



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GANADERIA

**ESTUDIO DEL CULTIVO SÓLIDO DE PAJA DE SORGO
EN LA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS FIBROLÍTICAS
Y DIGESTIBILIDAD RUMINAL *IN VITRO*
CON *Fomes fomentarius* EUM1 Y *Pleurotus sapidus***

MARCELA VILLEGAS CASTAÑEDA

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO.

2010

La presente tesis titulada: **Estudio del cultivo sólido de paja de sorgo en la producción de enzimas fibrolíticas y digestibilidad ruminal *in vitro* con *Fomes fomentarius* EUM1 y *Pleurotus sapidus***, realizada por la alumna: Marcela Villegas Castañeda, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS
RECURSOS GENETICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



MARCOS MENESES MAYO

ASESOR



SERGIO S. GONZÁLEZ MUÑOZ

ASESOR



LUIS A. MIRANDA ROMERO

ASESOR



OCTAVIO LOERA CORRAL

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Abril de 2010

DEDICATORIAS

A mi madre y mi padre

Micaela E. Castañeda y Francisco E. Villegas

Les agradezco y dedico esta tesis

Por darme la vida, por todo el amor que me han dado, por darme la libertad para decidir y por su apoyo incondicional a lo largo de mi vida.

A mi hermana Donaji y mi sobrina Atzin por tanta alegría que traen a mi vida y por el cariño que me han dado.

También de ustedes he aprendido

“Si consigo ver más lejos es porque he logrado subirme en hombros de gigantes”

Isaac Newton

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada.

Al Colegio de Postgraduados, por darme la oportunidad de realizar mis estudios de Maestría.

Al Dr. Marcos Meneses Mayo, por el tiempo dedicado a mi formación profesional y sus consejos.

Al Dr. Sergio S. González Muñoz por su gran apoyo, sencillez y sabios consejos, por todas las cosas bellas que compartió que han enriquecido mi espíritu, por su tiempo; por escucharme y tener las palabras adecuadas que han transformado los momentos, por enseñarme una de las mejores lecciones que he recibido: “ante todo intenta ser siempre mejor persona”. Dr. siempre lo llevare en mis recuerdos, ha sido un honor conocerlo.

Al Dr. Luis A. Miranda Romero por sus valiosas enseñanzas, su paciencia, su motivación, sus consejos, disposición, y facilidades otorgadas para realizar parte del trabajo de investigación.

Al Dr. Octavio Loera Corral, gracias por su apoyo y valiosa contribución hacia la presente investigación.

A todos mis profesores, por sus enseñanzas.

Al Sr. Braulio y Sr. José del laboratorio de microbiología pecuaria, de la UACH por su apoyo en mi trabajo experimental.

Al Sr Indalecio del laboratorio de nutrición animal de la UACH por el gran apoyo y las enseñanzas en el trabajo experimental.

A la Dr. Magdalena Crosby, por su colaboración en el Laboratorio de Nutrición Animal del C.P.

A mis amiguitas de casa (Piedad, Vielka, Josefa) por que vivir conmigo no es nada fácil y porque compartimos muchos momentos memorables.

A ti S. P. E. por tu apoyo moral invaluable en mi estancia en el colegio, por saber escucharme y porque en un momento tan difícil de mi vida estuviste ahí, muchas gracias.

CONTENIDO

	Pagina
DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
ÍNDICE DE CUADROS.....	vi
INDICE DE FIGURAS.....	vii
RESUMEN GENERAL.....	1
GENERAL ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	3
OBJETIVO GENERAL.....	5
Objetivos específicos.....	5
HIPÓTESIS.....	5
CAPITULO I REVISIÓN DE LA LITERATURA.....	7
El uso de residuos agrícolas en la alimentación de rumiantes.....	7
La producción nacional de sorgo.....	8
Composición de la pared celular de forrajes.....	8
Tratamientos químicos y biológicos del forraje.....	9
Enzimas fibrolíticas exógenas.....	12
Estabilidad y degradación de las enzimas fibrolíticas en rumen.....	13
Hongos productores de complejos enzimáticos fibrolíticos.....	15
<i>Pleurotus ostreatus</i>	16
<i>Fomes fomentarius EUM1</i>	17
Cultivo sólido.....	18
Producción de gas <i>in vitro</i> de distintos esquilmos agrícolas.....	20
Literatura citada.....	23

CAPITULO II. CAMBIOS EN LA COMPOSICIÓN NUTRICIONAL DEL CULTIVO SÓLIDO DE PAJA DE SORGO Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE <i>Pleurotus sapidus</i> Y <i>Fomes fomentarius</i> EUM1.....	35
Resumen.....	35
Abstract.....	36
Introducción.....	37
Materiales y métodos.....	39
Resultados	44
Discusión.....	51
Conclusiones.....	58
Literatura citada.....	59
CAPITULO III PRODUCCIÓN DE GAS <i>IN VITRO</i> Y DESAPARICIÓN DE LA MATERIA SECA DEL CULTIVO SÓLIDO CON HONGOS LIGNINOLITICOS.....	64
Resumen.....	64
Abstract.....	65
Introducción.....	66
Materiales y métodos.....	67
Resultados y Discusión.....	71
Conclusiones.....	83
Literatura citada.....	84
CONCLUSIONES GENERALES.....	89

INDICE DE CUADROS

CAPITULO II

Cuadro 1. Velocidad de crecimiento radial y rendimiento de biomasa de las cepas <i>Fomes fomentarius</i> . EUM1 y <i>Pleurotus sapidus</i> en dos medios de cultivo.....	44
Cuadro 2. Actividad enzimática de <i>P. sapidus</i> y <i>F. fomentarius</i> . EUM1 del día 20 de cultivo sólido.....	50
Cuadro 3. Análisis bromatológico del CS de paja de sorgo con <i>P. sapidus</i> o <i>F. fomentarius</i> EUM1.....	51

CAPITULO III

Cuadro 1. Contrastes ortogonales para el efecto del tratamiento de la paja de sorgo con <i>Pleurotus sapidus</i> , <i>Fomes fomentarius</i> EUM1 y $\text{Ca}(\text{OH})_2$	69
Cuadro 2. Volumen fraccional de gas producido durante la fermentación ruminal <i>in vitro</i> (96 h) de la paja de sorgo tratada con <i>Pleurotus sapidus</i> , <i>Fomes fomentarius</i> EUM1 o CaOH_2 (0.7 %).....	74
Cuadro 3. Variables de producción de gas <i>in vitro</i> (96 h).....	77
Cuadro 4. Ácidos grasos volátiles y nitrógeno amoniacal.....	79
Cuadro 5. Variables calculadas de la producción de gas <i>in vitro</i> (96 h).	81

INDICE DE FIGURAS

Pagina

CAPITULO I

Figura 1. Actividad enzimática celulasas (20 d de CS) con <i>P. sapidus</i> y <i>F. fomentarius</i> EUM1.....	45
Figura 2. Actividad enzimática de xilanasas (20 d de CS), con <i>P. sapidus</i> y <i>F. fomentarius</i> . EUM1.....	46
Figura 3. Actividad enzimática de lacasas (20 d de CS) con <i>P. sapidus</i> y <i>F. fomentarius</i> . EUM1.....	47
Figura. 4 Concentración de proteína soluble (20 d de CS), <i>P. sapidus</i> y <i>F. fomentarius</i> . EUM1.....	49

CAPITULO III

Figura 1. Perfil de producción fraccional de gas <i>in vitro</i> de paja de sorgo, paja húmeda (D0) y paja tratada con CaOH ₂ (0.7 %; D0c).....	71
Figura 2. Perfil de producción fraccional de gas <i>in vitro</i> paja tratada con: <i>P. sapidus</i> (PL), CaOH ₂ (0.7 %) más PL (PLc) y seca (PLs).....	71
Figura 3 Perfil de producción fraccional de gas <i>in vitro</i> de paja de sorgo, paja tratada con: <i>Fomes fomentarius</i> EUM1 (TR), Ca OH ₂ (0.7 %) más <i>F. fomentarius</i> EUM1 (TRc) y seco (TRs).....	72

ESTUDIO DEL CULTIVO SÓLIDO DE PAJA DE SORGO EN LA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS FIBROLITICAS Y DIGESTIBILIDAD RUMINAL *IN VITRO* CON *Fomes fomentarius* EUM1 y *Pleurotus sapidus*.

Marcela Villegas Castañeda, MC

Colegio de Posgraduados, 2010.

Se estudió el cultivo sólido con *Fomes fomentarius* EUM1 y *Pleurotus sapidus* en paja de sorgo, con un tratamiento alcalino y húmedo. El cultivo se realizó durante 20 días previo tratamiento con humedad y Ca OH₂ por 24 h. Se midió la producción de enzimas celulasas, xilanasas y lacasas (complejos lignocelulósicos) producidas en los días 0, 9,15 y 20 de fermentación Se encontró una actividad máxima de celulasas para el hongo *F. fomentarius* EUM1 de 15.24 ±0.99 U/gss y para *P. sapidus* de 6. 51±0.81 U/gss. La máxima actividad xilanasas en *F. fomentarius* fue 79.45±8.69 U/gss y para *Pleurotus* 24.90±0.71 U/gss. También se midió la proteína soluble, la mayor cantidad se cuantificó al día 20. Los cambios en la composición nutricional de la paja variaron paralelamente a la producción de los complejos lignocelulósicos. La proteína total aumento un 2 % con respecto al tiempo inicial y la perdida de lignina fue de 2 % en promedio. Además se midieron cambios en las variables fermentativas *in vitro* mediante la técnica de producción de gas, para determinar el efecto del cultivo sólido y sus complejos lignocelulósicos más el tratamiento con CaOH₂ en fresco y seco. El tratamiento de la paja con *F. fomentarius* EUM1 y *P. sapidus* decrementó las variables fermentativas, en cambio el tratamiento únicamente con Ca OH₂ produjo un mejor volumen de gas. La combinación de ambos tratamientos no tuvo sinergia y detrimento la tasa de producción de gas y digestibilidad .El tratamiento con hongos incrementó la biomasa y la adherencia microbiana aspecto de suma importancia en la nutrición de rumiantes. Y se concluye que el tratamiento con Ca (OH)₂ mejora las características de la paja, pero el cultivo sólido provee de algunos metabolitos nutritivos a la paja que aumentan la microbiota ruminal.

Palabras clave: Cultivo solido, paja de sorgo, *Pleurotus sapidus*, *Fomes fomentarius*, producción de gas

STUDY OF SOLID CULTURE OF SORGHUM STRAW IN THE PRODUCTION OF FIBROLITIC ENZYMES AND DIGESTIBILITY IN VITRO WITH *Fomes fomentarius* EUM1 and *Pleurotus sapidus*.

Marcela Villegas Castañeda, MC.

Colegio de Posgraduados, 2010

The solid culture was studied with *Fomes fomentarius* EUM1 and *Pleurotus sapidus* sorghum straw with an alkaline treatment and moisture. The culture was realized for 20 days previous treatment with dampness and Ca (OH)₂ for 24 h. The production of enzymes measured up cellulases, xylanases and laccases (lignocellulosic complexes) produced in the 0th, 9, 15 and 20 day of fermentation. It found maximum activity of cellulases for the mushroom *F. fomentarius* EUM1 of 15.24 ±0.99 U/gss and for *P. sapidus* of 6.51 ± 0.81 U/gss. The maximum activity xylanases in *F. fomentarius* was 79.45±8.69 U/gss and for *P. sapidus* 24.90±0.71 U/gss. Also the soluble protein was measured up, the major quantity was quantified a 20th day. The changes in the nutritional composition of the straw changed parallel with the production of the lignocellulosic complexes The total protein increased 2 % with regard to the initial time and the loss of lignin was 2 % in average. In addition changes measured up in the rates of gas production to determine the effect of the solid culture and its lignocellulosic complexes more the treatment with Ca (OH)₂ in freshly and dry. The treatment of sorghum straw with *F. fomentarius* EUM1 and *P. sapidus* decreased the rates of gas production, on the other hand the treatment only with Ca (OH)₂ produced better volume of gas. The combination of both treatments did not have synergy and decreased the rate of gas production and digestibility. The treatment with fungi increased the biomass and the microbial adherence topic important in the nutrition of ruminants. The treatment with Ca (OH)₂ improves the straw but the solid culture provides probiotic components or nutrients that increase the ruminal microbiota.

Key words: solid culture, *Pleurotus sapidus*, *Fomes fomentarius*, gas production, sorghum straw

INTRODUCCIÓN GENERAL

La búsqueda de estrategias para un máximo aprovechamiento de los esquilmos agrícolas en países en desarrollo, con recursos naturales en deterioro y una población insatisfecha en sus necesidades agroalimentarias, es un problema a resolver mediante la investigación científica. Los esquilmos agrícolas son utilizados en la alimentación de especies pecuarias como complemento a las necesidades nutricionales que no satisfacen ingredientes energéticos como el sorgo, la soya y otros, cuyo costo es alto. Las alternativas biotecnológicas permiten utilizar subproductos con mayor eficiencia, sin daño al ambiente, inocuidad y beneficios superiores así como degradar parcialmente algunos de sus componentes. Las células vegetales de los esquilmos están constituidas mayormente por fibra y algunos de sus polisacáridos no son degradables por las enzimas de los rumiantes. Nutricionalmente la fibra se define como una entidad química heterogénea, constituida por celulosa, hemicelulosa y lignina, además de minerales y otros compuestos (Van Soest, 1994). La concentración de fibra incrementa a medida que la planta madura, es la fracción menos degradable del alimento, pero los rumiantes pueden utilizar estos componentes debido al rumen que es un ecosistema fibrolítico anaerobio (Weiss, 1993; Mertens, 1997). La fibra en su fracción neutro detergente determina la digestibilidad de un forraje y constituye de 30 a 80% de la materia orgánica; el remanente son componentes celulares completamente digestibles (Bayley y Ulyatt, 1970; Weiss, 1993; Nussio *et al.*, 2000). Otro factor que limita de manera directa la digestibilidad es la lignina, por sus enlaces químicos altamente estables y la toxicidad que puede crear al ambiente ruminal (Chesson y Forsberg, 1988; Jung y Deetz, 1993). Diferentes estrategias se han probado *in vitro* e *in*

vivo para mejorar o transformar la composición de esquilmos agrícolas. Algunos tratamientos químicos y biológicos han demostrado ser eficientes, confiriendo al forraje lignificado una mejor digestibilidad, además de agregar algunos componentes que le dan un mayor valor nutricional. Así los hongos de la pudrición blanca son organismos claves en el ciclo del carbono y adquieren importancia por la modificación de las macroestructuras lignocelulósicas (Hammel, 1997). Conocer al microorganismo adecuado con especificidad sobre el sustrato a utilizar es un factor fundamental para el éxito o fracaso del tratamiento del forraje. En este estudio se evaluó el cultivo sólido de paja de sorgo con *Pleurotus sapidus* y *Fomes fomentarius* EUM1 y tratada con $\text{Ca}(\text{OH})_2$, para apreciar el efecto en la actividad enzimática (celulasas, xilanasas y lacasas) así como cambio del sustrato, la producción de gas y la desaparición de la materia seca con la técnica de producción de gas *in vitro*, producción de AGV y nitrógeno amoniacal.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar los cambios en la calidad nutritiva, producción de gas y desaparición de la materia seca *in vitro* de la paja de sorgo tratada con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ y *Pleurotus sapidus* o *Fomes fomentarius* EUM1 y medir la producción de celulasas, xilanasas y lacasas obtenidos del cultivo sólido

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la capacidad de invasión en paja de sorgo de los microorganismos lignocelulósicos *Pleurotus sapidus* y *Fomes fomentarius*. EUM1 en función de la velocidad de crecimiento radial y producción de biomasa.
- Evaluar tratamientos con y sin $\text{Ca}(\text{OH})_2$ en la calidad nutritiva de la paja, en cultivo sólido con los hongos *Pleurotus sapidus* y *Fomes fomentarius* EUM1.
- Evaluar la influencia del tratamiento con y sin $\text{Ca}(\text{OH})_2$ sobre la actividad enzimática (celulasas, xilanasas y lacasas) de los hongos *Pleurotus sapidus* y *Fomes fomentarius* EUM1.
- Evaluar la producción de gas y desaparición de la materia seca *in vitro* del cultivo sólido con los hongos *Pleurotus sapidus* o *Fomes fomentarius* EUM1.

