 1.8% de grasa, 59.9% de carbohidratos totales, 10.4% de fibra, 12.0% de ceniza y un valor energético de 328 Kcal/g (Chang y Hayes, 1978).

Del crecimiento de micelio de una cepa de *Fusarium graminearum* sobre un sustrato de trigo con almidón se ha logrado obtener un producto altamente nutritivo conocido como Quorm®, con un contenido de proteína de 2-12%, fibra dietética 1-5%, grasa total 2-9%, grasa saturada 0-4%, ácidos grasos polisaturados 2-5% y carbohidratos 1-3% (Trinci, 1992).

La proteína contenida en los hongos es menor que la que se encuentra en la carne (9-30%) pero la cantidad de grasa total (11%) y grasa saturada (4-6%) es mayor, además de que presenta colesterol (0.08%) (Trinci, 1992).

### 3 HIPOTESIS

Los hongos filamentosos crecen en medios de cultivo en estado sólido y líquido elaborados con vinazas tequileras.

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

#### **4 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar las vinazas tequileras como un medio de cultivo en estado sólido y líquido para el crecimiento micelial de hongos filamentosos.

##### **Objetivos particulares:**

- 1) Evaluar el crecimiento de hongos filamentosos sobre medios de cultivo elaborados con vinazas tequileras en diferentes condiciones físicas y químicas.
- 2) Determinar las condiciones óptimas para el crecimiento de hongos filamentosos en medios de cultivo con vinazas tequileras en estado sólido y líquido.
- 3) Identificar las cepas de hongos filamentosos con mayor crecimiento en medios de cultivo elaborados con vinazas tequileras.

## 5 MATERIALES Y METODOS

Las cepas de hongos filamentosos utilizadas se encuentran depositadas en el Laboratorio de Biotecnología del Departamento de Botánica y Zoología del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara, en tubos inclinados con agar extracto de malta (EMA) a 4° C (Tabla 3).

Tabla 3. Cepas de hongos utilizadas

Cepa	Especie
C1	<i>Coriolus versicolor</i>
L5	<i>Lentinula</i> sp.
L18	<i>Lentinula edodes</i>
P1	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
9	<i>Fusarium</i> sp.
27	<i>Gymnopilus</i> sp.
29	Hongo 1
30	Hongo 2
41	Hongo 3
76	<i>Gymnopilus</i> sp.
121	<i>Aspergillus</i> sp.
7x8	<i>Pleurotus ostreatus</i>
8x3	<i>Pleurotus ostreatus</i>
50c	<i>Fusarium</i> sp.

### 5.1 Medios de cultivo:

Para la elaboración de los medios de cultivo se utilizaron vinazas tequileras que se obtuvieron de la empresa Tequilas del señor S. A. de C. V. ubicada en Tlaquepaque, Jal.

### 5.1.1 Medio sólido:

El medio de cultivo sólido se elaboró en matraces de 500 ml al mezclar 20 g de agar por litro de vinazas a una concentración de 10, 20, 30, 40 y 50 % diluidas con agua. Como testigo se utilizó el medio de cultivo comercial Papa Dextroxa con Agar (PDA) siguiendo las instrucciones del fabricante. El medio de cultivo en los matraces se esterilizó a 121 °C durante 15 min y ya frío se vaciaron 20 ml en cajas de petri.

### 5.1.2 Medio líquido:

El medio de cultivo líquido se preparó al colocar 50 ml de vinazas tequileras, a una concentración del 20%, diluidas con agua destilada en matraces de 125 ml, los que se esterizaron en autoclave a 121 °C durante 15 min.

## 5.2 Condiciones de cultivo en estado sólido

La inoculación se realizó a partir del crecimiento de las cepas del banco genético de hongos filamentosos, con puntas de micropipetas esterilizadas de un diámetro de 7 mm. El fragmento de medio con micelio se tomó con una aguja de disección y se colocó en el centro de las cajas de petri con los medios sólidos elaborados con vinazas tequileras. La incubación se realizó durante 7 días a una temperatura de 28° C, con revisiones cada 24 h.

La velocidad de crecimiento se determinó en el medio sólido tomando en cuenta el diámetro del cultivo en mm/día (Arias y Fausto, 1999). La producción de biomasa en mg/caja se determinó después de 7 días de incubación por filtración y peso seco constante (Arias *et al.*, 1999).

### 5.3 Condiciones de cultivo en estado líquido

Para obtener un mayor crecimiento en el medio líquido, se evaluó la producción de biomasa de las cepas C1 y P1 en un medio de cultivo con 20% de vinazas tequileras.

La inoculación del medio líquido se llevó a cabo al homogeneizar el crecimiento del micelio de una caja de petri colonizada en 100 ml de agua destilada estéril durante 2 minutos a la máxima velocidad. Se tomaron 10 ml del homogeneizado para su siembra en matraces de 250 ml de capacidad con 90 ml de medio de cultivo. La incubación se realizó a 28° C y 100 rpm durante 10 días. La producción de biomasa se determinó por filtración y peso seco constante (mg/matraz).

### 5.4 Consumo de azúcar

Con el fin de determinar el consumo de azúcares de las cepas estudiadas en el medio líquido se determinó el contenido de azúcares reductores totales (Dubois *et al.*, 1956), antes y después de inocular e incubar el medio de cultivo líquido a 28°C durante 7 días. El consumo de azúcares se determinó con la siguiente fórmula:

$$\text{consumo de azúcares (g)} = \text{azúcares reductores inicial (g)} - \text{azúcares reductores final (g)}$$

Para la determinación de los azúcares reductores totales a 1 ml de las vinazas tequileras diluidas (20%) se adicionó 1 ml de fenol al 5%, enseguida se agregaron 5 ml de ácido sulfúrico concentrado con el pipeteador en forma brusca para conseguir el efecto de hidrólisis. Se dejó enfriar durante 5 minutos a temperatura ambiente, se agitó y enseguida se puso a baño de agua durante 10 minutos. Finalmente se determinó la absorbancia a 490 nm en el espectrofotómetro Milton Roy Spectronic 20D.

#### **5.4.1 Curva patrón del azúcar**

La curva patrón fue preparada con una soluciones a diferente concentración de 0.01 hasta 0.1 g/l de sacarosa. Se le adicionó 1 ml de agua destilada a cada una por duplicado y se determinó los azúcares reductores totales.

#### **5.5 Análisis de resultados**

Los datos experimentales fueron analizados estadísticamente mediante un análisis de varianza y la prueba de rango múltiple Duncan ( $P < 0.05$ ) en cada uno de los parámetros estudiados para establecer diferencias significativas existentes, mediante el paquete estadístico SAS.

## 6 RESULTADOS Y DISCUSION

En el presente estudio se utilizaron las vinazas tequileras como fuente de nutrimentos para el crecimiento de hongos filamentosos en estado sólido y líquido. En el medio sólido se observó el crecimiento y la producción de biomasa de 14 cepas de hongos en cinco concentraciones de vinazas tequileras diluidas con agua destilada. Se elaboró un medio líquido con una concentración de vinazas tequileras del 20%, y se evaluó el efecto del pH y la agitación sobre la producción de biomasa de dos cepas seleccionadas.

### 6.1 Cultivo en estado sólido

El crecimiento de las cepas de hongos utilizadas en el medio sólido se evaluó a partir del tercer día de la inoculación, periodo en el cual el crecimiento del micelio se presentó en todas las cajas de petri preparadas con las concentraciones de vinazas tequileras así como en PDA. Durante los 5 días siguientes del crecimiento de micelio se determinó cada 24 h. El crecimiento de las cepas fue el obtenido a 7 días de incubación, a excepción de las cepas P1 y 121 que cubrieron el medio de cultivo a los cuatro días de incubación. Sólo se obtuvo crecimiento en los medios con una concentración de 10 a 40% de vinazas y en 50% todas las cepas no presentaron crecimiento.