HIPÓTESIS

La inoculación de los hongos *Fomes fomentarius* EUM1 y *Pleurotus sapidus* en paja de sorgo pre-tratada con hidróxido de calcio $\text{Ca}(\text{OH})_2$, induce la formación de complejos enzimáticos lignino-celulolíticos, que mejoran la calidad nutritiva del

subproducto agrícola, la producción de gas *in vitro*, variables fermentativas y aumenta la desaparición *in vitro* de la fibra.

CAPITULO I

REVISIÓN DE LA LITERATURA

El uso de residuos agrícolas en la alimentación de rumiantes.

Los rumiantes poseen un microbiota ruminal que les permite aprovechar componentes de la pared celular vegetal, como la celulosa o el nitrógeno no proteico, pero tiene limitaciones que se pueden minimizar con el uso de tratamientos químicos, físicos o biológicos. Los residuos agrícolas se obtienen de la producción de leguminosas y cereales, resultando en mayor porcentaje tallos y hojas tras de un proceso de secado (Cajal, 1986). En México se utilizan una gran variedad de esquilmos agrícolas en la producción pecuaria, como los rastrojos de maíz, sorgo, cebada, avena, trigo entre otros. La característica compartida es que debido al proceso de maduración el contenido de lignina aumenta, siendo esto uno de los factores de mayor importancia de la merma en la digestibilidad de estos forrajes; además de la disminución en la proporción tallo hoja (Hogan et al., 1969; Hatfield, 1993). La madurez de los forrajes y por tanto su disminución cualitativa está relacionada con la lignificación de las paredes primaria y secundaria del tejido vascular y del esclerénquima (Grabber, 2005). Entonces, el valor nutritivo de un forraje está directamente relacionado con la proporción de constituyentes de la pared celular. La productividad de los rumiantes que consumen forrajes de baja calidad está determinada en gran medida por la ingesta voluntaria y la digestibilidad.

La producción nacional de sorgo

La producción de este insumo está orientada a la producción de grano que se utiliza en mayor medida como fuente energética en la nutrición de especies pecuarias. Una pequeña parte se siembra como fuente de materia vegetal usado, en la alimentación de rumiantes. En el 2007 la superficie sembrada de sorgo fue 1, 868, 973 ha con un rendimiento promedio de 3.5 t grano ha⁻¹. El estado con mayor superficie de hectáreas sembradas es Tamaulipas seguido de Sinaloa y Guanajuato (SIAP, 2007). Una vez cosechado el grano se deja la parte vegetal (tallos y hojas) se seca, se corta y es empacada.

Composición de la pared celular de forrajes

La pared celular de las plantas está constituida de microfibrillas de celulosa, inmersa en una matriz amorfa compuesta de polisacáridos no celulósicos (hemicelulosa), pectinas, proteínas y lignina (Lam *et al.*, 1990). La celulosa es el carbohidrato más abundante en la pared celular de las plantas (McDougall *et al.*, 1993; Weimer, 1996). La hemicelulosa es un heteropolisacárido cuya función es aglutinar las fibras cristalinas de celulosa, dando consistencia a la pared celular. Los componentes de esta fracción son aldopentosas (xilosa y arabinosa), aldo y cetohechosas (glucosa, galactosa, manosa, 6-deoxihexosas con ramnosa y fructosa) y ácidos urónicos (glucorónico, galacturónico y 4-oximetil galacturónico), los cuales se unen entre sí mediante enlaces β ; puede ser removida por sustancias álcalis o pérdida en agua, esta fracción de la pared celular es remanente después de remoción de celulosa y pectinas, (Timell, 1964; Himmelsbach, 1993; Ralph y Helm, 1993;). Después de la celulosa y

hemicelulosa, la lignina es el constituyente más común en la pared celular de los forrajes. Es un compuesto polifenólico conformado por derivados del fenilpropano (ácido cumárico, ferúlico, sinápico y los alcoholes cumaril, coniferil y sinapil), forma enlaces éster con la celulosa y hemicelulosa, lo que dificulta su desdoblamiento (Amjed *et al.*, 1992). Es considerada responsable de la baja degradación ruminal de la fibra (Van Soest, 1963b; Ford, 1978; Jung y Vogel, 1986; Jung y Deetz, 1993). El ácido p-cumárico es el componente con mayor influencia en la degradación de la fibra (Buxton, 1989; Fritz *et al.*, 1990; Gabrielsen *et al.*, 1990). Para cuantificar nutrientes en los forrajes se usan distintas técnicas. De acuerdo con el método utilizado para su cuantificación, las fracciones de carbohidratos estructurales, reciben diferentes denominaciones: fibra total, fibra insoluble en detergente neutro (FDN) y fibra insoluble en detergente ácido (FDA) (Mertens, 1992). La FDN está constituida por celulosa, hemicelulosa y lignina, menores cantidades de proteína y minerales (Bayley y Ulyatt, 1970; Weiss, 1993; Nussio *et al.*, 2000). La FDA representa los constituyentes de la pared celular solubilizados en soluciones detergentes ácidas y está constituida por celulosa, lignina, restos de minerales o cenizas insolubles, compuestos nitrogenados insolubles y cutina (Van Soest, 1963a; Van Soest *et al.* 1991; Varga *et al.*, 1998). La importancia de las fracciones de FDN y FDA es que se utilizan en la valoración de los forrajes y cuantifican la fibra.

Tratamientos químicos y biológicos del forraje

La digestión de residuos agrícolas en los rumiantes está limitada por la celulosa cristalina en asociación con otros carbohidratos estructurales y lignina (Morris and Bacon, 1977; Scalbert *et al.*, 1985). Además, los grupos acetyl de la hemicelulosa son

otro factor de suma importancia que limita la hidrólisis enzimática (Gould, 1984; Kong *et al.*, 1992). Existen procesos de hidrólisis alcalina de materiales lignocelulósicos que son conocidos desde hace tiempo, cuya finalidad no es la completa degradación del material lignocelulósico sino la transformación y modificación su estructura física (Silva y Ørskov E R 1988; Sundstøl y Coxworth, 1984). La acción de los álcalis produce un esponjamiento e hidrolizado de la celulosa provocando la pérdida parcial de su fracción cristalina, transformándola en celulosa amorfa, mucho más vulnerable. También se produce un efecto de saponificación de ésteres formados entre ácidos y urónidos de la hemicelulosa, la cual está asociada a cadenas de xilanos y hay pérdida de los grupos acetilo (Tarkow, 1969; Fan, 1980). Todo lo cual la hace mas accesible a la acción de otros agentes hidrolíticos.

Tratamientos químicos con hidróxido de sodio, amonio, calcio y urea mejoran el valor nutritivo de algunas pajas (Owen *et al.*, 1984). El hidróxido de calcio ha sido utilizado para incrementar la digestibilidad *in vivo*, *in vitro* y enzimática. Comparado con el hidróxido de sodio, urea y amonio se demostró que no hay efectos adversos en el animal por el tratamiento de las pajas, ya que mucho del calcio adicional es excretado por las heces. El tratamiento con hidróxido de sodio y amonio en esquilmos agrícolas ha sido extensamente probado y se han establecido diversas condiciones de tratamiento (Sundstol y Coxworth, 1984). Gandi *et al* (1997) trataron paja de sorgo y tabaco con hidróxido de calcio y observaron que la paja de sorgo tenía una alta digestibilidad después del tratamiento y esta fue similar a la obtenida con el hidróxido de sodio. También observaron que la hemicelulosa es el componente de mayor remoción en el tratamiento con hidróxido de calcio, mientras que la celulosa y la lignina

no mostraron un decremento significativo. El tratamiento con hidróxido de calcio (cal) mostró en comparación con el hidróxido de sodio, tener un menor costo y mayor seguridad para quien lo utiliza. En paja de trigo tratada con una solución de hidróxido de calcio al 5 % las paredes celulares fueron solubilizadas, y hubo una reducción de FDN, hemicelulosa y materia orgánica, pero la proteína total no cambió; además, aumentó la desaparición *in vitro* de la materia orgánica (Siroi *et al.*, 1998). Una alta digestibilidad de la materia orgánica confirma algunos resultados que sugieren cambios en la estructura de la pared celular y la modificación de enlaces ester entre lignina y carbohidratos estructurales (Tarkow and Feist, 1969; Klopfenstein, 1978; Paterson *et al.*, 1980; Sharma, 1987; Zaman y Owen, 1995).

Las investigaciones con tratamientos biológicos se orientan hacia la deslignificación de distintas pajas, utilizando hongos de la pudrición blanca, donde se obtienen sustratos para la alimentación animal, azúcares o etanol mediante el metabolismo enzimático. Los basidiomicetos ligninolíticos son capaces de causar cambios específicos en el contenido de lignina y su estructura. Dorado *et al.* (1999) utilizaron cuatro cepas de hongos de la pudrición blanca para estudiar el efecto en los cambios en la composición en paja de trigo. La mayor pérdida de peso la logró el hongo *Phanerochaete chrysosporium*, el cual degradó el sustrato en 15 días de crecimiento, además encontraron que para las especies estudiadas el periodo óptimo de fermentación es de 15 a 30 días, resultados que coincidieron con otros reportes. Además en 30 días de incubación *Pleurotus eryngii* mostró una degradación selectiva de lignina junto con *Ceriporiopsis subvermispora* a. Pero en general la cantidad original

de lignina contenida en la paja (19 %) se redujo por los tratamientos fúngicos hasta valores entre 12 % y 15 % después de transcurrido el periodo de fermentación.

Enzimas fibrolíticas exógenas

Las enzimas son catalizadores biológicos que aceleran la actividad química en las células. La propiedad fundamental de una enzima es aumentar la velocidad de una reacción, por esto gran parte de los esfuerzos se centran en el estudio de las enzimas ya que su uso doméstico o industrial presenta varias aplicaciones y su mercado asciende a centenares de millones de dólares anualmente en todo el mundo (Conn *et al.*, 1996). Se han desarrollado estrategias para aumentar la disponibilidad de nutrientes y mejorar las características de los ingredientes dietarios para lograr mejores rendimientos y productividad. Una estrategia que ha tomado relevancia en años recientes es el uso de enzimas fibrolíticas, que han mostrado un uso potencial para mejorar la utilización de los forrajes por los rumiantes, particularmente aquellos con altos contenidos de fibra (Beauchemin *et al.*, 2004) sin embargo, las enzimas comerciales por lo general no son puras y contienen actividades secundarias e inclusive actividad proteolítica.

El uso de enzimas exógenas en la alimentación de rumiantes ha incrementado la utilización del forraje, mejorando la eficiencia productiva y reduciendo la excreción de nutrientes (Beauchemin *et al.*, 2003). Las primeras experiencias respecto a los efectos de la adición de enzimas exógenas se evaluaron sobre la producción de leche y con forrajes de alta calidad (Chen *et al.*, 1995). Además de su acción directa, los compuestos enzimáticos fibrolíticos pueden coadyuvar indirectamente en la

degradación ruminal de la fibra de diferentes maneras: exponen sitios de adhesión adicionales sobre la superficie del alimento, lo cual facilita la colonización y como consecuencia incrementan la tasa de degradación de la fibra (McCallister *et al.*, 1990; Morgavi, 2000), y se reduce el flujo duodenal de FDN (Murillo *et al.*, 2001; Sutton *et al.*, 2003). Desdoblan carbohidratos estructurales previo a la ingestión (predigestión), aumentando la degradación ruminal de la fibra (Mandebvu *et al.*, 1998; Bowman *et al.*, 2003). Parte de la variabilidad de la acción de diversas enzimas se debe su especificidad de actividad específica la cual puede variar ampliamente dependiendo del tipo de microorganismo, sustrato de crecimiento y condiciones de cultivo empleadas (Considine y Coughlan, 1989; Gashe, 1992). Las enzimas exógenas o mezclas comerciales se obtienen principalmente de hongos y levaduras aeróbicas principalmente de los géneros bacterianos, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus faecium* y los hongos *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma sp.* y *Sacharomyces cerevisiae*. Una desventaja en la utilización de estas enzimas en los forrajes es que los productos comerciales son mezclas de diferentes enzimas con diferentes actividades enzimáticas y son producidos en sustratos que no necesariamente son los mismos de destino. No es posible todavía predecir con efectividad la acción de los productos enzimáticos para rumiantes basándose en su actividad enzimática (Colombatto *et al.*, 2003a).

Estabilidad y degradación de las enzimas fibrolíticas exógenas en rumen

La manipulación del ambiente ruminal puede hacerse por medio de suplementos alimenticios a base de microorganismos vivos que intervienen en forma benéfica mejorando algunas condiciones del rumen (Fuller, 1986). Los microorganismos vivos y

sus medios de cultivo se han usado como aditivos alimenticios, particularmente *Aspergillus oryzae* y *Saccharomyces cerevisiae* (Newbold, 1990a.; Scott y Nisbet, 1992; Wallace, 1994). Para resistir la acción destructiva de los microorganismos ruminales, las enzimas fibrolíticas son protegidas mediante glucosilación. Durante el proceso de la glucosilación se produce la unión de monosacáridos u oligosacáridos a un aminoácido de la enzima; este complejo carbohidrato-enzima, al parecer, es más resistente a la proteólisis ruminal de la enzima (Mackie y White, 1990; Chesson, 1993; Hristov *et al.*, 1998a, b; Morgavi *et al.*, 2001).

En un experimento realizado por Hristov *et al.* (1998), se midió la proteólisis que sufrían dos preparados enzimáticos y se observó que la actividad endoglucanasa y xilanasas pueden resistir a la degradación microbiana en el rumen. También Fontes *et al.*, (1995) mostraron que las xilanasas provenientes de microorganismos mesófilos y termófilos resisten la proteólisis de el rumen. Cuando estas enzimas se aplican directamente en el rumen aumenta la actividad endoglucanasa, xilanasas y β -glucanasa del fluido ruminal. Cuando estas enzimas se agregan directamente al rumen conservan su actividad por un periodo de tiempo comparativamente mayor y como resultado su impacto en la degradación de polisacáridos en el rumen puede ser significativa. Además, las xilanasas escapan en mayor medida a la degradación retículo ruminal y muestran una gran actividad en la digestión duodenal. Lo anterior sugiere que las preparaciones no solo actúan en los componentes dietarios si no que afectan la utilización de nutrientes en el intestino delgado de rumiantes. Según Beauchemin *et al.* (1999), la aplicación de enzimas al alimento en estado seco aumenta la unión de la enzima con el sustrato (alimento); esta fusión (enzima + sustrato) aumenta la

resistencia de la enzima a la proteólisis y prolonga su tiempo de residencia activa en el rumen.

Hongos productores de complejos enzimáticos fibrolíticos

Los basidiomicetos son conocidos como eficientes degradadores de lignina que son usados para el tratamiento de pajas. Estos microorganismos poseen diferentes complejos enzimáticos ligninocelulolíticos y tiene patrones similares de transformación, pero no iguales. Muchos de ellos producen peroxidasas dependientes de Mg, las cuales participan de manera muy importante en la modificación de la estructura de la lignina, causando la formación de productos solubles en agua (Pérez y Jeffries, 1990). La solubilización va acompañada de formación de moléculas de bajo peso (Hofrichter *et al.*, 1999). Dorado *et al.* (1999) al estudiar el cultivo sólido con cuatro especies de hongos de la pudrición blanca encontraron que el extracto enzimático se relaciona con el proceso de degradación del sustrato lignocelulósico, el análisis de compuestos solubles en agua mostró dos fases de degradación (0-15 días y 16-60 días) difiriendo en la composición y en los patrones de la fracción soluble en agua. En la fermentación temprana la cantidad de productos solubles en agua decrecimiento obviamente a la par con su utilización por el hongo, mientras que al final de la incubación los compuestos solubles en agua incluyendo carbohidratos solubles y fenoles se acumularon de gran manera en el sustrato de paja. *Pleurotus eryngii* difirió de los otros hongos pues el cumulo de compuestos solubles en el extracto se dio durante el todo el periodo de fermentación. Sonia *et al.*, (2005) variaron las fuentes carbono con un cultivo de *Thermomyces lanuginosus* para producir xilanasas, la paja de sorgo mostró ser la fuente mas eficiente para inducir una actividad máxima de xilanasas en comparación

con la paja de maíz, paja de trigo y paja de avena. En otros estudios se menciona que los sustratos de gramíneas contienen arabinosilanos los cuales pueden inducir la actividad xilanasica. Además las diferencias encontradas se debieron a varios factores, como la naturaleza de la hemicelulosa contenida en la paja de sorgo, la presencia de algunos nutrientes (activadores) en la fuente de carbón, superficie, tamaño de poro y facilidad de obtención del carbón (Gomes *et al.*, 1993). El microorganismo presentó un inusual crecimiento de las hifas, que se asocian a la secreción de xilanasas, las cuales no se observaron cuando el microorganismo creció con otras fuentes de carbono. Algunos metales pesados con cobre, hierro, manganeso, molibdeno, zinc y níquel son esenciales para el crecimiento fúngico y pueden actuar como cofactores enzimáticos induciendo la actividad enzimática cuando son agregados en niveles conocidos, mientras que pueden ser tóxicos cuando están presentes en exceso (Baldrian, 2003).

Pleurotus ostreatus

Los hongos del género *Pleurotus*, del orden agaricales, son un grupo distribuido ampliamente en la naturaleza, crecen en sustratos vegetales verdes o secos, los últimos generalmente pobres en nutrientes y vitaminas (Zadrazil, 1978). Algunas especies tienen importancia económica debido a su cultivo comercial, y a las características organolépticas (Chang, 1984). Es un hongo saprófito que degrada madera para su cultivo el sustrato es fragmentado parcialmente mezclado con agua. La composición química de *P. ostreatus* muestra grandes cantidades de aminoácidos esenciales (Manzi *et al.*, 1999), excepto triptófano y la cantidad de su proteína es 7% a 15%. Durante el crecimiento tolera niveles relativamente altos de sales pero el desarrollo del cuerpo fructífero es mejor a pH neutro o ligeramente ácido, entre 6 y 7

(Kües y Liu, 2000). Se han descrito diversas sustancias con actividad inductora de fructificación en basidiomicetos, entre las que se encuentran el monofosfato de adenosina (AMP) y AMP cíclico (cAMP) (Uno e Ishikawa, 1971; 1982), fenoloxidasas (Leonard, 1971; Wessels, 1993a), los cerebrosidos de distintas fuentes, los esterres de sacarosa y ácidos grasos surfactantes, el indol y el ácido antranílico y otras sustancias que aun se desconocen.

Moreno *et al.* (1999) trataron paja de trigo con *P. ostreatus* y urea para la alimentación de cabritos, no observaron cambios en la digestibilidad de la fibra detergente neutra, el consumo de materia seca, ganancia de peso o eficiencia alimenticia. Por otra parte, Aceves *et al.* (1997) no encontraron diferencias significativas en los tratamientos de la FDN, conversión alimenticia, ganancia diaria de peso y la desaparición de la materia seca *in vitro* fue menor en la paja tratada con *P. ostreatus*, que en la no tratada. Gurrolla *et al.* (2001) inocularon *P. ostreatus* sobre rastrojo de maíz, el hongo incrementó el contenido de proteína cruda durante el proceso de fermentación en sustrato sólido (FSS), el enriquecimiento fue al inicio del periodo de fructificación, pero este disminuyó a medida que avanzó el proceso fermentativo.

***Fomes fomentarius* EUM1**

Una de las propiedades de los hongos del género *Fomes* sp. y *Trametes* sp. es la degradación de la lignina para facilitar la digestión de la celulosa (Henzkill *et al.*, 1998) y entre las enzimas que emplean estos hongos para ese fin se encuentran las lacasas. *Trametes* sp. es considerado uno de los hongos más eficientes degradadores de lignina, pues produce altas concentraciones de lacasas, puede oxidar a la lignina por

medio de la acción de diversos mediadores (Jönsson *et al.*, 1995, Young *et al.*, 1995). y las lacasas que produce tienen un gran similitud con las de *Fomes fomentarius* En el género *Trametes* y *Fomes fomentarius* la gran mayoría de sus especies son mesofílicas debido a que sus temperaturas óptimas de crecimiento se encuentran entre 20 y 40°C y que muy pocas especies son termotolerantes, es decir que sus temperaturas de crecimiento son de 50°C, aunque también pueden crecer a 20 °C (Madigan *et al.*, 1998; Padilla, 2004). Márquez *et al.* (2008), al evaluar a *Trametes sp. EUM1* como fuente de enzimas fibrolíticas en bagazo de caña encontró que la actividad enzimática de xilanasas y celulasas fue alta (1073.8 UI mg⁻¹ y 69.16 UI mg⁻¹) en los días 14 y 19 de fermentación sólida mostrando gran potencial en aplicaciones biotecnológicas en alimentación de rumiantes.

Cultivo sólido

El cultivo sólido (CS) es definido como un proceso fermentativo en el cual material no soluble, actúa como soporte físico con la capacidad de absorber líquido sin permitir su libre flujo (Pandey, 1992). El bajo contenido de humedad permite que la fermentación pueda ser llevada a cabo por un limitado número de microorganismos, principalmente levaduras y hongos, pero algunas bacterias también pueden ser utilizadas (Pandey, Soccol y Mitchell, 2000a). La fermentación entonces permite obtener una gran cantidad de metabolitos que pueden ser incorporados como aditivos, suplementos (antioxidantes, saborizantes, colorantes, conservadores, edulcorantes) o catalizadores de reacciones como las enzimas (Rodríguez, 2006). El tamaño de partícula es un factor importante ya que puede modificar de manera sustancial el perfil de actividad. Como ejemplo, Sonia *et al.* (2005) manejaron tres tamaños de partícula

(0.5-1.0, 2.0-3.0, 5.0-7.0 mm) de paja de sorgo para producción de xilanasas; la máxima actividad xilanasas fue con el tamaño de partícula de 2.0-3.0 mm (26, 121 U/gss) y la menor actividad fue con el tamaño de partícula de 5.0-7.0 mm. El tamaño de partícula encontrado proporcionó al microorganismo con suficiente superficie de invasión y aeración. Para el menor tamaño de partícula, la disminución en la actividad enzimática es atribuible al incremento del tamaño o invasión micelial alrededor del sustrato, lo que deriva en un decremento en la porosidad con baja difusión de oxígeno. Membrillo *et al.* (2008) usaron *P. ostreatus* (IE-8 y CP-50), distintos tamaños de partícula y una fuente de nitrógeno adicional en bagazo de caña y observaron que la adición de nitrógeno incrementó la cantidad de proteína en comparación con los tratamientos sin nitrógeno. Además la producción de enzimas es susceptible de ser modificada por la presencia de fuentes de nitrógeno inorgánico, el resultado observado por el incremento en la producción de enzimas xilanasas. Al mismo tiempo observaron que la actividad enzimática de lacasas no está relacionada con la adición de nitrógeno inorgánico, pero sí con el tamaño de partícula de el sustrato. El agua además tiene una actividad relevante en el crecimiento de los microorganismos. El contenido de agua óptimo para sustratos de madera es de 35-60% y para otros sustratos de 60% a 80%. Las temperaturas más bajas reflejan la demanda de oxígeno de los hongos en el sustrato balanceados contra sus requerimientos de agua (Scrase y Elliot, 1998; Ohga, 1999). El cultivo en medio sólido mejora algunas características nutricionales de esquilmos agrícolas o materiales vegetales de deficiente calidad, cuando son utilizados como sustratos, Así Peláez (2006), usó caña integral ensilada suplementada con cultivos sólidos con *Pleurotus sapidus* para observar la producción de gas *in vitro*,

observó que el fermento del día 24, aumentó la producción total de gas, mejoró la desaparición de la materia seca *in vitro* de la caña integral y mejoró las variables fermentativas del ensilaje, con lo que se corrobora que hay una mejora en la calidad nutritiva de productos agrícolas. La caña de azúcar promovió el crecimiento del hongo y mostró ser un sustrato bueno por sus características nutritivas y estructurales. También este proceso puede conferir compuestos nutricionales a los esquilmos como lo mostró Meneses (1998), quien realizó la caracterización de un producto de un cultivo sólido con pasta de copra para ver su actividad prebiótica, y encontró que los extractos líquidos o acuosos son responsables de la actividad prebiótica, elucidando azúcares implicados en dicha actividad. El extracto favoreció la producción de ácido acético, seguido de la producción de ácido propiónico de la bacteria anaerobia *Megasphaera elsdenii*.

Producción de gas *in vitro* de distintos esquilmos agrícolas

La técnica de producción de gas *in vitro* es un método utilizado para examinar el efecto de aditivos alimenticios en dietas para rumiantes. Las enzimas fibrolíticas exógenas incrementaron la tasa y extensión de producción de gas proveniente de la fermentación de sustratos (celulosa microcristalina, xilanos y una mezcla de ambos); pero los xilanos se fermentaron más rápidamente, evidenciado por la reducción de la fase Lag y el aumento en la tasa fraccional de producción de gas (Colombatto *et al.*, 2003a). Carro *et al.* (2005) utilizaron blancos con fluido ruminal en solución amortiguadora con y sin enzima para ajustar las lecturas de producción de gas; ellos concluyeron que no hay diferencia entre ambos sobre la producción de gas debido al efecto de las enzimas. Con respecto al uso de enzimas los resultados de diversos

experimentos *in vitro* sugieren que las enzimas disminuyen la concentración de FDN. Avellaneda *et al.* (2003) al añadir enzimas fibrolíticas al heno de pasto guinea (*Panicum maximum*) a dos edades de corte (35 y 90 días) y diferentes tiempos de incubación (3, 6, 12, 24, 48 y 72 horas), no observaron un incremento adicional en la desaparición de la materia seca *in vitro* (DIVMS); contrariamente, a pesar que los resultados fueron variables hubo un aumento significativo en la DIVFDN hasta las 72 horas de incubación. Al agregar una enzima comercial al forraje seco, la DIVMS y la DIVFDN (48 horas) fueron mayores con relación al mismo forraje en estado fresco y al parcialmente rehidratado (41 % MS), lo cual indicaría que el contenido acuoso de un ingrediente es un factor importante a considerar (Feng *et al.*, 1996). Pinos *et al.* (2002a) observaron mayor desaparición *in vitro* de la MS (DIVMS) y FDN en forrajes de alfalfa y ballico, cuando utilizaron enzimas exógenas además el desdoblamiento de los carbohidratos estructurales en la alfalfa con y sin enzima fue menor que en el ballico, debido a que la pared celular de las leguminosas está mas lignificada, lo cual reduce su digestibilidad (Van Soest, 1982). En un trabajo realizado por Chen *et al.* (2007) se observó que al tratar paja de arroz con hidróxido de sodio y bicarbonato de amonio la producción de gas acumulado *in vitro* es más alta para la paja tratada que para la paja sin tratar; el tratamiento con mayor producción de gas fue el de hidróxido de sodio en comparación con el tratamiento con bicarbonato de amonio. Para los ácidos grasos volátiles las concentraciones fueron mayores en la paja tratada que en la paja sin tratar, mientras que el acetato y el propionato mostraron concentraciones altas y estadísticamente significativas en el tratamiento con hidróxido de sodio. Las concentraciones de butirato no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. Ellos

concluyen que los tratamientos químicos incrementan la producción de gas en forrajes de baja calidad y el tratamiento químico utilizado aumenta la concentración de ácidos grasos volátiles el cual está pareado con el incremento en la producción de gas.

LITERATURA CITADA

- Aceves, O. J., Ortega C. M. E, Mendoza M. G. 1997. Evaluación nutricional de la paja de trigo tratada con el hongo *P. ostreatus* en ovinos. Tesis de maestría. Colegio de Posgraduados. Montecillos. México.
- Amjed, H., H. G. Joung and J. D. Donker. 1992. Effect of alkali hydrogen peroxide treatment on cell wall composition and digestion kinetics of sugar cane residues and wheat straw. *Journal of Animal Science*. 70:2877-2884.
- Avellaneda-Cevallos, J. H., S. S. González, J. M. Pinos-Rodríguez, A. Hernández, J. R. Bárcena, M. Cobos, y D. Hernández-Sánchez. 2003. Effect of exogenous fibrolytic enzymes (Fibrozyme) on dry matter and cell wall *in vitro* digestibility of Guinea grass (*Panicum maximum*, Var. Mombasa) hay. *Journal of Animal Science*. Vol. 86 (Supp. 1): 334.
- Baldrian, P., 2003. Interactions of heavy metals with white-rot fungi. *Enzyme and Microbial Technology* 32, 78–91.
- Bailey, R. W., M. J. Ulyatt. 1970. Pasture quality and ruminant nutrition: II Carbohydrate and lignin composition of detergent extracted residues from pasture grasses and legumes. *N. Z. Journal of Agricultural Research*. 13, 591-596.
- Beauchemin, K. A., W. Z. Yang, and L. M. Rode. 1999. Effects of grain source and enzyme additive on site and extent of nutrient digestion in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 82: 378 – 390.
- Beauchemin, K. A., D. Colombatto, D. P. Morgavi, W. Z. Yang. 2003. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. *Journal of Animal Science*. 81 (E. Suppl. 2), E37-E47).
- Beauchemin, K. A., D. Collombatto and D. P. Morgavi. 2004. A rationales for the development of feed enzyme products for ruminants. *Canadian Journal of Animal Science* 84: 23-26.

- Bowman, G. R., K. A. Beauchemin, and J. A. Shelford. 2003. Fibrolytic enzymes and parity effects on feeding behaviour, salivation, and ruminal pH of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 86:565-575.
- Buxton, D. R. 1989. *In vitro* digestion kinetics of temperate perennial forage legume and grass stems. *Crop Science*. 29:213-219.
- Cajal, B. C. 1986. Pre tratamientos alcalinos de residuos fibrosos y su valor nutritivo para rumiantes, AMENA, México, pp. 61-70.
- Carro, M. D., M. J. Ranilla and M. L. Tejido. 2005. Using an *in vitro* gas production technique to examine feed additives: effects of correcting values for different blanks. *Animal Feed Science and Technology* 123-124: 173-184.
- Chang, S.T.1984 Conversion of agricultural and industrial waste into fungal protein. *Conservation Recycling Z* 175-180.
- Chen, X.L. 2007 Effects of chemical treatments of rice straw on rumen fermentation characteristics, fibrolytic enzyme activities and populations of liquid- and solid-associated ruminal microbes *in vitro*. *Animal Feed Science and Technology*. doi:10.1016/j.anifeedsci.2007.04.006.
- Chen, S.C., Santos, F., Wu, Z., Swingle, R.S., 1995. Effect of enzyme treatment or steam-flaking of sorghum grain on lactation and digestion in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 78, 1721–1727.
- Chesson, A., Forsberg C. W., 1988. Polysaccharide degradation by rumen microorganisms. *In: The Rumen Microbial Ecosystem*. Hobson, P.H. (ed). Elsevier Applied Science. London, U.K. pp: 251-284.
- Chesson, A.1993. Feed enzymes. *Animal Feed Science Technology*. 45, 65-79
- Colombatto, D., F. L. Mould, M. K. Bhat, D. P. Morgavi, K. A. Beauchemin and E. Owen. 2003a. Influence of fibrolytic enzymes on the hydrolysis and fermentation of pure cellulose and xylan by mixed ruminal microorganisms *in vitro*. *Journal of Animal Science* 81, 1040-1050.