En la Figura 2 se muestra la cinética de crecimiento de las cepas en el medio PDA. Las cepas P1 y 121 presentaron la mayor velocidad de crecimiento con 2.17 cm/día y 2.12 cm/día. La 50c, C1 y 9 presentaron un crecimiento de 1.06, 0.94 y 0.91 cm/día respectivamente. La 7x8, 41, 29, 27, 76, 8x3, L5, L18 y 30 presentaron una velocidad de crecimiento menor de 0.54 cm/día.

La Figura 3 presenta las cinéticas de crecimiento de las cepas en el medio de cultivo elaborado con 10% de vinazas tequileras. Las cepas P1 y 121 mostraron la mayor velocidad de crecimiento con 2.17 y 2.12 cm/día respectivamente. Le siguió la C1 con una velocidad de crecimiento de 1.21 cm/día y las 41, 50c y 9 crecieron 0.73, 0.72 y 0.7 cm/día.

Las cepas más lentas fueron 7x8, 27, 76, 8x3, L5, L18, 30 y 29, con velocidades menores de 0.47 cm/día.

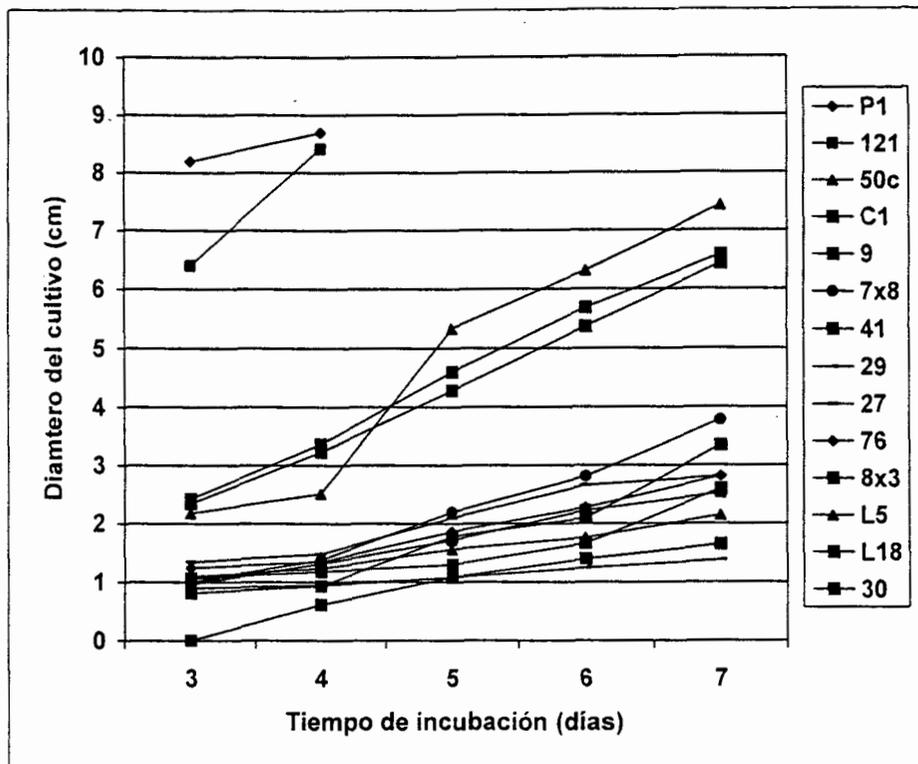


Figura 2. Cinética de crecimiento de las cepas de hongos filamentosos en el medio PDA.

En la Figura 4 se presenta la cinética de crecimiento de las cepas evaluadas en el medio con 20% de vinazas tequileras. La cepa P1 presentó la mayor velocidad de crecimiento con 2.17 cm/día, mientras que la 121 tuvo una velocidad de 1.72 cm/día. Por otro lado las cepas 50c, C1, 9, 41, 27 y 7x8 mostraron la menor velocidad de crecimiento desde 0.67 cm/día a 0.29 cm/día y las que no crecieron a esta concentración fueron 29, 30, 76, L5, L18 y 8x3.

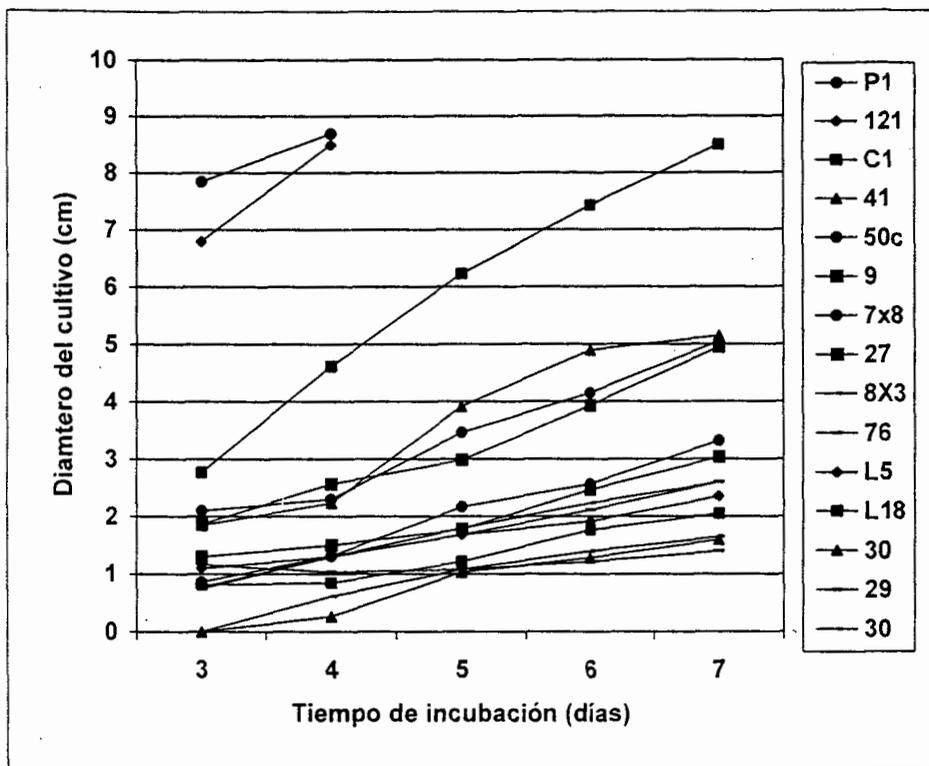


Figura 3. Cinética de crecimiento de las cepas de hongos filamentosos en medio sólido elaborado con 10% de vinazas tequileras.

La Figura 5 muestra la cinética de crecimiento en el medio con 30% de vinazas tequileras. Las cepas P1 y 121 tuvieron una mayor velocidad de crecimiento con 2.0 y 1.79 cm/día. Las cepas 50c, 9, C1, 7x8 y 27 presentaron una velocidad de crecimiento menor de 0.33 cm/día. La cepa 41 no presentó crecimiento a esta concentración de vinazas tequileras.