- Conn, E. E., Stumpf, P. K., Bruening, G and Doi R. H. 1996. Bioquímica Fundamental. Ed. Limusa, México d. F., 736 pp.
- Considine, P.J., M. P. Coughlan. 1989. Production of carbohydrate –hydrolyzing enzyme blends by solid-state fermentation. *In*: Coughlan, M. P. (Ed.) Enzyme systems for lignocelluloses degradation. Elsevier Applied Science, New York, NY, USA, pp. 273-281.
- Dorado,J., Almendros, G., Camarero, S., Martínez, A.T., Vares, T. and Hatakka, A. 1999. Transformation of wheat straw in the course of solid state fermentation by four ligninolytic basidiomycetes. *Enzyme and Microbial Technology* 25: 605-612
- Fan L.; Lee, H. y Beardmore, D. 1980. “Major chemical and physical features of cellulosic materials as substrate for enzymatic hydrolysis”. *Advances in Biochemical. Engineering.*, 14: 101-117.
- Feng, P., C. W. Hunt, G. T. Pritchard, and W. E. Julien. 1996. Effect of enzyme preparations on *in situ* and *in vitro* degradation and *in vivo* digestive characteristics of nature cool – season grass forage in beef steers. *Journal Animal Science*. 74:1349- 1357.
- Fontes, C. M. G. A., J. Hall, B. H. Hirst, G. P. Hazlewood, H. J. Gilbert. 1995. The resistance of cellulases and xilanses to proteolytic inactivation. *Applied Microbiology. Biotechnology*. 43, 52-57.
- Ford, C. W. 1978. Effect of partial delignification on the *in vitro* digestibility of cell wall polysaccharides in *Digitaria decumbens* (Pangola grass). *Australian Journal Agricultural Research*. 29:1157-1166.
- Fritz, J. O., K. J. Moore, and E. H. Jaster. 1990. Digestion kinetics and cell wall composition of brown midrib sorghum x sudan grass morphological components. *Crop Sci*. 30:213-219.
- Fuller, R.1986. Probiotics. *Journal of Applied Bacteriology Symp*. Suppl.15-75

- Gabrielsen, B. C., K. P. Vogel, B. E. Anderson, and J. K. Ward. 1990. Alkali-labile cell wall phenolics and forage quality in three switchgrasses selected for differing digestibility. *Crop Science*. 30:1313-1320.
- Gandi J, M. T. Holtzapple , A. Ferrer , F. M. Byers, N. D. Turner, M. Nagwani , Sushien Chang. 1997. Lime treatment of agricultural residues to improve rumen digestibility. *Animal Feed Science Technology* 68, 195-211.
- Gashe, B. A. 1992. Cellulase production and activity by *Trichoderma sp.* A-001. *Journal of Applied Bacteriology*. 73, 79-82.
- Gomes, J., Purkarthofer, H., Hyan, M., Kapplmu" ler, M., Sinner, M., Steiner, W., 1993. Production of high levels of cellulase-free xylanase by *Thermomyces lanuginosus* in laboratory scale and pilot scale using lignocellulosic materials. *Applied Microbiology. Biotechnology*. 39, 700-707.
- Gould, J. M. 1984. Alkaline peroxide delignification of agricultural residues to enhance enzymatic saccharification. *Biotechnology. Bioengineering*. 26, 46.
- Grabber, J.L. 2005. How do lignin composition, structures, and cross-linking affect degradability?. A review of cell wall model studies. *Crop Science*. 45, 820-831.
- Gurrolla M. R. 2001. Comportamiento y solubilidad de la proteína cruda de rastrojo de maíz inoculado con *Pleurotus ostreatus* a diferentes tiempos de compostado. Resumen IX congreso Nacional de biotecnología y bioingeniería 10-14 de Septiembre. Veracruz Ver. México.
- Hammel, K. E., 1997. Fungal degradation of lignin. *In: Cadisch G, Giller KE, (editors). Plant litter quality and decomposition. CAB-International; 33-46 p.*
- Hatfield, R. D. 1993. A comparison of the insoluble residues produced by the klason lignin and acid detergent lignin procedures. *Journal of Science Agricultural*. 65, 51.
- Heinzkill, M., Bech, L., Halkier, T., Schneider, P. y Anke, T. 1998. Characterization of laccases and peroxidases from wood-rotting fungi: (family *Coprinaceae*). *Applied and Environmental Microbiology*. 64. pp. 1601-1606.

- Himmelsbach, D. S. 1993. Structure of forage cell walls. *In: Forage cell wall structure and digestibility.* Jung, H. G., D. R. Buxton, R. D. Hatfield, and J. Ralph (eds.). ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI. pp: 271-283.
- Hristov, A. N., T. A. McAllister and K. J. Cheng. 1998b. Stability of exogenous polysaccharides – degrading enzymes in the rumen. *Animal Feed Science and Technology.* 76, 161-168.
- Hofrichter M., T. Vares, M. Kalsi, S. Galkin, K. Scheibner, W. Fritsche, A. Hatakka, 1999. Production of manganese peroxidase and organic acids and mineralization of ¹⁴C-labelled lignin (¹⁴C-DPH) during solid-state fermentation of wheat straw with the white-rot fungus *Nematoloma frowardii*, *Applied Environmental Microbiology.* 65,1864-1870.
- Hogan, J. P., Weston R. H., and Lindsay, J. R., 1969. The digestion the pasture plants by sheep. IV. The digestion de *Phalaris tuberosa* at the different stage of maturity. *Australian Journal. of Agricultural Research.* 20, 925-931.
- Hristov A.N., McAllister T. A. and Cheng. 1998a. Stability of exogenous polysaccharide-degrading enzyme in the rumen. *Animal Feed Science and technology* 76, 165-172.
- Hristov, A. N., McAllister, T. A. and Cheng, K. J. 1998b. Effect of dietary or abomasal supplementation of exogenous polysaccharide-degrading enzyme supplementation on rumen fermentation and nutrient digestibility. *Journal of Animal Science.* 76, 3146-3156.
- Jönsson, L., K. Sjöström, I. Häggström, and P.O. Nymann. 1995. Characterization of a laccase gene from the white-rot fungus *Trametes versicolor* and structural features of basidiomycete laccases. *Biochimcal. and Biophysical Acta* 1251, 210-215
- Jung, H. G., and . Deetz, D. A., 1993. Cell wall lignification and degradability. *In: Forage Cell Wall Structure and Digestibility.* Jung, H. G., D. R. Buxton, R. D. Hatfiel and J. Ralph (eds.).ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI. 315-339 p.

- Jung, H. G., and K. P. Vogel. 1986. Influence of lignin on digestibility of forage cell wall material. *Journal of Animal Science*. 62, 1703-1712.
- Klopfenstein, T.J., 1978. Chemical treatment of crop residues. *Journal of Animal Science*. 46, 841.
- Kong, S., Johnstone, D. L., Yonge, D. R., Petersen, J. N., and Brouns, T. M. 1992. Chromium distribution in subcellular components between fresh and starved subsurface bacterial consortium. *Biotechnol. Tech.* 6, 143–148.
- Kües U. y Y. Liu, 2000. Mini review: Fruiting body production in basidiomycetes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 54(2), 141-152.
- Lam, T.B.T., Iiyama, K. and Stone, B.A. 1990a. Primary and secondary walls of grasses and other forage plants, taxonomic and structural considerations. In "Microbial and Plant Opportunities to Improve Lignocellulose Utilization by Ruminants." eds. Akin, D.E., Ljungdahl, L.G., Wilson, J.R. and Harris, P.J., Elsevier, New York..43-69 p.
- Leonard, T.J. 1971; Phenoloxidase activity and fruiting body formation in *Schizophyllum commune*. *Journal of Bacteriology*, 106 162-167.
- Mackie R I and White B A. 1990. Recent advances in rumen microbial ecology and metabolism: Potential impact on nutrient output. *Journal of Dairy Science*, 73, 2971-2995.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. y Parker, J. 1998. *Biología de los microorganismos*. Prentice Hall Internacional. 8ª edición. México, D.F.
- Mandebvu, P., J. W. West, and R. E. Hartfield. 1998. Effect of treating bermudagrass forages at ensiling with fibrolytic enzymes or microbial inoculant on carbohydrate content of cell walls, concentrations of p-coumaric and ferulic acids, and *in situ* digestion. *Journal of Dairy Science*. 80,198-205.

- Manzi, P., Gambelli, L., Marconi, S., Vivanti, V., & Pizzoferrato, L., 1999. Nutrients in edible mushrooms: an interspecies comparative study. *Food Chemistry*, 65(4), 477–482.
- Márquez A T., Mendoza G., González S., Buntix S.E., Loera O., 2008. Fibrolytic activity of enzymes produced by *Trametes* sp. EUM1, *Pleurotus ostreatus* IE8 and *Aspergillus niger* AD96.4 in solid fermentation. *Interciencia* (32) 11, 780-785.
- McCallister, T. A., L. M. Rode, D. J. Major, K. J. Cheng and J. G. Buchanan-Smith. 1990. Effect of ruminal microbial colonization on cereal grain digestion. *Canadian Journal of Animal Science*. 70, 571-579.
- McDougall, G. J., J. W. Morrison, and D. Stewart. 1993. Plant fibers. Chemistry and processing for industrial use. *Journal of Science Food Agricultural*. 62,1-20 p.
- Membrillo I., C. Sanchez, M. Meneses, E. Favela, O. Loera. 2008. Effect of substrate particle size and additional nitrogen source on production of lignocellulolytic enzymes by *Pleurotus ostreatus* strains. *Bioresource Technology* (99) 7842-7847.
- Meneses M.M. 1998. Caracterización e identificación bioquímica de un producto de fermentación sólida, con actividad prebiótica. Tesis de Maestría. UAM-I. México D.F: 134 p
- Mertens, D. R. 1992. Análise da fibra e sua utilização na avaliação e formulação de rações. *In: Anais. do Simposio Internacional de Ruminantes. XXIX Reuniao anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. Lavras. MG. SBZ. 54-60 p.*
- Mertens, D. R., 1997. Creating a system for meeting the fiber requirements of dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 80, 1463-1481.
- Moreno S. J. R., Ortega C. M. E. y Gama R. B. 1999. Uso de paja de trigo tratada con el hongo *Pleurotus ostreatus* y urea en la alimentación de cabritos. Tesis de Maestría. Colegio de Posgraduados. Montecillos. México.
- Morgavi, D. P., Beauchemin K. A., Nsereko V. L., Rode L. M., Iwassa A. D., Yang W. Z., McCallister T. A., and Wang Y.. 2000. Synergy between ruminal fibrolytic enzymes

- and encimes from *Trichoderma longibrachiatum*. Journal of Dairy Science. 83,1310-1321.
- Morgavi, D. P., Beauchemin K. A., Nsereko V. L., Rode, L. M., McAllister T. A., Iwaasa A. D., Wang Y. and Yang W. Z. 2001. Resistance of feed enzymes to proteolytic inactivation by rumen microorganisms and gastrointestinal proteases. Journal of Animal Science. 79, 1621-1630.
- Morris, E. J. and Bacon J.S.D. 1977. The fate of acetyl groups and sugar components during the digestion of grass cell walls in sheep. Journal of Agricultural Science. (Camb.) 89:327.
- Murillo, M. O., Cruz J., Castro H. L., Sánchez F., Vásquez S. y Zinn R., 2001. Efecto de fibrozyme sobre la digestión ruminal y flujo post ruminal de la fracción fibra en dietas de bovinos de carne. Univ. Juárez de Durango. *In: Biotecnología en la Industria de la Alimentación Animal*, Vol.III. Alltech, México. 49-56 p.
- Newbold, C.J., Williams, P.E.V., McKain, N., Walker, A., and Wallace, R.J. 1990. The effects of yeast culture on yeast numbers and fermentation in the rumen of sheep. Proc. Nutr. Soc. 49, 47 A (Newbold, C.J.: Probiotics as feed additives in ruminant diets. 51st Minnesota Nutrition Conference, 102-118.
- Nussio, L. G., Lima, M. L., Matos, W. R., 2000. Caracterizacao e importancia da fibra na alimentacao de ruminantes. *In: Simposio Internacional sobre Producao de bovinos leiteros*. Carambei. 35-42 p:
- Ohga, S. 1999. Effect of water potential on the fruit body formation of *Lentinula edodes* in sawdust-based substrate. Journal of Wood Science. 45, 337-342.
- Owen, E., Klopfenstein, T.J., Urio, N., 1984. Treatment with other chemicals. In: Sundstol, F., Owen, E. (Eds.), *Straw and Other Fibrous By-Products as Feed*. Elsevier, Amsterdam, pp. 248-275.
- Padilla, Y., 2004. Presencia de hongos miceliales termotolerantes y termofílicos en el vertedero de lajas, Puerto rico, prestando especial interés a *Aspergillus*

- Fumigatus*. Tesis de Maestría. Universidad de Puerto rico. Reciento universitario de Mayagüez.
- Pandey, A., 1992. Recent process developments in solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, 27, 109-117.
- Pandey, A., Soccol, C. R., & Mitchell, D. 2000a. New developments in solid state fermentation: I—bioprocesses and products. *Process Biochemistry*, 35, 1153-1169.
- Paterson, J., Stock, R., Klopfenstein., T.J., 1980. Crop residues ± Calcium hydroxide treatment. *Nebraska Beef Cattle Report*, EC 80-218, pp. 21-23.
- Peláez A. A., Meneses M., Miranda R. L, Megias R. M., Barcena G. R., Loera O. 2008. Ventajas de la fermentación sólida con *Pleurotus sapidus* en ensilajes de caña de azúcar. *Archivos de Zootecnia*. 57(217): 25-33
- Pérez, J., Jeffries, T.W., 1992. Roles of manganese and organic acid chelators in regulating lignin degradation and biosynthesis of peroxidases by *Phanerochaete chrysosporium*, *Applied. Enviromental. Microbiology*. 58, 2402–2409.
- Pinos, J. M., González S. S., Mendoza G., Bárcena R. y Cobos M., 2002a. Efecto de enzimas fibrolíticas exógenas en la digestibilidad *in vitro* de la pared celular de heno de alfalfa (*Medicago sativa*) o de ballico (*Lolium perenne*). *Interciencia* 27 (1): 28 – 32.
- Ralph, J. and Helm R. F., 1993. Lignin/hidroxycinnamic acid/polysaccharide complex. Synthetic models for regiochemical characterization. *In: Forage Cell Wall Structure and Digestibility*. Jung, A.G., D.R. Buxton, R.D. Hastfield and J. Ralph (eds.). ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI. 201-246 p.
- Rodríguez, Z. 2006. Fermentación en estado sólido de la caña de azúcar con una fuente amilácea (*Ipomea batata*) Tesis en opción al grado científico de Dr. En Ciencias Veterinarias. Instituto de Ciencia Animal. La Habana. Cuba
- Scalbert, B. Monties, J-Y. Lallemand, E. Guittet and C. Rolando.1985, Ether linkage between phenolic acids and lignin fractions from wheat straw. *Phytochemistry* 24(6), 1359-1362.