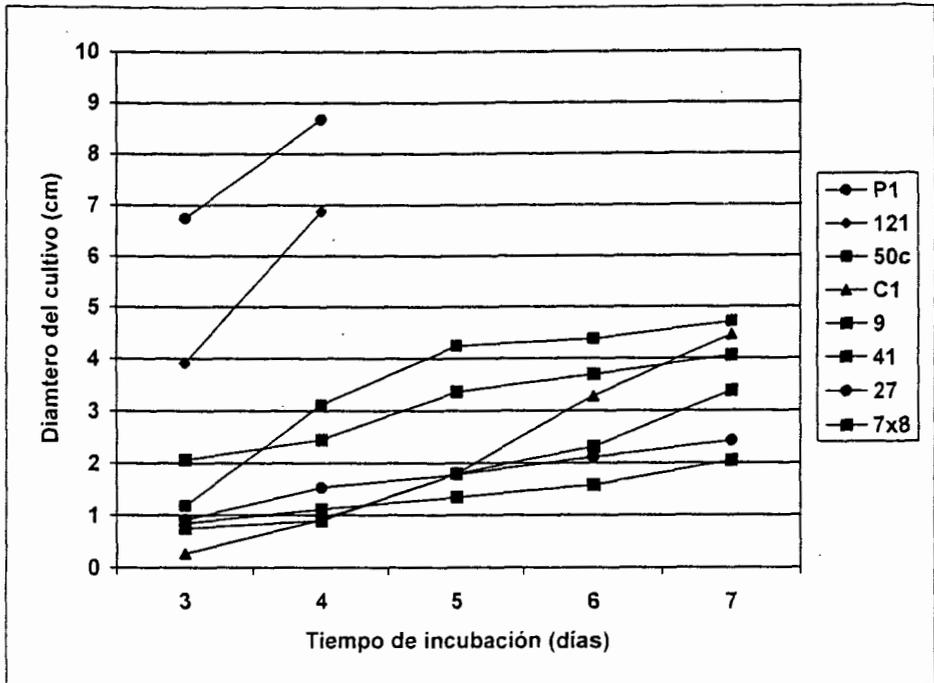


Figura 4. Cinética de crecimiento de las cepas de hongos filamentosos en medio de cultivo en estado sólido con 20% vinazas tequileras.

En la Figura 6 se muestra la cinética de crecimiento de las cepas en el medio con 40% de vinazas tequileras. La cepa P1 presentó una velocidad de crecimiento de 1.53 cm/día; mientras que la cepa 50c obtuvo 0.54 cm/día y la 7x8 0.34 cm/día y no se observó crecimiento en las cepas 9, 27, 121 y C1.

Seis de las 14 cepas de hongos filamentosos utilizadas en este experimento (29, 30, 76, L5, L18 y 8x3) obtuvieron crecimiento únicamente en 10% de vinazas tequileras y las cepas P1, 50c y 7x8 crecieron en todas las concentraciones, excepto 50%. La mayor velocidad de crecimiento se detectó en las cepas 121 y P1 las cuales colonizaron las cajas de petri en sólo cuatro días. Platt *et al.* (1981) mencionaron que las cepas de hongos presentan diferente velocidad de crecimiento en el medio porque cada cepa tiene sus requerimientos nutricionales.

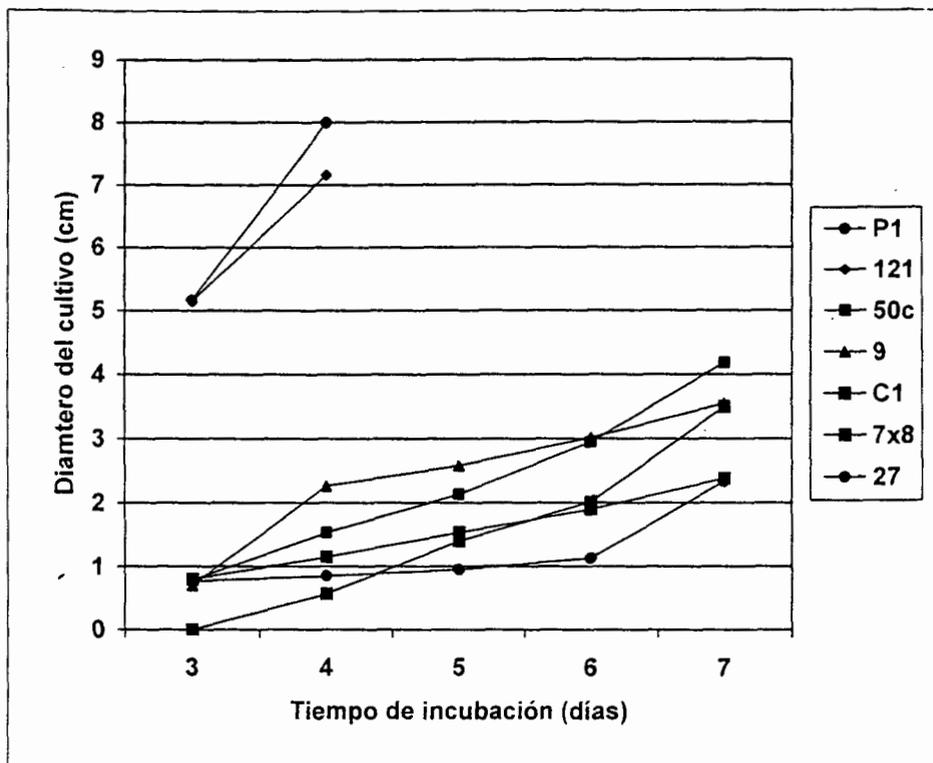


Figura 5. Cinética de crecimiento de cepas de hongos filamentosos en medio sólido elaborado con 30% de vinazas tequileras.

En la Tabla 4 se muestra el diámetro del cultivo de las cepas de hongos filamentosos en el medio sólido en diferentes concentraciones de vinazas tequileras y en PDA. El mayor crecimiento fue obtenido por la cepas P1 en PDA, 10% y 20% de vinazas, la cepa C1 a la concentración del 10% de vinazas y la cepa 121 en PDA y 10% de vinazas tequileras con un diámetro desde 8.7 a 8.4 cm (Cuadro 1). El menor crecimiento se presentó para las cepas 29 y 30 en el medio con 10% vinazas y el PDA con diámetros menores de 1.6 cm (Duncan  $P < 0.05$ ).

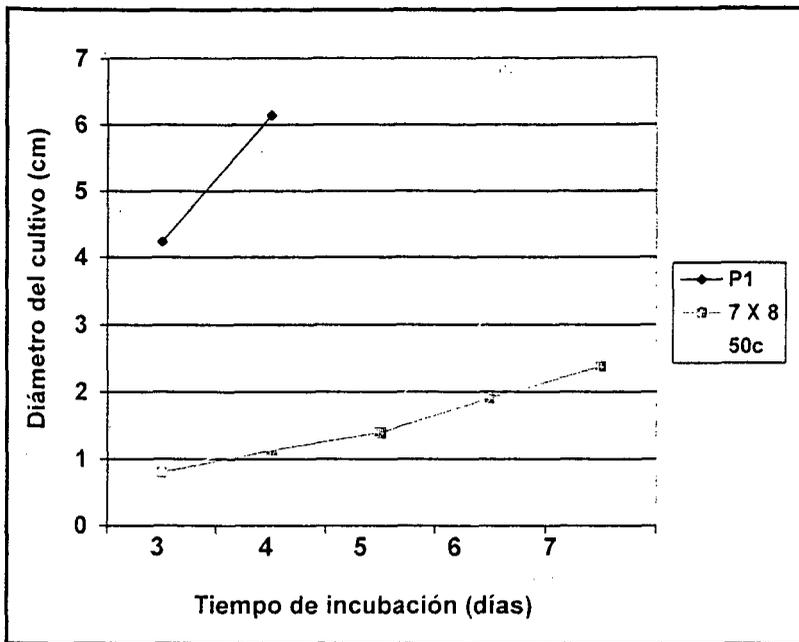


Figura 6. Cinética de crecimiento de las cepas de hongos filamentosos en medio sólido elaborado con 40% de vinazas tequileras



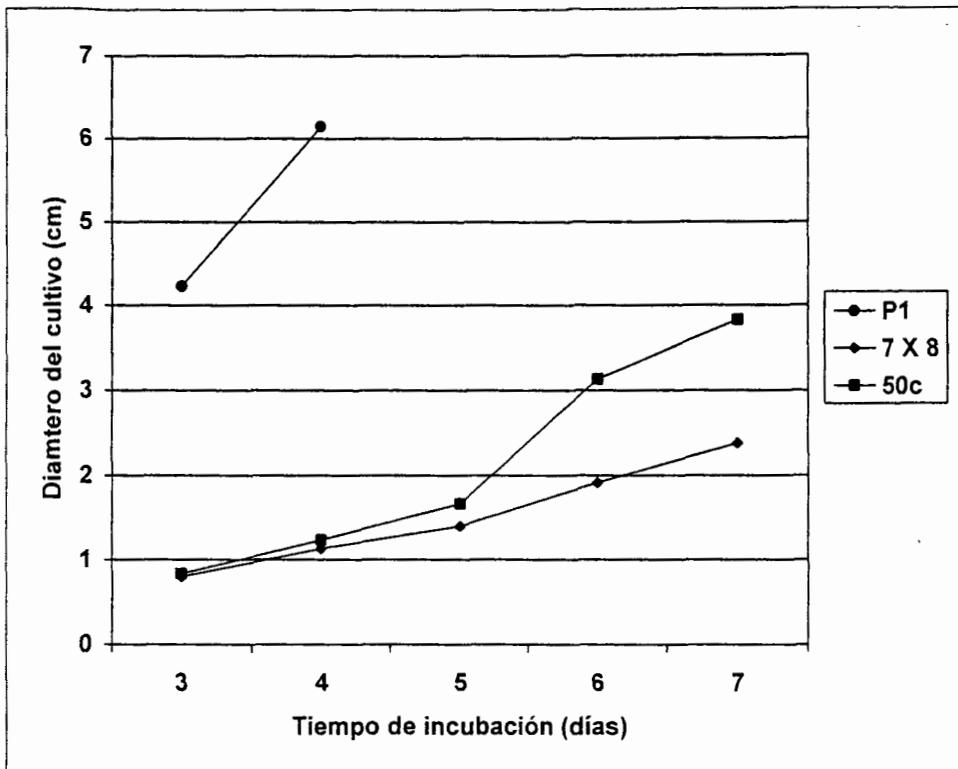


Figura 6. Cinética de crecimiento de las cepas de hongos filamentosos en medio sólido elaborado con 40% de vinazas tequileras

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

Tabla 4. Crecimiento de las cepas de hongos filamentosos en medios elaborados con vinazas tequileras\*

Cepa	Medio	Diámetro (cm)
P1	PDA	8.7 ± 0.00 A*
P1	10%	8.7 ± 0.00 A
P1	20%	8.6 ± 0.02 A
C1	10%	8.5 ± 0.00 A
121	10%	8.5 ± 0.00 A
121	PDA	8.4 ± 0.14 A
P1	30%	8.0 ± 0.17 B
50c	PDA	7.4 ± 0.55 C
121	30%	7.1 ± 0.52 C
121	20%	6.8 ± 0.36 D
C1	PDA	6.5 ± 0.25 D
9	PDA	6.4 ± 0.02 D
P1	40%	6.1 ± 0.15 E
41	10%	5.1 ± 0.51 F
50c	10%	5.0 ± 0.10 G
9	10%	4.9 ± 0.36 G
50c	20%	4.7 ± 0.33 G
C1	20%	4.4 ± 1.70 G
50c	30%	4.1 ± 0.75 J
9	20%	4.0 ± 0.24 J
50c	40%	3.8 ± 0.25 J
7x8	PDA%	3.7 ± 0.47 J
9	30%	3.5 ± 0.22 M
C1	30%	3.5 ± 1.35 M
41	20%	3.3 ± 0.53 M
41	PDA	3.3 ± 0.40 M
7x8	10%	3.3 ± 0.14 M
27	10%	3.0 ± 0.28 M
27	PDA	2.8 ± 0.10 P
76	PDA	2.8 ± 0.05 P
L18	PDA	2.6 ± 0.25 P
76	10%	2.6 ± 0.05 P
8x3	10%	2.6 ± 0.48 P
8x3	PDA	2.5 ± 0.20 P
27	20%	2.4 ± 0.30 P
7x8	30%	2.3 ± 0.17 P
7x8	40%	2.3 ± 0.20 P
L5	10%	2.3 ± 0.05 P
27	30%	2.3 ± 0.11 P
L5	PDA	2.1 ± 0.13 R
7x8	20%	2.0 ± 0.31 R
L18	10%	2.0 ± 0.66 R
30	PDA	1.6 ± 0.30 S
30	10%	1.6 ± 0.08 S
29	10%	1.4 ± 0.20 S
29	PDA	1.3 ± 0.07 S

\* Letras diferentes muestran diferencias significativas (Duncan P < 0.05)

## Producción de biomasa en estado sólido

En la Tabla 5 se presenta la producción de biomasa de los hongos filamentosos en el medio sólido preparado con diferentes concentraciones (10, 20, 30, y 40 %) de vinazas tequileras. Se observa que todas las concentraciones vinazas tequileras se obtuvo crecimiento micelial, con excepción en el medio elaborado con 50% en donde no se desarrollo micelio de las cepas evaluadas.

El análisis de varianza (Cuadro 2) indicó que el mejor medio de cultivo fue el PDA, ya que la producción de biomasa fue de 30.1 mg/caja. En el siguiente grupo se encontró el medio elaborado con 20% de vinazas tequileras con una producción de biomasa de 22.6 mg/caja. Le siguieron los medios con 10% y 30% con 14.5 y 12.7 mg/caja, respectivamente. Finalmente a una concentración del 40% de vinazas se encontró una producción de 4.2 mg/caja.

Tabla 5. Producción de biomasa de las cepas de hongos filamentosos en el medio sólido elaborado con vinazas tequileras y PDA.

Medio	Producción de biomasa (mg/caja)
PDA	30.1 ± 19.88 A*
20%	22.6 ± 17.31 B
10%	14.5 ± 19.89 C
30%	12.7 ± 16.85 C
40%	4.2 ± 8.89 D

\* Letras diferentes muestran diferencias significativas (Duncan P < 0.05)

Las diferencias de crecimiento en las concentraciones dependen de los nutrimentos que necesitan las cepas de hongos para su desarrollo (Lambraki *et al.*, 1996). La mayor producción de biomasa en el medio al 20% de vinazas puede deberse a que los azúcares presentes en el medio fueron tomados como fuentes de carbono por la cepa para la formación de biomasa, esto no sucede en la concentración al 10%, porque la cantidad de azúcares no es la adecuada para el crecimiento del hongo, como lo menciona Ofosu-Osiedu *et al.*, 1986, quienes utilizaron desechos de diversas maderas en el crecimiento de *Volvariella*

*volvacea*. En el caso de las concentraciones mayores de vinazas tequileras, la inhibición en el desarrollo de la cepa, tal vez sea el pH, como lo describe (Sobal *et al.*, 1989); o esto puede deberse a la habilidad de las cepas para obtener los nutrimentos del medio (Roussos *et al.*, 1991).

La tabla 6 muestra la producción de biomasa de las cepas de hongos utilizadas en los medios evaluados. Se observa que la mayor producción de biomasa se obtuvo en las cepas C1 con 57.2 mg/caja y 50c con 32.3 mg/caja. Enseguida se encuentran las cepas 121, P1, 7x8, 8x3, 27, 9, 41, L18, L5, 76 y 30 con una producción de biomasa de 22.0 mg/caja a 2.1 mg/caja. La menor producción de biomasa se presentó en la cepa 29 con 0.7 mg/caja. Trejo-Hernández *et al.*, 1991, evaluaron tres cepas de *Aspergillus niger* y observaron que las diferencias en la producción de biomasa, se debe a los diferentes requerimientos metabólicos de cada cepa utilizada.