- Scott A. M. and D. J. Nisbet. 1992 .Effect of Direct-fed microbials on rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*. 75 (6), 1736-1744
- Scrase, R. J. and Elliot, T. J., 1998. Biology and technology of mushroom culture. In wood, B. J. B. (ed) *Microbiology of fermented food*, vol 2, 2 nd. Blankie London. 543-584 p.
- Sharma, S.D. 1987. Development and evaluation of methods for treatment of rice straw with lime through modified Beckman Method. Ph.D. thesis, G.B. Pant University of Agriculture and Technology, Pantnagar, India.
- SIAP, 2007 http://www.siap.sagarpa.mx/ar_compec_avan.html. Consultado en noviembre de 2008.
- Silva, A. T and Ørskov E. R., 1988 Fiber digestion in the rumens of animals receiving hay, untreated or ammonia treated straw. *Animal Feed Science and Technology*. 19, 299-287.
- Sirohi S.K., S.N. Rai., 1998. Optimisation of treatment conditions of wheat straw with lime: Effect of concentration, moisture content and treatment time on chemical composition and in vitro digestibility. *Animal Feed Science and Technology* (74) 57-62.
- Sonia K.G., B.S. Chadha *, H.S. Saini., 2005. Sorghum straw for xylanase hyper-production by *Thermomyces lanuginosus* (D2W3) under solid-state fermentation *Bioresource Technology* 96 1561–1569.
- Sundstøl, F. and Coxworth, E. M., 1984 Ammonia treatment. In Sundstøl F and Owen E C (Eds.) *Straw and Other By-products as Feed*. Elsevier. Amsterdam. 196-247 p.
- Sutton, J. D., R. H. Phipps, D. E. Beever, D. J. Humphries, G. F. Hartnell, J. L. Vicini, and D. L. Hard. 2003. Effect of method of application of a fibrolytic enzyme production on digestive processes and milk production in Holstein-Friesian cows. *J. Dairy Sci*. 86:546-556.
- Tarkow, H., Feist, W.C., 1969. A mechanism for improving the digestibility of lignocellulosic materials with dilute alkali and liquid ammonia. *Am. Chemical. Society. Advances. Chem. Ser.* (95), 197-218.

- Timell, T. E. 1964. Wood hemicellulose: Part I. Adv. Carbohydrate Chemistry. 19:247-302.
- Uno I., e Ishikawa T., 1982. Biochemical and genetic studies on the initial events of fruit body formation. In well K. & Wells E.K; Basidium and Basidocarp: evolution, cytology, function and development. New York Spring Verlag: 113-123.
- Uno, I e Ishikawa T., 1971. Chemical and genetical control of induction of monokaryotic fruiting-bodies in *Coprinus macrorhizus*. Molecular and general genetics 113, 228-239.
- Van Soest, P. J. 1963a. Use of detergent in the analysis of fibrous feeds: preparation of fiber residues of low nitrogen content. A.O.A.C. 46:825.
- Van Soest, P. J. 1963b. A rapid method for the determination of fiber and lignin. ASSOC Offic. Analytical Chemists. 46:829-835.
- Van Soest P J. 1982. Nutritional ecology of the ruminant. Cornell University Press, Ithaca, NY, USA.
- Van Soest, P. J., J. B. Robertson, and B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. Journal Dairy Science. 74:3583-3592.
- Van Soest, P. J., 1994. Nutritional Ecology of the Ruminant. 2nd. Ed. Ithaca. Cornell University Press. 476 p.
- Varga, G. A., H. M. Dann, and V. A. Ishler. 1998. The use of fiber concentrations for ratio formulation. Journal of Dairy Science. 81, 3063-3074.
- Wallace R.J., 1994. Ruminal microbiology, biotechnology and ruminant nutrition: Progress and problems. Journal of Animal Science.72, 2992-3003.
- Weimer, P. J. 1996. Why don't ruminal bacteria digest cellulose faster. Journal of Dairy Science. 79, 1496-1502.

- Weiss, W. P., 1993. Predicting energy values of feeds. *Journal of Dairy Science*. 76, 1802-1993.
- Wessels, J.G.H. 1993^a. Fruiting in the higher fungi. *Advances in Microbial Physiology*. 34, 147-202.
- Young, S. A.; Guikema, J. A., White, F. F., Leach, J. E., 1995 Rice cationic peroxidase accumulates in xylem vessels during incompatible interaction with *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Plant Physiology*, Washington 4 (107), 1333-1341 p.
- Zadrazil, F., 1978. Cultivation of *Pleurotus ostreatus*. In S. T Chang, W. A. Hayes(Eds): *The biology and cultivation of edible Mushrooms* (). London: Academic Press. 521-557 p.
- Zaman, M.S., Owen, E., 1995. The effect of calcium hydroxide and urea treatment of barley straw on chemical composition and digestibility *in vitro*. *Animal Feed Science and Technology*. 51 (1-2) 165-171.

CAPITULO II

CAMBIOS EN LA COMPOSICIÓN NUTRICIONAL DEL CULTIVO SÓLIDO DE PAJA DE SORGO Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE *Pleurotus sapidus* Y *Fomes fomentarius* EUM1

RESUMEN

Para identificar modificaciones en las variables nutricionales y la producción de complejos lignocelulósicos extracelulares y la relación entre éstas se realizó un cultivo sólido por 20 d con los hongos *Fomes fomentarius* EUM1 y *Pleurotus sapidus* en paja de sorgo, tratada con $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Se cuantificó la actividad enzimática xilanasas, celulasas, lacasas y proteína soluble en los días 0, 9, 15 y 20. La cuantificación de las enzimas lacasas con el hongo *Fomes fomentarius* EUM1 con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ y sin fue de 10.66 ± 0.21 y 2.45 ± 0.00 U/gss, mientras que con *Pleurotus sapidus* con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ y sin fue de 4.59 ± 0.00 y 0.58 ± 0.054 U/gss. La modificación de la composición nutricional se relacionó con la producción de complejos lignocelulósicos ya que la disminución de hemicelulosa (11 % a 17 %) y lignina (2 % a 3 %) es paralela al aumento en la producción de complejos enzimáticos xilanasas, lacasas y la disminución de la FDN. Con base en los resultados se concluye que el tratamiento con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ modificó al inicio del cultivo sólido los componentes de las paredes celulares vegetales de la paja de sorgo y coadyuvó en la formación de complejos lignocelulósicos, mejorando la producción de xilanasas y lacasas. Y el cultivo sólido no mejoró significativamente la composición nutricional de la paja.

Palabras Clave: Cultivo sólido, paja de sorgo, enzimas, *Pleurotus sapidus*, *Fomes fomentarius*

CHAPTER II

CHANGES IN THE NUTRITIONAL COMPOSITION OF THE SOLID CULTURE OF SORGHUM STRAW AND ENZYMATICAL ACTIVITY WITH *Fomes fomentarius* AND EUM1 *Pleurotus sapidus*

ABSTRACT

To identify modifications in the nutritional rates and the production of lignocellulosic complexes and their relation was realized a solid culture for 20 d with the fungi *Fomes fomentarius* EUM1 and *Pleurotus sapidus* in sorghum straw treated with $\text{Ca}(\text{OH})_2$. It was quantified the enzymatic activity xylanases, cellulases, laccases and soluble protein in the 0th, 9, 15 and 20 d. The quantification of laccases with the mushroom *Fomes fomentarius* EUM1 with $\text{Ca}(\text{OH})_2$ and without was 10.66 ± 0.21 and 2.45 ± 0.00 U/gss, whereas and with *Pleurotus sapidus* with $\text{Ca}(\text{OH})_2$ and without was 4.59 ± 0.00 and 0.58 ± 0.054 U/gss. The modification of the nutritional composition related to the production of lignocellulosic complexes in this sense the decrease of hemicellulose (11 % to 17 %) and lignin (2 % to 3 %) it was parallel to the increase in the production of enzymatic complexes xylanases, laccases and the decrease of the FDN. With this results one concludes that the treatment with $\text{Ca}(\text{OH})_2$ modified to the beginning of the solid culture the components of the cellular vegetable walls of the sorghum straw and supported in the formation of lignocellulosic complexes, improving the production of xylanases and laccases. And the solid culture did not improve significantly the composition nutritional of the straw.

Key words: solid culture, sorghum straw, enzymes, *Pleurotus sapidus*, *Fomes fomentarius*, nutritional composition

INTRODUCCIÓN

El esquileo de la cosecha de grano de sorgo es un residuo alto en fibra dietaria, posee bajo contenido de proteína y alto contenido de cenizas; lo anterior lo hace un alimento de baja calidad, baja digestibilidad y bajo valor nutritivo como ingrediente en dietas pecuarias. Existen alternativas de tratamiento biológicos que cambian características nutricionales de los esquileos, y permiten hacerlos mas digestibles, una de ellas es el uso de hongos de la producción blanca (Zadrazil, 1993). Los hongos de la pudrición blanca, tienen un buen crecimiento en sustratos sólidos, los esquileos agrícolas son excelentes sustratos debido a su capacidad de retención de agua y como fuentes de carbono. Sin embargo cada sustrato ofrece un perfil de crecimiento diferente para cada microorganismo, dado que la adaptación del mismo depende de las características estructurales y químicas de cada esquileo o residuo agrícola (Pandey et al., 2001). Una manera simple de evaluar la capacidad de invasión de un hongo a un sustrato es la medición de la velocidad de crecimiento radial y de igual forma su capacidad de adaptación a los nutrientes empleados en fermentación solida (Trinci, 1969; Orzua-González *et al.*, 2001). Además los hongos de la pudrición blanca son organismos transformadores de biomasa, la cual esta compuesta por metabolitos de distinta naturaleza.

Algunos metabolitos son complejos enzimáticos lignocelulósicos, que degradan las paredes vegetales y permiten que el esquileo modifique la estructura de sus componentes estructurales (Frumholtz y Beauchemin, 1999). Comercialmente existen enzimas que se utilizan como aditivos pero son caras, en algunos casos poco rentables y actúan en algunas porciones de forraje. Las enzimas sin embargo actúan según el

tipo de forraje o subproducto agrícola o grano (Colombatto *et al.*, 2003). Su acción da como resultado una mejor digestibilidad y reducción de polisacáridos estructurales y lignina, benéfica para los rumiantes. Existe un amplio interés en el uso de estas enzimas en la alimentación de especies pecuarias, debido a que modifican el valor nutritivo de los alimentos y de ensilados (Beauchemin y Rode, 1996).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetativo

Se utilizó paja de sorgo proveniente del municipio de Cuautla, estado de Morelos. El material se molió con un molino de tracción. En la preparación de los medios de cultivo se utilizó paja molida filtrada, con tamaño de partícula homogénea de 1 mm

Material biológico

Se utilizó la cepa de *Fomes fomentarius* EUM1 de la colección de cultivos de la Universidad Autónoma Metropolitana, México D. F., y *Pleurotus sapidus* proveniente del laboratorio Prodicet en México D.F. Las cepas se reactivaron en medios de cultivos sólidos (agar extracto de papa y dextrosa) en cajas petri, incubadas a 29 °C para *P. sapidus* y 39° C para *T. sp. EUM1* y resembradas tras 7 días de crecimiento.

Velocidad de crecimiento radial

Se hizo un medio de cultivo con paja de sorgo molida (MPS, 50 g de paja de sorgo, 15, g de agar bacteriológico, 1 L de agua destilada) y otro específico para hongos, agar extracto de malta (EMA extracto de malta 20 g agar bacteriológico 15 g y 1 L de agua destilada). Se esterilizaron a 120 lb por 15 m y vacío en cajas petri. La siembra se hizo con las cepas reactivadas, cortando un cuadro de 1 mm por 1 mm de medio de cultivo invadido durante 7 d y se colocó en el centro de la caja. La velocidad de crecimiento radial se determinó midiendo el diámetro del crecimiento circular de la cepa fúngica en la caja de Petri, con ayuda de un vernier, se midió a intervalos de 24 h

hasta la invasión de la superficie del medio de cultivo. La velocidad de crecimiento (V_r) se calculó con la ecuación enunciada por Trinci (1969), donde el diámetro de la colonia es una función lineal del tiempo (h) y la pendiente es la Velocidad de crecimiento radial ($m\ h^{-1}$).

Determinación de biomasa

Se hizo con base al peso seco del micelio cuando el microorganismo invadió la superficie del medio de cultivo. La biomasa se separó del agar, lavando la placa de agar con agua destilada en ebullición, en los dos tratamientos se realizó el mismo procedimiento, la biomasa una vez separada, se colocó en un papel filtro (Whatman No. 541) sometido a peso constante durante 24 h, se secó en una estufa por 24 h a 60 °C. El valor de la biomasa se obtuvo por diferencia de peso del peso inicial menos el peso final (Ashok *et al.*, 2001).

Descripción de tratamientos para velocidad radial y biomasa

Los tratamientos se abreviaron de acuerdo al microorganismo y el medio de cultivo para *P. sapidus* PLEMA (EMA es el medio de cultivo extracto de Malta) y PLMPS (MPS es medio de cultivo con paja de sorgo) y *F. fomentarius*, TREMA y TRMPS.

Cultivo sólido (CS) en paja de sorgo

Se picó la paja de sorgo (tamaño de partícula promedio 3-5 cm) se colocó en matraces y se remojó con agua destilada 24 h antes de ser inoculada; mientras que el tratamiento alcalino consistió en remojar la paja con una solución de $Ca(OH)_2$ al 0.7 %,

24 h antes de la inoculación (5 g 100gr⁻¹ MS de paja). La humedad alcanzada para ambos tratamientos fue de 80 %, después de 24 h, se esterilizó por 20 min a 15 lb, para después inocular 5 cuadros de 1 cm² de las cajas petri invadidas del medio MPS con 7 d de incubación con *Pleurotus sapidus* o *Fomes fomentarius*. EUM1.

Los tratamientos se abreviaron según el microorganismo de inóculo y el tratamiento del sustrato: cuando únicamente se remojaron con agua destilada *P. sapidus* PL y *Fomes fomentarius*. EUM1 TR, cuando la paja se trató con Ca (OH)₂ PLcal y TRcal. Los tratamientos del día 0 fueron denominados T0 cuando la paja únicamente se remojo con agua destilada y T0cal cuando se realizó el tratamiento con Ca (OH)₂. El cultivo sólido (CS) se detuvo a los 20 d. Así también se denominó el número del día en que se tomó la muestra del CS con 0, 4, 9 y 15.

Análisis bromatológico de la paja de sorgo y paja fermentada con *P. sapidus* y *F. fomentarius* EUM1

Del CS con *P. sapidus* y *F. fomentarius*. EUM1 se tomaron muestras de los días 0, 9, 15 y 20 con y sin Ca (OH)₂ se secaron a 65 °C por 24 h y molieron. Se determinó materia seca y orgánica, proteína total, cenizas (A. O. A. C., 1995), fibra detergente neutro, fibra detergente ácido (Van Soest *et al.*, 1991) y lignina por el método de Van Soest y Wine (1991). La determinación se hizo de igual forma para la paja sin tratamiento y sin microorganismos.

Preparación del extracto crudo enzimático de CS para la evaluación de la actividad enzimática

Con el CS se procedió a determinar enzimas a diferentes tiempos de cultivo, se t muestreó los días 0, 9, 15, y 20. La extracción se hizo con 40 g de CS, se agregó 50 mL de agua destilada y se agitó por 30 min manualmente para conocer el pH del extracto enzimático; se centrifugó en frío por 20 min a 11 000 psi. Con el sobrenadante se realizó la medición de enzimas.

Determinación de la actividad de celulasas, xilanasas, lacasas y proteína extracelular

La actividad de las enzimas celulasas se midió detectando azúcares reductores con el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959). El sustrato usado fue carboximetilcelulosa al 0.5 %, en 250 mL de amortiguador de citratos pH 4.8, 50 mM. Se preparó una solución concentrada de glucosa 10 mM, (dextrosa anhidra 0.18 g en 100 mL de amortiguador de citratos pH 4.8-50 mM (Miller *et al.*, 1960). La actividad de enzimas xilanasas se midió por el método DNS (Miller, 1959). Para realizar la curva estándar se usó como sustrato xilano a 0.5 % en medio L de amortiguador de citratos 50 mM y pH 5.3 se disolvió 2.5 g de xilano. Tanto la actividad xilanasas y celulasas se leyeron a una absorbancia de 540 nm.

Para la determinación de actividad lacasas se preparó un sistema de reacción (2 mL) con 1.6 mL de amortiguador de citratos pH 5.3 50 mM, 0.2 mL de extracto enzimático y 0.2 mL de sustrato ABTS (se disuelven 0.69 g de ácido 2, 2' azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) en 250 mL de amortiguador de citratos pH 5.3). El

coeficiente de extinción molar para ABTS es de $36,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Bressler *et al.*, 2000). El sistema de reacción sin el sustrato se preincubó 1 min a $40 \text{ }^\circ\text{C}$. Después se adicionó el sustrato y se midieron los incrementos de absorbancia a una longitud de onda de 420 nm a los 0, 1, 2, 3, 4 y 5 min. Una unidad de actividad (U) se definió como la cantidad de enzima que oxida $1 \text{ } \mu\text{mol}$ de sustrato por minuto bajo las condiciones de reacción. La determinación de la actividad lacasas se hizo por duplicado (Wolfenden y Wilson, 1982). A partir de lo anterior se obtuvo la línea de regresión, los parámetros de la pendiente y ordenada al origen de la ecuación de la recta para calcular las concentraciones enzimáticas muestrales. La determinación de proteína extracelular se realizó con $800 \text{ } \mu\text{L}$ de extracto enzimático diluido con agua destilada, se le añadieron $200 \text{ } \mu\text{L}$ de reactivo de Bradford (Sigma-Aldrich) Se agitó vigorosamente y se leyó a una absorbancia de 595 nm con un espectrofotómetro (Perkin Elmer. UV visible). La cantidad de proteína extracelular soluble se calculó con base en una curva patrón en la que se utilizó seroalbumina bovina (Bradford, 1976).

Diseño experimental y análisis de los datos

El diseño experimental para la velocidad radial y la biomasa fue completamente al azar, las variables de respuesta fueron la V_r y la producción de biomasa. El procesamiento de los datos se realizó con el procedimiento GLM (SAS 9.0 2002) y la comparación de medias con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$; Steel y Torrie, 1986). Para la actividad enzimática el diseño fue completamente al azar con arreglo factorial (Steel y Torrie, 1986): los factores fueron la especie del hongo (2 especies), el tiempo de fermentación (0, 9, 15 y 20 d) y tratamiento de la paja (sin y con $\text{Ca}(\text{OH})_2$). Los datos se analizaron mediante el procedimiento GLM (SAS, 2001) y la comparación de medias

para cada hongo con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$); así como para las comparaciones del día 20 de fermentación (Steel y Torrie, 1986). Los datos del análisis químico proximal fueron analizados con un diseño factorial completamente al azar, los factores fueron especie del hongo, tiempo de fermentación y tratamiento de la paja y una comparación de medias por la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

RESULTADOS

Velocidad radial y biomasa

En el cuadro 1 se observan los resultados de la Vr. La invasión de los medios de cultivo fue en el día 6. La mayor Vr fue de 0.60 mm d^{-1} para la cepa *P. sapidus* y 0.571 mm d^{-1} para *F. fomentarius*. EUM1 en MPS, sin diferencias significativas entre ellos. De igual forma en los tratamientos con EMA no hubo diferencias significativas y demuestran una Vr menor en comparación con MPS. En la tabla 1 se presenta las medias de la biomasa y se observa que PLMPS tuvo mayor eficiencia en la conversión de la fuente carbono en masa orgánica en comparación con los otros tratamientos. Los tratamientos PLEMA y TRMPS no mostraron diferencias significativas entre ellos. Por último se observó que el tratamiento PLEMA tiene la menor producción de masa biológica.

Cuadro 1. Velocidad de crecimiento radial y rendimiento de biomasa de las cepas *Fomes fomentarius*. EUM1 y *Pleurotus sapidus* en dos medios de cultivo.

Tratamiento	Vr (mm d ⁻¹)	Biomasa (g/gss)
TREMA	0.407±0.007 ^b	0.104±0.031 ^{a,b}
PLEMA	0.365±0.030 ^b	0.077±0.015 ^b
TRMPS	0.571±0.022 ^a	0.146±0.046 ^{a,b}
PLMPS	0.606±0.060 ^a	0.217±0.065 ^a

1. Medias por renglón con literal distinta tienen diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$) de acuerdo con la prueba de Tukey.

*TREMA, *Fomes fomentarius*. EUM1. extracto de malta, TRMPS *Fomes fomentarius* EUM1 medio de paja de sorgo *PLEMA, *Pleurotus sapidus* extracto de malta, PLMPS *Pleurotus sapidus* medio de paja de sorgo.

Análisis bromatológico de la paja sorgo

Los resultados del análisis ajustados a base seca son: materia seca (MS) 91.78 %, materia orgánica (MO) 80.51 %, cenizas 11.27%, proteína total (PT) 3.95 %, fibra detergente neutro (FDN) 65.11 %, Fibra detergente ácido (FDA) 44.25%, hemicelulosa (HM) 20.86 %, celulosa 30.73 % y lignina 13.52 %.

Actividad enzimática de celulasas, xilanasas, lacasas y proteína soluble

El análisis de la varianza mostró que el tratamiento alcalino de la paja de sorgo no produce efecto sobre la producción de xilanasas. El tiempo de fermentación tiene un

efecto significativamente diferente sobre la producción enzimática de xilanasas en paja de sorgo. La interacción tratamiento por tiempo no tiene un efecto significativo sobre la producción de xilanasas y de igual forma la interacción hongo por tratamiento por tiempo para la variable proteína.

En la figura 1 se presenta la actividad celulasas, con los 4 tiempos de medición destaca la actividad de TR20 (15.24 ± 0.99 U/gss) que presentan diferencia significativa ($p \leq 0.05$) con respecto a los otros tiempos de medición el mejor tratamiento fue PL20 (6.51 ± 0.81 U/gss) y tiene diferencia significativa ($p \leq 0.05$) con respecto a TR20.

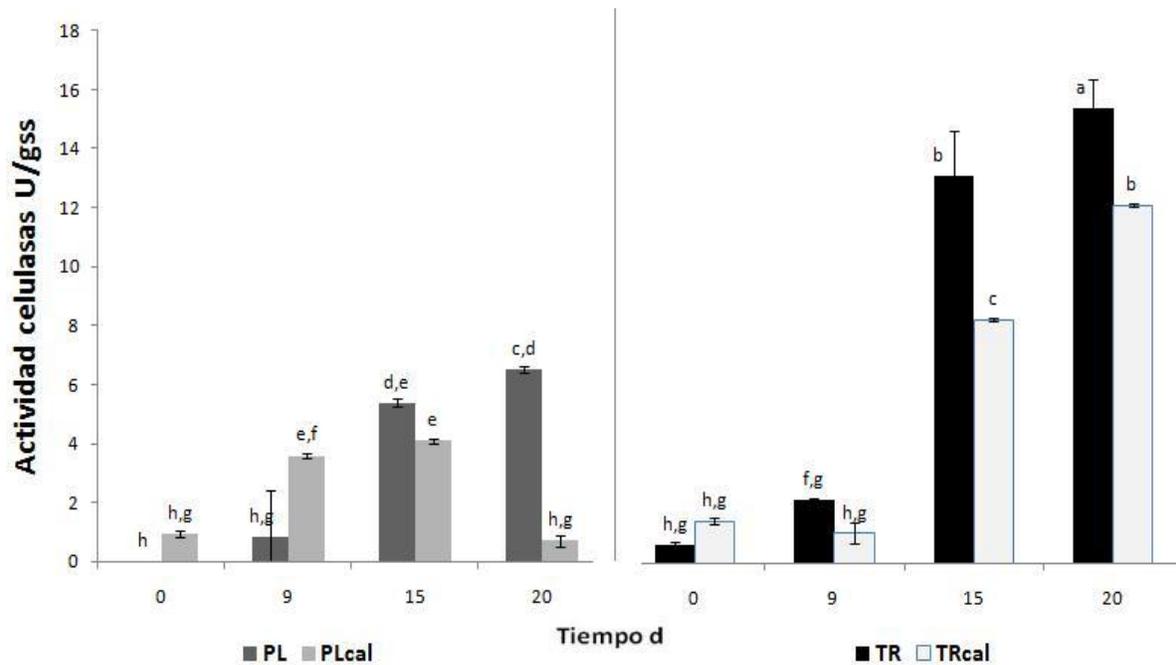


Figura 1. Actividad enzimática celulasas (20 d de CS) con *P. sapidus* y *F. fomentarius* EUM1. Las unidades se reportan por gramo de sustrato seco inicial (U/gss). Medias por columna con diferente literal tienen diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$)

La figura 2 muestra la actividad de xilanasas en CS, donde se observa que TR20 tiene una actividad de 79.45 ± 8.69 U/gss y TR20cal de 68.95 ± 0.070 U/gss, sin diferencia ($p > 0.05$) entre ellos pero si con respecto a TR15 (59.81 ± 12.30 U/gss) y TR15cal (55.80 ± 11.29 U/gss) que fueron los tratamientos con mayor actividad enzimática, estos a su vez no tienen diferencia ($p > 0.05$) entre ellos, además hay diferencia con respecto a los otros tiempos de fermentación. PL20 tuvo una actividad de 24.90 ± 0.71 U/gss con diferencia significativa ($p \leq 0.05$) respecto a los tratamientos con el mismo microorganismo.

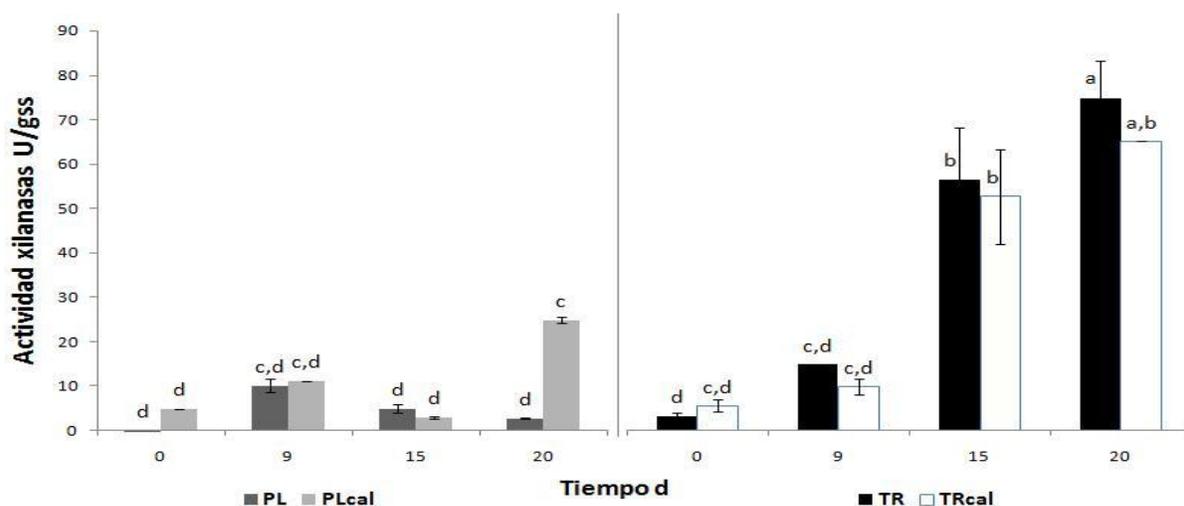


Figura 2. Actividad enzimática de xilanasas (20 d de CS), con *P. sapidus* y *F. fomentarius*. EUM1. Las unidades se reportan por gramo de sustrato seco inicial (U/gss). Medias por columna con distinta literal tienen diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$).

La comparación de medias de la actividad lacasas se muestra en la figura 3, la actividad mostró un incremento a partir del día 15 y la mejor actividad ($p \leq 0.05$) fue TR20cal con 10.66 ± 0.21 U/gss mientras PL20cal tuvo una actividad de 4.59 ± 0.00

U/gss. En el día 0 la actividad enzimática lacasas para ambos hongos es poco perceptible.

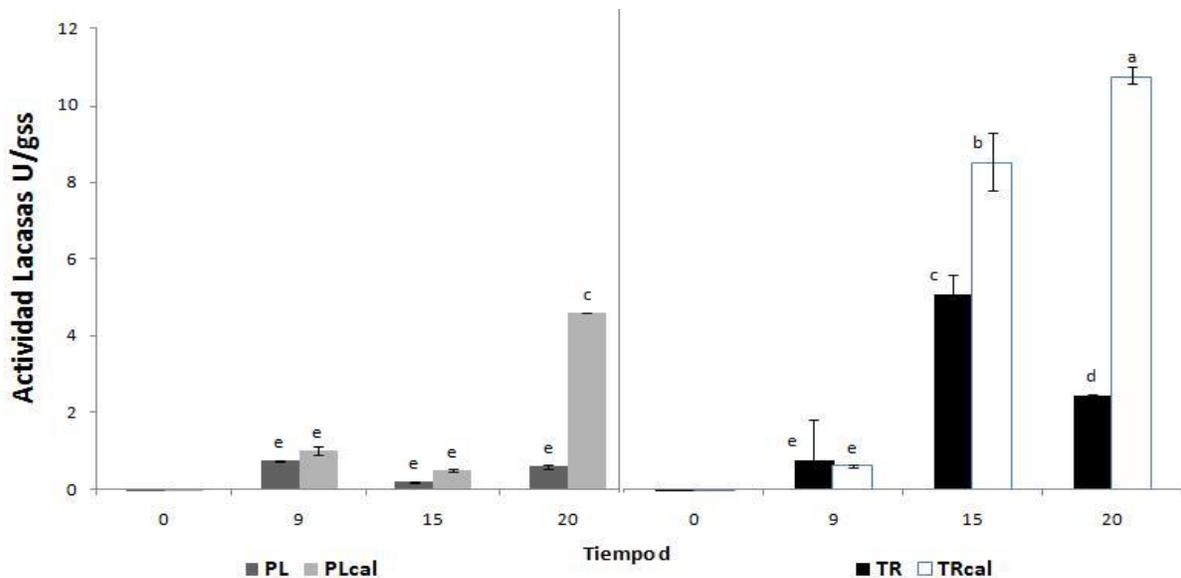


Figura 3. Actividad enzimática de lacasas (20 d de CS) con *P. sapidus* y *F. fomentarius*. EUM1. Las unidades se reportan por gramo de substrato seco inicial (U/gss). Medias por columna con distinta literal tienen diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$).

En la figura 4 se presenta la comparación de medias para la variable de proteína soluble en los diferentes tiempos de CS. Se observa que la mejor concentración con diferencia significativa ($p \leq 0.05$) fue TR20 y TR20cal (10.53 y 10.03 mg/gss) seguido de TR9 (8.89 mg/gss). La cantidad de proteína soluble con *P. sapidus* presenta diferencia significativa ($p \leq 0.05$) con respecto a *F. fomentarius*. EUM1, pero no ($p > 0.05$) entre los otros tiempos de cultivo ni entre tratamientos. Se observó una disminución atípica en el

día 15 de cultivo, contrastada con una alta actividad de otras las otras enzimas.