Tabla 6. Producción de biomasa en las diferentes cepas evaluadas en medio sólido.

Cepa	Producción de biomasa (mg/caja)
C1	57.2 ± 11.85 A*
50c	32.3 ± 8.88 A
121	29.6 ± 24.49 B
P1	22.0 ± 11.33 B
7x8	14.0 ± 8.74 B
8x3	10.2 ± 2.32 B
27	8.9 ± 7.94 B
9	7.2 ± 6.58 B
41	4.2 ± 5.05 B
L18	2.8 ± 4.26 B
L5	2.6 ± 3.93 B
76	2.4 ± 4.44 B
30	2.1 ± 3.23 B
29	0.7 ± 0.97 C

\* Letras diferentes muestran diferencias significativas (Duncan P < 0.05)

De acuerdo al análisis estadístico realizado (Cuadro 2) se determinó que el medio de cultivo elaborado con 20% de vinazas tequileras permite una mayor producción de biomasa de 22.6 mg/caja, sólo superado por el medio testigo con 30.6 mg/caja. Así

mismo las cepas C1 y 50c presentaron la mayor producción de biomasa de 57.2 y 32.3 mg/caja, respectivamente.

## 6.2 Cultivo en estado líquido

El medio líquido se elaboró de acuerdo a los resultados de producción de biomasa que se presentaron en el medio sólido. Para ello se preparó un medio líquido con 20% de vinazas tequileras y se seleccionó la cepa C1 por su mayor producción de biomasa. La cepa P1 fue utilizada porque se ha registrado en la literatura como una especie adecuada para la eliminación de contaminantes en efluentes residuales de industrias (Bes *et al.*, 1987; Cruz-Cordova *et al.*, 1997; Hernández *et al.*, 1999a).

Las vinazas tequileras utilizadas presentaron un pH de 3.8 a 3.9 y concuerdan con lo registrado por Cedeño (1995) en donde menciona que el pH de las vinazas tequileras es menor a 4. Por otro lado, la mayoría de los hongos necesitan oxígeno para su crecimiento y desarrollo (Deacon, 1988). Resulta interesante observar el efecto del pH sobre la producción de biomasa de las cepas seleccionadas (C1 y P1) en un medio de cultivo en estado líquido elaborado con 20% de vinazas tequileras con pH de 4 y 5 y una agitación de 0 y 100 rpm. La temperatura de incubación fue de 28°C durante 10 días.

Una vez inoculados los matraces con las dos cepas y finalizado el periodo de incubación se filtró el medio para separar el micelio del sustrato agotado y determinar la producción de biomasa por peso seco. Además, se determinó el pH del medio de cultivo al final del periodo de incubación para observar los cambios que sufrió por la actividad enzimática de los hongos.

La producción de biomasa de las cepas C1 y P1 en el medio con 20% de vinazas tequileras, en dos pH de 4 y 5, y una agitación de 0 y 100 rpm se muestra en la Tabla 7. El análisis estadístico (Cuadro 3) indicó que la cepa P1 en el medio con un pH de 5 y 100 rpm presentó la mayor producción de biomasa con 362.8 mg/matraz. En el siguiente grupo estadístico se encontró a la P1 en el medio con pH de 5 y 4 pero sin agitación (0 rpm) con una producción de biomasa de 329.5 y 325.6 mg/matraz. Enseguida se determinó que

la C1 en el medio con pH de 5 y sin agitación la producción de biomasa fue de 313.1 mg/matraz. Sin embargo, la producción de biomasa disminuyó a 298.9 mg/matraz con una agitación de 100 rpm. La menor producción de biomasa fue en el medio con un pH de 4 ya que la C1 y la P1 con 100 rpm presentaron 286.2 y 223.0 mg/matraz, respectivamente y la C1 sin agitación sólo presentó una producción de 88.5 mg/matraz.

Tabla 7. Efecto del pH y la agitación sobre la producción de biomasa de las cepas P1 y C1 en el medio de cultivo en estado líquido con 20% de vinazas tequileras.

Cepa	pH	Agitación (rpm)	Producción de biomasa (mg/matraz)
P1	5	100	362.8 ± 2.0 A*
P1	5	0	329.5 ± 1.6 B
P1	4	0	325.6 ± 1.7 B
C1	5	0	313.1 ± 1.9 C
C1	5	100	298.9 ± 6.9 D
C1	4	100	286.2 ± 1.5 E
P1	4	100	223.0 ± 1.8 F
C1	4	0	88.5 ± 4.2 G

\* Letras diferentes muestran diferencias significativas (Duncan  $P < 0.05$ )

El incremento del pH de 4 a 5 en el medio líquido mostró un efecto sobre el crecimiento de las cepas C1 y P1, observándose una menor producción de biomasa en un pH de 4 en comparación con el medio de cultivo con pH de 5. De acuerdo a Jong-Chul *et al.* (1996), la baja producción de biomasa en el medio con un pH 4, puede ser debido a la adaptación de las cepas a tales características del medio. Así mismo, Prior *et al.* (1992) y García *et al.* (1997) mencionaron que las diferencias en la producción de biomasa entre las cepas por el pH, se debe a que cada cepa presenta distintas respuestas a las características de acidez del medio.

Al contrario del pH, la agitación presentó un efecto diferente para cada cepa estudiada. La mayor producción de biomasa fue obtenida por la cepa P1 en el medio con agitación (100 rpm) y un pH de 5. En cambio la cepa C1 presentó la mayor producción de biomasa a un pH de 5 pero sin agitación (0 rpm).

La menor producción de biomasa de la cepa C1 en comparación con la P1, puede deberse a que la agitación estimuló la producción de otros compuestos, tales como enzimas u otros metabolitos primarios o secundarios (Lambraki *et al.*, 1994).

La producción de biomasa de las cepas P1 y C1 con 362.8 mg/matraz y 313.1 mg/matraz, respectivamente, en el medio de cultivo con 20% de vinazas tequileras y pH de 5 fue mayor a la registrada en el crecimiento de *Pleurotus ostreatus* en medios de cultivo elaborados con agua del cocimiento del maíz, agua del extracto de la pulpa del café, infusión de sorgo, suero de leche, extracto sintético de glucosa o agua del lavado de las semillas del café (Nieto y Sánchez, 1997). En ese trabajo se muestra que después de 4 días de incubación, la producción de biomasa en los diversos desechos líquidos industriales fue desde 85.5 mg/l a 60.7 mg/l mientras que a 7 días de incubación se obtuvieron 396.0 mg/l pero en el extracto sintético de glucosa.

### **Producción de biomasa**

El efecto del crecimiento de las cepas C1 y P1 sobre el pH del medio de cultivo se observa en la Tabla 8. En la cepa C1 a un pH inicial de 4 y sin agitación se observó una disminución a 3.85. En cambio con agitación se incremento a 4.69. En un pH de 5, el crecimiento del micelio disminuyo a 4.69 cuando se agitó con 100 rpm y 4.35 sin agitación (Cuadro 4). Esto es debido a la producción de ácidos orgánicos, entre ellos láctico y acético, la utilización de nutrimentos como fuente de nitrógeno que modifican el medio y proveen las condiciones óptimas para la actividad enzimática (Johnston y Williamson, 1992).

La cepa P1 incrementó el pH ya que en el medio con o sin agitación se determinó un pH 4.58 y 4.50, respectivamente. Así mismo se observó una disminución en el pH inicial del medio de 5 a 4.40 (sin agitación) y 4.50 (con agitación).

El comportamiento de las dos cepas evaluadas concuerda con Ofosu-Osiedu *et al.* (1986), es decir. el pH del medio del cultivo se ve afectado por la utilización y

secreción de metabolitos producto del metabolismo de las cepas de hongos para estabilizarlo en un pH entre 4.25 y 4.50.

Tabla 8. Variación del pH en el medio líquido después de incubar las cepas C1 y P1 con y sin agitación.

Cepa	Agitación	pH inicial	pH final	Diferencia
C1	0	4	3.85	0.15
	100	4	4.25	0.25
	0	5	4.69	0.31
	100	5	4.35	0.65
P1	0	4	4.58	0.58
	100	4	4.50	0.50
	0	5	4.40	0.60
	100	5	4.50	0.50

En la Tabla 9 se muestra el consumo de azúcares de las cepas C1 y P1 en el medio de cultivo con 20% de vinazas tequileras en estado líquido. En la cepa C1 al modificar el pH de 4 a 5 se observó un aumento en el consumo de azúcares, de 1.32 g/matraz a 1.53 g/matraz con una agitación de 0 y 100 rpm, respectivamente.

El consumo de azúcares para la cepa P1 a un pH de 4 fue de 1.65 g/matraz y 1.78 g/matraz con una agitación de 0 y de 100 rpm. Al incrementar el pH del medio a 5 el consumo de azúcar fue de 1.54 g/matraz y 1.69 g/matraz con agitación de 100 y 0 rpm. De acuerdo con Hernández *et al.*, 1999a el azúcar consumido se utiliza para la producción de biomasa y enzimas del metabolismo.

En la tabla 10 se muestra el rendimiento de las cepas C1 y P1 en el medio líquido elaborado con 20% de vinazas tequileras. El rendimiento de la cepa C1 en un pH de 4 fue de 0.22 y 0.07 con una agitación de 100 y 0 rpm, mientras que en el pH de 5 se observó un rendimiento de 0.22 y 0.20 con y sin agitación. El rendimiento de la cepa P1 a un pH de 4 fue de 0.20 y 0.13 con una agitación de rpm y a un pH de 5 se determinó un rendimiento de 0.19 y 0.24 a 0 y 100 rpm, respectivamente.

Tabla 9. Efecto del pH y la agitación sobre el consumo de azúcares de las cepas C1 y P1 en el medio elaborado con 20% de vinazas tequileras en estado líquido.

Cepa	pH	Agitación (rpm)	Consumo de azúcar (g/matraz)
C1	4	0	1.32 ± 0.085
	4	100	1.33 ± 0.295
	5	0	1.44 ± 0.388
	5	100	1.53 ± 0.052
P1	4	0	1.65 ± 0.109
	4	100	1.78 ± 0.168
	5	0	1.69 ± 0.093
	5	100	1.54 ± 0.092

Una característica importante de los hongos es la producción de enzimas, las que en algunas ocasiones son utilizadas en la decoloración de efluentes industriales. En la Tabla 11 se observa la decoloración del medio por las cepas C1 y P1 en el medio de cultivo líquido con 20% de vinazas tequileras. Con la agitación la cepa C1 y después del periodo de incubación, se observó una decoloración, es decir, de color café oscuro se tornó a amarillo claro. Este fenómeno se presentó en el medio de cultivo sólo en esta cepa y no en la P1. Larralde *et al.*, (1999), mencionaron que la agitación en un medio líquido se produce un cambio en el comportamiento fisiológico de la cepa y se estimula la producción de enzimas que permiten decolorar el medio. Asimismo Lambraki *et al.*, (1994) obtuvieron resultados parecidos en la degradación de taninos mediante el cultivo agitado de *Aspergillus carbonarius* en un medio de cultivo elaborado con harina de algarroba.

Tabla 10. Rendimiento de la cepa C1 y P1 en el medio de cultivo en estado líquido con 20% de vinazas tequileras.

Cepa	pH	Agitación (rpm)	Rendimiento
C1	4	100	0.22
	4	0	0.07
	5	0	0.22
	5	100	0.20
P1	4	0	0.20
	4	100	0.13
	5	0	0.19
	5	100	0.24

Cruz-Córdova *et al.*, (1997) utilizaron cepas de *Pleurotus* en la decoloración de efluentes contaminadas por sosa de la industria azucarera. Debido a la decoloración del medio elaborado con vinazas tequileras se consideró a la cepa C1 como la mas adecuada para su posible utilización de la degradación de compuestos contaminantes de las vinazas tequileras.

Tabla 11. Decoloración del medio de cultivo elaborado con 20% de vinazas tequileras por las cepas C1 y P1.

<b>Cepa</b>	<b>pH</b>	<b>Agitación</b>	<b>Decoloración</b>
C1	5	0	no
	5	100	si
	4	100	si
	4	0	no
P1	5	100	no
	5	0	no
	4	0	no
	4	100	no

## 7 CONCLUSIONES

1. Las vinazas tequileras resultaron ser una buena fuente de nutrimentos para la elaboración de medios de cultivo en estado sólido y líquido para el crecimiento de cepas de hongos filamentosos.
2. El medio de cultivo en estado sólido elaborado con 20% de vinazas tequileras permitió el mayor crecimiento de los hongos filamentosos estudiados, obteniendo una producción de biomasa promedio de 22.6 mg/caja.
3. De las 14 cepas utilizadas, la P1 presentó las características más adecuadas para su utilización en el medio sólido, con un crecimiento de 8.6 cm y una producción de biomasa de 22.0 mg/caja, después de 7 días de incubación en el medio de cultivo sólido con 20% de vinazas tequileras.
4. Es posible obtener una producción de biomasa de 363 mg/matraz con la cepa P1 en el medio de cultivo con 20% de vinazas tequileras, un pH de 5 y una agitación de 100 rpm.
5. Con la cepa C1 es posible obtener una producción de biomasa de 313 mg/matraz en el medio con 20% de vinazas tequileras, un pH de 5 y sin agitación

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

## 8 RECOMENDACIONES

Con los resultados del presente estudio se encontró que las vinazas son una buena fuente de nutrimentos para el cultivo de hongos filamentosos. Sin embargo, es necesario realizar estudios sobre degradación de contaminantes por parte de las cepas de hongos en las vinazas tequileras, con el fin de que estas sean consideradas como una posible alternativa de tratamiento para estos desechos contaminantes.

Asimismo, se sugiere evaluar las condiciones para obtener un mayor crecimiento de alguna de las tres cepas que lograron un crecimiento en el medio de cultivo con vinazas tequileras al 40% y determinar si las vinazas presentan mejores características físico-químicas y están consideradas dentro de la norma oficial.

El crecimiento obtenido por las cepas en la concentración del 20% de vinazas tequileras sugiere, que estas pueden ser utilizadas como sustituto del medio de cultivo para la producción de micelio, pero se requiere realizar estudios físico-químicos y biológicos para determinar las causas por las que no se obtuvo mejores crecimientos en las mayores concentraciones de vinazas.