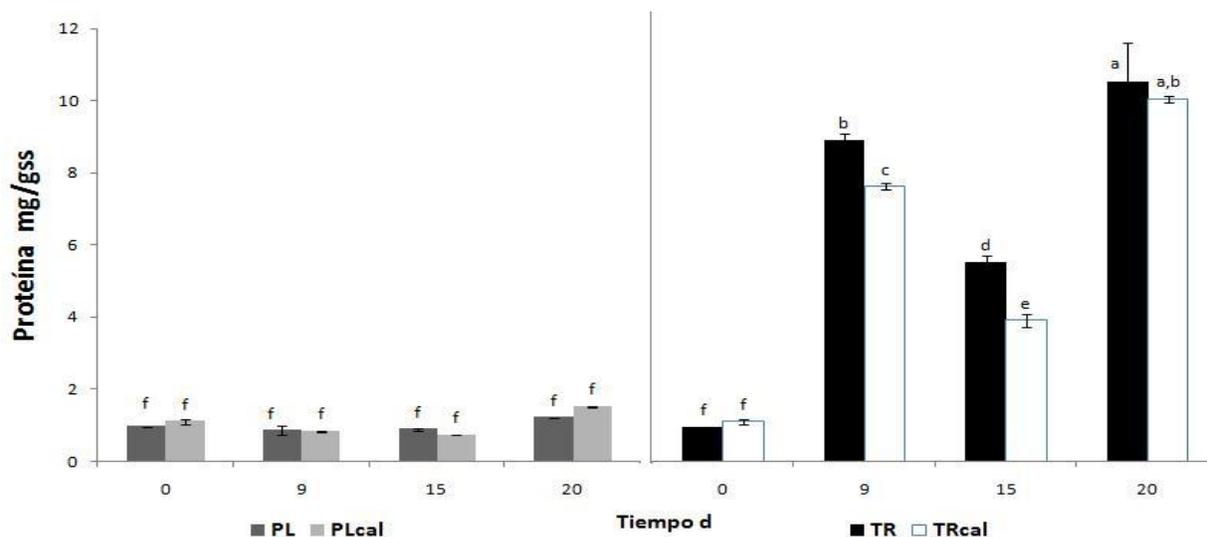


Figura. 4 Concentración de proteína soluble (20 d de CS), *P. sapidus* y *F. fomentarius* EUM1. Las unidades se reportan mg/gss. Medias por columna con distinta literal tienen diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$).

El cuadro 2 muestra el análisis de medias de la actividad enzimática del día 20 por tratamiento, destaca que para la actividad xilanasas y celulasas existe diferencia ($p \leq 0.05$) de actividad enzimática, los mejores son TR20 y TR20cal y no existe diferencia significativa ($p > 0.05$) entre ellos en actividad xilanasas pero si para celulasas. La actividad lacasas difiere y fue variable entre tratamientos, destaca que el mejor tratamiento fue TR20cal y hubo diferencia ($p \leq 0.05$) con el tratamiento TR. También la proteína soluble varió con un incremento significativo ($p \leq 0.05$) en TR20 y TR20cal, a diferencia de los otros tratamientos que mostraron una baja cantidad y sin diferencia ($p > 0.05$) entre ellos.

En la tabla 3 se observan los resultados del análisis bromatológico y resalta que el contenido de proteína total aumento un 1% para los cuatro tratamientos (PL20, PL20cal, TR20 y TR20cal) con diferencia ($p \leq 0.05$) respecto al T0. Las cenizas en el tratamiento T0cal y TR20cal mostraron tener una diferencia estadística significativa con respecto a los otros tratamientos.

Las cenizas (Cuadro 3) incrementaron en el tiempo en un intervalo de 0.39-1 %.Existió una reducción en la cantidad de FDN entre los tratamientos PL20, PL20cal, TR20 y TR20cal en comparación con el T0 y T0cal, y fueron significativos los tratamientos PL20cal (12.03 %) y TR20cal (11.28 %).

Cuadro 2. Actividad enzimática de *P. sapidus* y *F. fomentarius*. EUM1 del día 20 de cultivo sólido.

Tratamiento		PL20	PL20cal	TR20	TR20cal
Xilanasas	U/gss	2.69± 0.08 ^b	24.90± 0.71 ^b	79.47 ±8.69 ^a	68.95 ±0.07 ^a
Celulasas	U/gss	6.51±0.18 ^d	0.71±0.18 ^c	15.24±0.99 ^a	12.01±0.07 ^b
Lacasas	U/gss	0.58±0.05 ^d	4.59±0.00 ^b	2.45±0.00 ^c	10.66±0.21 ^a
Proteína	mg/ gss	1.20±0.00 ^b	1.50±0.00 ^b	10.53±1.07 ^a	10.03±0.09 ^a

Los datos representan las medias por triplicado. Las medias en columna con distinta literal tienen diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$)

La FDA (Cuadro 3) tuvo un incremento significativo en PL20 en comparación con el T0, además este tratamiento no presentó diferencias ($p > 0.05$) con los tratamientos PL20cal, TR20 y TR20cal. La celulosa de PL20 y PL20cal mostró un incremento

significativo con respecto T0; en cambio la hemicelulosa disminuyó en los cuatro tratamientos (PL20, PL20cal, TR20 y TR20 cal) en el tiempo y es significativa con respecto a la concentración inicial. La concentración de lignina disminuyó en un intervalo de 1-2% con respecto a la concentración inicial, la mayor disminución con significancia ($p \leq 0.05$) fue de PL20cal (3.18% menos), seguido de TR20 y TR20cal.

Cuadro 3. Análisis bromatológico del CS de paja de sorgo con *P. sapidus* o *F. fomentarius*EUM1

	T0	T0cal	PL20	PL20cal	TR20	TR20cal
Materia seca (%)	97.02±0.42 ^a	97.03±0.30 ^a	96.49±0.04 ^a	94.33±0.09 ^b	94.21±0.20 ^b	94.44±0.07 ^b
Proteína Total (%)	2.28±0.94 ^b	3.25±0.00 ^{a,b}	4.11±0.23 ^a	4.51±0.01 ^a	3.85±0.02 ^a	3.54±0.01 ^{a,b}
Cenizas (%)	8.33±0.39 ^b	12.15±0.19 ^a	8.72±1.48 ^b	10.30±0.13 ^{a,b}	10.72±0.13 ^{a,b}	12.43±0.43 ^a
FDN (%)	73.74±0.15 ^a	70.65±0.13 ^b	68.61±0.21 ^c	62.42±0.44 ^d	69.32±0.00 ^{b,c}	62.68±0.65 ^d
FDA (%)	49.49±3.84 ^b	48.70±0.10 ^b	59.17±0.91 ^a	54.86±0.03 ^{a,b}	55.54±1.75 ^{a,b}	54.65±2.51 ^{a,b}
Celulosa (%)	37.02±3.66 ^b	35.56±0.43 ^b	47.58±2.11 ^a	45.57±0.08 ^a	42.62±2.39 ^{a,b}	41.91±1.82 ^{a,b}
Hemicelulosa (%)	24.24±4.00 ^a	21.95±0.23 ^a	9.43±0.70 ^b	7.56±0.48 ^b	13.78±1.74 ^b	10.52±0.30 ^b
Lignina (%)	12.47±0.17 ^a	13.13±0.54 ^a	11.59±1.20 ^a	9.29±0.11 ^b	11.41±0.06 ^{a,b}	11.24±0.02 ^{a,b}

Las medias por fila con distinta literal son significativas ($p \leq 0.05$).

DISCUSION

Existen factores que pueden modificar la velocidad de crecimiento radial, como la humedad, la cantidad de nitrógeno y los carbohidratos disponibles. Ávila (2005) modificó el porcentaje de humedad en el CS con paja de maíz con la cepa de *P.*

ostreatus CP50 y encontró que la velocidad de crecimiento radial con 70 % fue de 0.187 m h^{-1} y con 80 % de $0.232 \pm 0.021 \text{ m h}^{-1}$, sin diferencias estadísticamente significativas. Los resultados de las medias de la velocidad de crecimiento para *P. sapidus* en este estudio con paja de sorgo y 80% de humedad se aproximan a las reportadas por Luna (2006) quien utilizó rastrojo de cebada con diferentes fuentes de nitrógeno, *P. ostreatus* CP50 tuvo una velocidad de $0.67 \pm 0.036 \text{ mm h}^{-1}$. Autores como Zadrazil y Brunnert (1981, 1982) señalan que el contenido de humedad en el sustrato es un factor importante en el desarrollo del micelio del hongo. En este estudio la cepa de *P. sapidus* mostró la mejor Vr en comparación con *F. fomentarius* EUM1 en el mismo medio de cultivo.

Los tratamientos alcalinos se han probado con el fin de mejorar la composición nutricional de los esquilmos y hacerlos más digestibles modificando las paredes celulares vegetales que presumiblemente permite una mejor adaptación del hongo al sustrato (Chaudhry, 2000; Nguyen *et al.*, 2001). Skim y Holtzaple (2005) trataron paja de maíz con hidróxido de calcio con condiciones oxidativas y sin ellas a varias temperaturas, observaron que el tratamiento con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ es efectivo para la desacetilación y provocó una remoción gradual de lignina durante el periodo de tratamiento; la lignina no tuvo cambios significativos en comparación con los otros tratamientos que usaron. Además hubo más holocelulosa (glucanos y xilanos) en el tratamiento alcalino. La solubilización de hemicelulosa durante el pre tratamiento alcalino está íntimamente relacionada con la deslignificación. La celulosa fue mucho más estable que la hemicelulosa pero la celulosa se degradó más rápido y se disuelve con el pre tratamiento. En el presente estudio el cambio en la composición nutricional

del sustrato fue mayor en el día 20 de cultivo sólido y se observó una disminución significativa de la cantidad de hemicelulosa, celulosa y lignina. Los análisis mostraron una degradación mayor de hemicelulosa que de celulosa con la consecuente producción de mayores cantidades de enzimas xilanasas. Datos aportados por Martínez *et al.*, (1994) demuestran que *P. eryngii* y especies emparentadas tienen un ataque limitado hacia la celulosa, degradando solo un 15% de el contenido inicial, mientras que la degradación de xilanos es mayor y paralela a la degradación de lignina, en este estudio la especie de *P. ostreatus* y *F. fomentarius*. EUM1 con y sin $\text{Ca}(\text{OH})_2$ tienen un comportamiento similar. También se observó que polisacáridos estructurales como la celulosa y hemicelulosa son consumidos por el hongo como fuente primaria de energía para el crecimiento del microorganismo. Por lo tanto la relación de la actividad enzimática del hongo y la acción del tratamiento alcalino esta ligada con el cambio en las paredes celulares vegetales.

El incremento de 1 % de la proteína total sobre el contenido inicial, puede indicar la proteína generada por los hongos, estudios mencionan que el cultivo en medio sólido con hongos de la pudrición blanca puede mejorar el contenido de proteína de distintos residuos lignocelulósicos y permite una mejor utilización en la alimentación de rumiantes (Akinfemi *et al.*, 2008). Algunos materiales bajos en proteína una vez fermentados llegan a aumentar alrededor de 10-15% su contenido proteico (Shojaosadati *et al.*, 1999). Adomovic *et.al.* (1998) en un estudio realizado con *P. ostreatus* en cultivo en medio sólido con rastrojo de trigo encontró que la proteína aumento en promedio un 5 % en 30 días, atribuible a la biomasa generada por el micelio de hongo. Estos datos a su vez se asemejan con los generados por otros

autores para la misma especie de hongo quienes reportan que este proceso aumentó de 1-3% la cantidad de proteína. (Yang *et al.*, 1993, Zadrazil, 1993; Bano *et al.*, 1994)

La cantidad de cenizas en los tratamientos con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ mostraron incrementos asociados al pre- tratamiento alcalino que contiene Ca, aunque la concentración de la solución es baja, influyó en el incremento un intervalo de 2 a.4 %, y sugiere la modificación de la composición química en el sustrato. La literatura no reporta al Ca como un elemento esencial en las funciones de producción enzimática o de metabolismo secundario fúngico. Algunos otros metales pesados con cobre, hierro, manganeso, molibdeno, zinc y níquel son esenciales para el crecimiento fúngico y pueden actuar como cofactores enzimáticos induciendo la actividad enzimática cuando son agregados en niveles conocidos, mientras que pueden ser tóxicos cuando están presentes en exceso (Baldrian, 2003), sin embargo en este trabajo el aumento de la actividad enzimática se atribuyo, a una mayor accesibilidad de la superficie vegetal al ataque del hongo y un cambio químico en la estructura de las uniones de los carbohidratos estructurales a la lignina.

La cantidad de cenizas encontrada necesita ser analizada ya que el balance mineral en las dietas animales con el uso de este fermento puede verse influenciado. Se menciona que los tratamientos con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ no representan un efecto toxico a los animales, usado en concentraciones de $30,60 \text{ g kg}^{-1}$ MS de paja. (Gandi *et al.*, 1997; Zaman y Owen, 1995) El tiempo de cultivo sólido provocó una disminución de cenizas en el tratamiento PL20cal pero no así en el tratamiento TR20 cal en donde existió un aumento influido por la disminución de humedad y conversión de materia orgánica.

Los datos de producción enzimática en el tiempo, muestran picos máximos de actividad en el día 20 de CS, datos reportados por Ávila (2005) en paja de maíz con *P. ostreatus* muestran máxima actividad a los 15 días de CS. Luna (2006) con la misma cepa de *P. ostreatus* observó máximas actividades de xilanasas en los días 20 y 25. Márquez *et al.*, (2008) observaron que *Trametes sp.* EUM1 en CS en bagazo de caña presentó una máxima actividad xilanasas en los días 14 y 19 de CS. Gomes *et al.* (1993) realizaron un estudio con *Thermomices lanuginosus* para probar como distintas fuentes de carbonó, afectaban la producción de enzimas xilanasas y encontraron que todas las fuentes de carbonó provenientes del sorgo soportaron la máxima actividad xilanasica con 10,145 U/gss seguido por paja de maíz, paja de trigo y salvado de trigo con 2480,2191 y 1901 U/gss respectivamente. Los títulos de xilanasas tuvieron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) cuando la paja de sorgo fue usada como principal fuente de carbono atribuible a la naturaleza de la hemicelulosa y la presencia de algunos nutrientes (activadores) en la fuente de carbono, superficie, tamaño de poro y degradabilidad favorable interesantemente. Y cuando se cultivó en paja de sorgo produjo hifas inusualmente intercaladas y anchas. Estas estructuras fueron asociadas a la secreción de xilanasas pues estas no se observaron cuando se cultivo al microorganismo en otra fuente de carbono. Indicaron también que seleccionar una adecuada fuente de carbono mejora la producción enzimática y que la producción de xilanasas en paja de sorgo es una alternativa atractiva, barata y muy viable para ser una fuente de carbono. (Gomes *et al.*, 1993). En otros estudios se ha observado que los sustratos de gramíneas contienen arabinoxilanos que promueven una mayor actividad xilanasas (Puls y Schuseil, 1993; Sing *et al.*, 2000).

La concentración de proteína soluble tuvo un decremento en el día 15 en los tratamientos con *F. fomentarius*. EUM1, comúnmente la proteína soluble se relaciona con la actividad enzimática lacasas sin embargo Márquez *et al.* (2007), no encontró correlación entre la proteína soluble y la actividad lacasas mientras que encontró una correlación mediana para la concentración de proteína soluble y la actividad xilanasas y celulasas ($r^2=0.40$; $p>0.05$) Martínez *et al.* (2005) variaron la fuente de nitrógeno (nitrato de amonio) y carbono (glucosa) simultáneamente y la actividad lacasas en el hongo *Trametes versicolor*, es baja (3.42 ± 1.04 U) sin embargo encontraron valores máximos de producción (8.62 U y 8.34) al adicionar nitrato de amonio o glucosa al medio. Concluyeron que la actividad de las enzimas lacasas es mejor cuando el medio tiene un enriquecimiento bajo. Entonces los esquilmos agrícolas cuando se utilizan como sustratos para el CS permitirían expresar al hongo algunas características enzimáticas degradadoras.