## 9 LITERATURA CITADA

- Alexopoulos, J. 1976. Introducción a la micología. Ed. Universitaria de Buenos Aires.
- Arias, A. y S. Fausto. 1999. Cinética de crecimiento de *Pleurotus* y *Lentinus* en mieles amargas de la industria tequilera. Memorias VIII Congreso Nacional de Bioetecnología y Bioingeniería / IV Congreso Latinoamericano de Biotecnología, Huatulco, Oaxaca. 12 al 17 de septiembre. p 512.
- Arias, A., R. Ramírez y H. Leal. 1999. Selección de cepas de *Pleurotus ostreatus* por apareamientos entre neohaplontes y resistencia a 2 DG para una mayor producción de cuerpos fructíferos en lignocelulosa. Memorias VIII Congreso Nacional de Bioetecnología y Bioingeniería / IV Congreso Latinoamericano de Biotecnología, Huatulco, Oaxaca. 12 al 17 de septiembre. p 513.
- Bes, B., B. Petterson, H. Lennhohm, T. Iversen y K. Eriksson. 1987. Synthesis, structure and enzymatic degradation of an extracellular glucan produced in nitro-starved cultures of white rot fungus, *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotech. Appl. Biochem.* 9. 310-318.
- Bisaria, R., P. Vasudevan y V. S. Visaria. 1990. Utilization of spent agro-residues from mushroom cultivation for biogas production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33: 607-609.
- Biswas. S. R., S. C. Jana, A. K. Mishra y G. Nanda. 1989. Production, purification and characterization of xylanase from a hyperxylanolytic mutant of *Aspergillus ochraceus*. *Biotechnol. Bioeng.* 35: 244-251.
- Brady, J., J. Tobin y G. Goffrey. 1996. Volatilization of selenite in aqueous medium by *Penicillium* especies. *Mycol. Res.* 100: 955-961.
- Bumpus, J. y A. E. D. Aust. 1987. Biodegradation of DDT [1,1,1. trichloro-2-2-bis (chlorophenyl) ethane] by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53 (9): 2001-2008.
- Burns, P. J., P. Yeo., T. Keshavarz., S. Roller. y C. S. Evans. 1994. Physiological studies of exopolysaccharide production from basidiomycete *Pleurotus sp. florida*. *Enzyme Microb. Technol.* 16: 566-572.
- Caicedo, L. A., Rico Y., Ramirez W. B. y Restrepo P. 1997. Efecto de la recirculación de vinazas en la fermentación alcoholica con células inmovilizadas. Memorias VII Congreso Nacional de Bioetecnología y Bioingeniería / II Simposio Internacional sobre Ingeniería de Bioprocesos. Mazatlán. Sinaloa. 11 al 16 de septiembre. p 94.
- Cámara Regional de la Industria Tequilera. 1999. Informe anual.
- Cedeño. M. 1995. Tequila production. *Crit. Rev. Biotech.* 15: 1-11.

- Chandler, V., F. Abruña y J. Lozano. 1984. Distillery effluent treatment. *J. Agric. Univ. Puerto Rico*. 68: 396-403.
- Chang, S. T. y W. A. Hayes. 1978. The biology and cultivation of edible mushrooms. *Academic Press*. 43-57.
- Christakoupoulos, P., Basil J. Macris. y D. Kekos. 1990. On the mechanism of direct conversion by *Fusarium oxysporum*: effect of cellulase and  $\beta$ -glucosidase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33: 18-20
- Covarrubias, G., F. García., R. Macías., M. Altamirano y C. Chávez. 1997. Bagazo y vinazas desechos de una fabrica de tequila. Memorias VII Congreso Nacional de Bioetecnología y Bioingeniería / II Simposio Internacional sobre Ingeniería de Bioprocesos, Mazatlán, Sinaloa. 11 al 16 de septiembre. p 55.
- Cruz-Córdova, T., D. Díaz-Cervantes., R. Rodríguez-Vázquez., J. Ortega-López y A. Tomasini-Campocoso. 1997. Selección de cepas de *Pleurotus* para la decoloración de un afluente de pulpeo a la sosa. Memorias VII Congreso Nacional de Bioetecnología y Bioingeniería / II Simposio Internacional sobre Ingeniería de Bioprocesos, Mazatlán, Sinaloa. 11 al 16 de septiembre. p 223.
- Deacon, J. W. 1988. Introducción a la micología moderna. LIMUSA. México.
- Dubois, M., K. A. Hamilton., P. A. Rebers y F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry*. 28: 350-356.
- Eder, K. 1976. Tratamiento y aprovechamiento de aguas residuales de levadura y alcohol. *Ingeniería Química*. 6: 103-111.
- García, R. H. Macarie., E. Favela y M. Gutierrez. 1997. Utilización de ácido tereftálico por hongos filamentosos. Memorias VII Congreso Nacional de Bioetecnología y Bioingeniería / II Simposio Internacional sobre Ingeniería de Bioprocesos, Mazatlán, Sinaloa. 11 al 16 de septiembre. p 265.
- Gharieb, M., K. Martin y M. Geoffrey. 1999. Transformation and tolerance of tellurite by filamentous fungi: accumulation, reduction, and volatilization. *Mycol. Res.* 103: 299-305.
- Guzmán-Dávalos, L., D. Martínez-Cabrera., P. Morales y C. Soto. 1987. El cultivo de hongos comestibles (*Pleurotus*) sobre el bagazo de maguey de la industria tequilera. *Rev. Mex. Mic.* 3: 47-49.
- Hernández, A., J. Salazar., R. Rodriguez y E. Ramos. 1999a. Estudio reologico del cultivo *Phanerochaete chrysosporium* durante la biodegradación de compuestos aromaticos. Memorias VIII Congreso Nacional de Bioetecnología y Bioingeniería / IV Congreso Latinoamericano de Biotecnología, Huatulco, Oaxaca. 12 al 17 de septiembre. p 475.
- Hernández, J., G. Iñiguez y G. Gutiérrez. 1999b. Comportamiento productivo en cerdos alimentados con sólidos de vinazas tequileras. *Scientia.CUCBA*. 1: 44-48.

- Johnston, D. J. y R. Williamson. 1992. Purification and characterization of four polygalacturonases from *Botrytis cinerea*. *Micol. Res.* 96: 343-349.
- Jong-Chul, P., I. Matsuoka, K. Takatori y H. Kuruata. 1996. Adaptation of *Aspergillus niger* to acid conditions and it's relationship to salt stress and miconazole. *Micol. Res.* 100: 869-874.
- Lambraki, M., S. Marakis y S. Roussos. 1994. Efecto de la temperatura y del flujo de aireación sobre la degradación de taninos de la algarroba por *Aspergillus carbonarius* en fermentación en medio sólido. *Micol. Neotrop. Apl.* 7: 23-34.
- Lambraki, M., S. Marakis y S. Roussos. 1996. Effects of initial sugar and mineral concentrations of carob substrates on the growth of *Aspergillus carbonarius* in solid state fermentation system. *Micol., Neotrop. Apl.* 9: 1-14.
- Larralde, P., S. Córdova., C. Flores., K. Balderas., E. Zamora., G. Corkidi., L. Serrano y E. Galindo. 1999. Propiedades reológicas y morfométricas del cultivo sumergido de *Trichoderma harzianum*. Memorias VIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería / IV Congreso Latinoamericano de Biotecnología, Huatulco, Oaxaca. 12 al 17 de septiembre. p 199.
- Lievremont, D., F. Seigle-Morandi., J. Benoit-Guyond y R. Steiman. 1996. Biotransformation and bioabsorption of pentachloronitrobenzene by fungal mycelia. *Micol. Res.* 100: 948-954.
- Linerio, J., A. Guzmán y A. Noyola. 1999a. Tratamiento anaerobio de vinazas tequileras: escalamiento a nivel piloto. Memorias VIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería / IV Congreso Latinoamericano de Biotecnología, Huatulco, Oaxaca. 12 al 17 de septiembre. p 449.
- Linerio, J., A. Guzmán y A. Noyola. 1999b. Panorama ambiental de los efluentes del sector tequilero. Memorias VIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería / IV Congreso Latinoamericano de Biotecnología, Huatulco, Oaxaca. 12 al 17 de septiembre. p 448.
- Maiorella, B., H. Blanch y C. Wilke. 1983. Destiller affluent treatment and by-product recovery. *Process Biochem.* 18: 5-8.
- Masaphy, S. y D. Levanon. 1992. The effec of lignocellulose on lignocellulolytic activity of *Pleurotus pulmonarius* in submerged culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36: 828-832.
- Morley, G. y M. Geoffrey. 1995. Sorption of toxic metals by fungi and clay metals. *Micol. Res.* 99: 1429-1438.
- Nieto-López. C y J. E. Sánchez-Vázquez. 1997. Mycelial growth of *Pleurotus* and *Auricularia* agroindustrial affluents. *Micol. Neotrop. Apl.* 10: 47-56.
- Ofosu-Osiedu. A., O. Schmidt y W. Liese. 1986. Growth studies whit isolates of

- Volvariella volvacea* for cultivation on wood waste. *Plant Research and development*. 23: 45-63.
- Pascoe, S., Rodríguez R. y J. Alvarez de la Cuadra. 1999. Producción y evaluación de sustratos vegetales elaborados a partir de residuos de la industria tequilera. Memorias VIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería / IV Congreso Latinoamericano de Biotecnología, Huatulco, Oaxaca. 12 al 17 de septiembre. p 435.
- Platt., M., Y. Bashan., I. Chet y Y. Henis. 1981. Two media for the rapid growth of *Pleurotus* species. *Mushroom Newsletter for the Tropics*. 1: 2-5.
- Prior, B. A., J. C. Du prez y P. Rein. 1992. Environmental parameters in solid substrate. Ed Elsevier Applied Science. 65-85.
- Rodríguez-Buenfil, I., J. Alvarez-Jacobs., D. Line y P. Strehaiano. 1997. Producción de biomasa de *Acetobacter aceti* en un medio con vinazas tequileras. Memorias VII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería / II Simposio Internacional sobre Ingeniería de Bioprocesos, Mazatlán, Sinaloa. 11 al 16 de septiembre. p 385.
- Roussos, S., M. Rambault., G. Saucedo-Castañeda., G. Viniegra-González y B. Lonsane. 1991. Kinetics and ratios of carboxi-methyl cellulose and filter paper activities of the cellulolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum* on different substrates in solid state fermentation. *Micol. Neotrop. Apl.* 4: 19-40.
- Sánchez, F. 1991. Recirculación de vinazas tequileras en la fermentación alcohólica. Tesis Biología. U de G.
- Sánchez, C., A. Lara y M. Mejias. 1999. ¿Como aprovechar eficientemente un afluente de la industria alcoholera?: varias alternativas para los productores. Memorias VIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería / IV Congreso Latinoamericano de Biotecnología, Huatulco, Oaxaca. 12 al 17 de septiembre. p 288
- Sayer, J., L. Samantha y M. Geoffrey. 1995. Solubilization of insoluble metal compounds by soil fungi: development of a screening method for solubilizing ability and metal tolerance. *Mycol. Res.* 99: 987-993.
- Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. 1997. Norma Oficial Mexicana NOM-006-SCFI-1994 Bebidas alcohólicas-Tequila-Especificaciones. Diario Oficial de la Federación.
- Secretaría de Medio Ambiente Recursos Naturales y Pesca. 1999. Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente (y disposiciones complementarias). Ed Porrúa.
- Sheehan, G. y P. Greenfield. 1980. Utilization, treatment and disposal of distillery waste water. *Water Research*. 14. 257-277.
- Singh. A., P. Kumar y K. Schugerl. 1992. Direct fermentation of cellulosic materials by

- Fusarium oxysporum* 841: acetic acid/ethanol production and tolerance. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 38: 227-236.
- Sobal, M., P. Morales y D. Martínez-Cabrera. 1989. Efecto del pH sobre el crecimiento de diversas cepas Mexicanas y extranjeras de hongos comestibles en el laboratorio. *Micol. Neotrop. Apl.* 2: 19-39.
- Soto, C., L. Guzmán-Dávalos y L. Villaseñor. 1991. Substrates for cultivation of *Pleurotus* in México. I. Tequila maguey bagasse (*Agave tequilana*). *Mush. J. Tropic.* 11: 29-33.
- Trejo-Hernández, M., E. Oriol., A. López-Canales., S. Roussos., G. Vinegra-González y M. Raimbault. 1991. Producción de pectinasas de *Aspergillus niger* por fermentación sólida sobre soporte. *Micol. Neotrop. Apl.* 4: 49-62.
- Trinci, A. 1992. Myco-protein: a twenty years overnights success story. *Mycol. Research.* 96: 1-13.
- Wainwright, M. 1992. Introducción a la biotecnología de hongos. Ed Acribia.

## 10. ANEXOS

**Cuadro 1. Análisis de varianza para el diámetro de crecimiento en los medios de cultivo con vinazas tequileras (10, 20, 30, 40, 50%) y PDA.**

Factor de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	Pr > F
Cepa	13	897.2617163	69.0201320	654.37	0.0001**
Medio	5	645.7435020	129.1487004	1224.43	0.0001**
Cepa/Medio	65	395.0777480	6.0781192	57.63	0.0001**
Error	168	17.720000	0.105476		
<b>Total</b>	<b>251</b>	<b>1955.802966</b>			

\*\* Diferencias altamente significativas

ns No presenta diferencias significativas

**Cuadro 2. Análisis de varianza para la producción de biomasa en los medios de cultivo con vinazas tequileras (10, 20, 30, 40, 50%) y PDA.**

Factor de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Pr > F
Cepa	13	0.06118248	0.00470634	3.18	0.0003 **
Medio	5	0.02625076	0.00525015	3.55	0.0045 **
Cepa/medio	65	0.12634347	0.00194375	1.31	0.0852 ns
Repetición	2	.00096856	0.00048428	0.33	0.7213 ns
Error	166	0.24558194	0.00147941		
<b>Total</b>	<b>251</b>	<b>0.46032721</b>			

\*\* Diferencias altamente significativas

ns No presenta diferencias significativas

**Cuadro 3. Análisis de varianza de la producción de biomasa en el medio líquido con 20% de vinazas tequileras.**

<b>Factor de variación</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Cuadrados medios</b>	<b>Valor de F</b>	<b>Pr &gt; F</b>
Cepa	1	0.02425068	0.02425068	634.32	0.0001**
pH	1	0.05444490	0.05444490	1424.09	0.0001**
Agitación	1	0.00489347	0.00489347	128.00	0.0001**
Cepa/pH	1	0.00327894	0.00327894	85.75	0.0001**
Cepa/agitación	1	0.02397176	0.02397176	627.02	0.0001**
Cepa/pH/agitación	2	0.04755961	0.02377980	622.00	0.0001**
Error	16	0.00061170	0.00003823		
<b>Total</b>	<b>23</b>	<b>0.15901047</b>			

\*\* Diferencias altamente significativas

ns No presenta diferencias significativas

**Cuadro 4. Análisis de varianza del pH en el medio con 20% de vinazas tequileras antes y después del crecimiento de las cepas de hongos.**

<b>Factor de variación</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Cuadrados medios</b>	<b>Valor de F</b>	<b>Pr &gt; F</b>
Cepa	1	0.31970417	0.31970417	5.80	0.0284**
Agitación	1	0.01353750	0.01353750	0.25	0.6269 ns
pH	1	0.16500417	0.16500417	2.99	0.1028 ns
Cepa/Agitación	1	0.00150417	0.00150417	0.03	0.8708 ns
Cepa/pH	1	0.54903750	0.54903750	9.97	0.0061**
Cepa/Agitación/pH	2	0.39804167	0.19902083	3.61	0.0507 ns
Error	16	0.88153333	0.05509583		
<b>Total</b>	<b>23</b>	<b>2.32836250</b>			

\*\* Diferencias altamente significativas

ns No presenta diferencias significativas