De acuerdo con Master y Field (1998) las enzimas ligninolíticas son producidas durante el metabolismo secundario bajo condiciones limitantes de nitrógeno aunque. *P. ostreatus* en presencia de nitrógeno no reprime la producción aunque si la limita. El mismo microorganismo cultivado en medio sólido sobre residuos de la industria vitivinícola produjo 2144.6 ± 57.8 U/l de actividad lacasas después de 10 días de cultivo (Stajic *et al.*, 2006). Otro estudio con distintos hongos lignolíticos en residuos de la industria alimentaria encontró que *Trametes* comparativamente con otros hongos de la pudrición blanca, tenía una alta producción de enzimas lacasas extracelulares ($9000-20000$ UI⁻¹) entre los 7 y 14 días de fermentación sumergida. Este dato confirma algunas otras

observaciones que muestran que *Trametes* puede llegar a producir valores significativamente altos de lacasas (Songulashvili *et al.*, 2007).

Además Márquez *et al.*, (2008) en un estudio realizado con *Trametes sp.* EUM 1 en bagazo de caña encontró que las xilanasas y celulasas producidas por *Trametes sp.* EUM1 tuvieron la mayor actividad ($P \leq 0,01$) expresando $141,77 \text{ UI} \cdot \text{g}^{-1} \text{ MS}$ y $1073,8 \text{ UI} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ proteína}$ las primeras, y $9,04 \text{ UI} \cdot \text{g}^{-1} \text{ MS}$ y $69,16 \text{ UI} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ proteína}$ las celulasas, sin diferencias significativas entre 14 y 19 días. En comparación con *P. ostreatus* a actividad de estas enzimas fue menor ($P < 0,01$). Un dato relevante fue que la mayor ($P < 0,01$) actividad de lacasas expresada por *P. ostreatus* con promedios de $15,54 \text{ UI} \cdot \text{g}^{-1} \text{ MS}$ y $128,75 \text{ UI} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ proteína}$ a los 14 días de fermentación, fue mayor ($P < 0,01$) que a los 19 días ($11,75 \text{ UI} \cdot \text{g}^{-1} \text{ MS}$ y $102,88 \text{ UI} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ proteína}$). En *Trametes sp.* la actividad de lacasas fue menor ($P < 0,01$) que en *P. ostreatus* y similar en ambos tiempos de fermentación.

Los sustratos lignocelulósicos confieren un patrón similar de crecimiento a los hongos en estudio o de la misma especie, pero debido a que cada sustrato posee una composición distinta, el crecimiento puede variar en función de esta e influye de manera directa en la capacidad degradante de cada especie de hongo.

CONCLUSIONES

Los hongos en estudio junto con el tratamiento con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ son capaces de adaptarse al sustrato y modifican su calidad nutritiva. *P. sapidus* tuvo la mayor velocidad de crecimiento radial y fue más eficiente en comparación con *F. fomentarius*. EUM1 en transformar la materia orgánica en biomasa en el medio con paja de sorgo.

La actividad enzimática celulasas, xilanasas y lacasas fue paralela con los cambios en la composición nutricional. La producción de xilanasas fue mayor que la de celulasas en *P. sapidus* y *F. fomentarius* EUM1 y se relacionó con la capacidad adaptativa de hongo al sustrato, el tipo de carbohidratos que forman la pared vegetal de la paja de sorgo y la especificidad de los complejos lignocelulósicos para degradar mejor ciertos xilanos que la celulosa de la pared celular. El hongo *F. fomentarius*. EUM1 en comparación con el hongo *P. sapidus* produjo mayor cantidad de enzimas, lo cual lo hace un microorganismo de elección para realizar fermentación sólida sobre paja de sorgo. Y la combinación del cultivo sólido con el tratamiento con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ mejoró la actividad enzimática lignocelulósica.

LITERATURA CITADA

- A. O. A. C. 1995. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist. Washington, D.C. USA.
- Adamović, M., Grubic, G., Milenkovic, I., Jovanović, R., Protic,R.L., Sretenović., Stoićević L. 1998. The biodegradation of wheat straw by *Pleurotus ostreatus* mushrooms and its use in cattle feeding. Animal Feed Science and Technology. 71, 357-362.
- Akinfemi, A, Ogunwole, O.A., Ladipo, M K, Adu, O A, Osineye, O.M., Apata E.S 2008a .I. Enhancement of the nutritive value of maize leaf treated with white-rot fungi: *Pleurotus sajor caju* and *Pleurotus pulmonarius*, and the effects on chemical composition and in vitro digestibility. Production Agriculture and Technology 4(1), 106-114
- Ashok, P., Carlos, R., José, A., Rodríguez-León, Poonam, N., 2001. Solid-state fermentation in biotechnology. Fundamentals and Applications. 1th ed Ed. Asistech Publishers, INC. New Delphi. Pp: 14.
- Ávila, M.H., 2005. Enzimas fibrolíticas de *Pleurotus ostreatus* y su actividad en rastrojo de maíz. Tesis de Maestría. Colegio de Posgraduados. Montecillo, Edo. de México. 92 p.
- Bano, Z., Rajarthnam S.K., Mathy, N., 1994. Studies on the fitness of spent traw obtained during cultivation of the mushroom *Pleurotus soya-caju* for safe consumption as cattle food. Central Food Technological Research Institute, Mysore, 70013, India. pp. 11-16.
- Bradford, M., 1976. A quick and sensitive method for the cuantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical. Biochemistry. 72, 248-254.

- Bressler, D.C., Fedorak, P.M., Pickard, M.A., 2000. "Oxidation of carbazole, N-ethylcarbazole, fluorene, and dibenzothiophene by the laccase of *Corioloropsis gallica* UAMH 8260". Biotechnology. Letters. 22, 1119-1125.
- Chaudhry, A S., 2000. Rumen degradation *in-sacco* in sheep of wheat straw treated with calcium oxide, sodium hydroxide and sodium hydroxide plus hydrogen peroxide. Animal Feed Science and Technology. 83, 313-323.
- Colombatto, D., Mould, F.L., Bhat M.K., Morgavi, D.P., Beauchemin K.A., Owen E., 2003. Influence of fibrolytic enzymes on the hydrolysis and fermentation of pure cellulose and xilan by mixed ruminal microorganism *en vitro*. Journal of Animal Science. 81, 1040-1050.
- Frumholtz and Beauchemin. 1999. El uso de enzimas en rumiantes. *In*: Memoria del seminario de biotecnología para la alimentación animal. AMENA. México, D. F. pp: 85-94.
- Gandi, J.M., Holtzapple T., Ferrer, A., Byers, F.M., Turner N.D., Nagwan M., Chang, S., 1997. Lime treatment of agricultural residues to improve rumen digestibility. Animal Feed Science. Technology. 68, 195-211.
- Kim, S., Holtzapple, M.T., 2005. Lime pretreatment and enzymatic hydrolysis of corn stover. Bioresource Technology 96, 1994-2006.
- Luna, R.L., 2006. Estudio de la actividad lignocelulósica del hongo *Pleurotus ostreatus* sobre rastrojo de cebada. Tesis de Maestría. Colegio de posgraduados. Montecillo Edo. México, pp. 123.
- Martínez, S.M., Pedrosa, R.A, Rodríguez, V.R., Rosas, A.J., 2005. Efecto de la glucosa y nitrato de amonio sobre las enzimas ligninolíticas producidas por *Trametes versicolor* inmovilizado en espuma y la decoloración de un efluente papelerero en un biorreactor de lecho fluidizado. Pontificia Universidad Javieriana Revista Facultad de Ciencias Bogotá Colombia. vol 10 no 2 27-36)
- Martínez, T.A., Camarero, S., Guillen, F., Gutiérrez, A., Muñoz, C., Varela, E., 1994. Progres in biopulping of non-woody materials: chemical, enzymatic and ultrastructural aspects of wheat Straw deslignification with ligninolytic fungi from the genus *Pleurotus*. FEMS Microbiology Reviews 13, 265-75

- Master, T., Field A. T. 1998. Characterization of novel manganese peroxidase-lignin peroxidase hybrid isozyme produced by *Bjerkandera* species strain BOS55 in the absence of manganese. *Journal Biological Chemistry* 273 (25), 15412-7
- Miller, G.L., Blue, R., Glannon, E.W., Burton, A.L., 1960. Measurement of carboxymethyl cellulose activity. *Analytical, Chemistry*. 2, 127-132.
- Miller, G.L., 1959. Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical, Chemistry* 31, 426-428.
- Nguyen, X.T., Thang, C.M., Van Thanh, N., 2001. Effects treatment and supplementation of rice straw on growth of young bulls. *Journal of Agriculture and Rural Development*. No 9/2001. Pp: 135-140.
- Orzua-González, M.C., Aguilar-Gonzales, C., Rodríguez-Herrera, R., 2001. Velocidad radial de crecimiento de *Aspergillus niger* (Aa20) sobre diversos residuos agroindustriales. Departamento de investigación en alimentos. Universidad Autónoma de Coahuila. Resúmenes IX Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Veracruz, Ver. México.
- Pandey, A., Soccol, C.R., Rodríguez-León, J.A., Nigam, P., 2001. *Solid-State Fermentation in Biotechnology Fundamentals and Applications*. Assitech Publishers. Nueva Delhi. 1 ed. Pp.21-31.
- Songulashvili, G., Elisashvili, V., Solomon, P., Wasser, A., Nevo, E., Hadar, Y., 2007. Basidiomycetes laccase and manganese peroxidase activity in submerged fermentation of food industry wastes Institute of Evolution, University of Haifa, Mt. Carmel, Haifa 319 / *Enzyme and Microbial Technology*.41, 57–61
- Shojaosadati, S.A., Faraidouni, R, Madadi-Nouei, A, Mohamadpour, I., 1999. *Resources Conservation and Recycling* 27, 73
- Singh, S., Pillay, B., Dilsook, V., Prior, B.A., 2000. Production and properties of hemicellulases by a *Thermomyces lanuginosus* strain. *Journal Applied Microbiology*. 88, 975–982.

- Stajic', M., Persky, L., Friesem, D., Hadar, Y., Wasser, S.P., Nevo E., Vukojevi'c J., 2006. Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected *Pleurotus* species. *Enzyme and Microbial Technology* 38 (1-2), 65-73.
- Steel, R.G.D. y Torrie. 1986. *Bioestadística: Principios y procedimientos*. 2da Edición. Editorial Mc Graw Hill. México. Pp. 622.
- Trinci, A.P.J., 1969. A kinetic study of the growth of *Aspergillus nidulans* and other fungi. *Journal General Microbiology*. 57, 11-24.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. Methods for dietary fiber neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Animal Science*. 74, 3583-3597.
- Van Soest, P. J. and Wine, R. H.,. 1991. Determination of lignin and cellulose in acid detergent fiber with permanganate. *Journal of the Association of Official Analytical Chemistry*. 51, 780-785.
- Wofenden, B.S. y Wilson, S.R., 1982. Radical cations as reference chromogens in studies of one electron transfer reactions: pulse radiolysis studies of 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate). *Journal of Chemical Society Perkin Transactions*. II: 805-812.
- Yang, G.L., Ma, L., Wang, Y., 1993. Physiology and biochemistry of lignocellulose utilization by *Pholiota nameko*. *Proc. First Int. Conf. Mushroom Biol. Products Vol 17*. Hong Kong, pp-163-168.
- Zadrazil, F., Brunnert, H., 1981. Investigation of physical parameters important for the solid state fermentation of straw by white rot fungi. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*. 11, pp. 183-188.
- Zadrazil, F., Brunnert, H., 1982. Solid state fermentation of lignocellulose containing plant residues with *Sporotrichum pulverulentum* Nov. and *Dichomitus squalens*

(Karst.) Reid European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology. 16, pp. 45-51.

Zadrazil, F., 1993. Conversion of lignocellulosic into animal feed with White fungi. Proc. First Int. Conf Mushroom Products. Chap 16. Hong Kong, pp151-161.

Zaman, M.S., Owen, E., 1995. The effect of calcium hydroxide and urea treatment of barley straw on chemical composition and digestibility *in vitro*. Animal Feed Science and Technology. 51 (1-2), 165-171.

CAPITULO III

PRODUCCIÓN DE GAS *IN VITRO* Y DESAPARICIÓN DE LA MATERIA SECA DEL CULTIVO SÓLIDO CON HONGOS LIGNINOLITICOS

RESUMEN

La paja de sorgo, es un esquilmo agrícola abundante en el país que se usa como alimento para rumiantes, por su baja digestibilidad existen tratamientos químicos y biológicos para elevar su calidad. Por tanto el objetivo de este estudio fue evaluar las características fermentativas *in vitro* del cultivo sólido de paja de sorgo tratada con Ca (OH)₂ y sin tratar y fermentada durante 20 d con los hongos *Pleurotus sapidus* y *Fomes fomentarius* EUM1. Se usó la producción de gas *in vitro* y se midió variables, Vmax, S, L, desaparición de la materia seca, AGV y N-NH₃. El diseño experimental fue bloques al azar generalizados y se compararon medias por contrastes. El tratamiento con Ca (OH)₂ mostró mejor producción de gas fraccional ($p \leq 0.05$) de 0 a 40 h de fermentación y Vmax (382.10 mL g⁻¹). El tratamiento con *F. fomentarius* EUM1 y CaOH₂ tiene el mejor Vmax en comparación con *P. sapidus*. Además *P. sapidus* aumentó la formación de biomasa microbiana ($p \leq 0.01$) y *F. fomentarius* EUM1 la producción de ácido acético 24 h ($p \leq 0.01$). Se concluye que el tratamiento con Ca (OH)₂ mejora las características fermentativas de la paja y el tratamiento con hongos influye en la formación de masa microbiana. Y no existió sinergia en el tratamiento combinado.

Palabras clave: producción de gas *in vitro*, cultivo sólido, *Fomes fomentarius* EUM1, *Pleurotus sapidus*

CHAPTER III

IN VITRO GAS PRODUCTION AND DRY MATTER DISSAPEARANCE OF SOLID CULTURE WITH LINOLYTIC FUNGI

ABSTRACT

The sorghum straw, it is one of the most abundant lignocellulosic waste in the country that is used as feed for ruminants, for its low digestibility there exist chemical and biological treatments to raise its quality. Therefore the aim of this study was to evaluate the rates of gas production in vitro of the solid culture of sorghum straw treated with Ca (OH)₂ and without treating and fermented during 20 d with the fungi *Pleurotus sapidus* and *Fomes fomentarius* EUM1. There was used the production of in vitro gas and one measured Vmax, S, L, disappearance of the dry matter, AGV and N-NH₃. The experimental design was blocks at random widespread and averages were compared by contrasts. The treatment with Ca (OH)₂ showed better production of fractional gas production ($p \leq 0.05$) of 0 a 40 h of fermentation and Vmax (382.10 mL g⁻¹). The treatment with *F. fomentarius* EUM1 and Ca (OH)₂ has the best Vmax than *P. sapidus*. In addition *P. sapidus* increased the training of microbial biomass ($p \leq 0.01$) and *F. fomentarius* EUM1 the production of acetic acid 24 h ($p \leq 0.01$). One concludes that the treatment with Ca (OH)₂ improves the fermentative characteristics of the straw and the treatment with fungi influences the formation of microbial mass. And synergy did not exist in the combined treatment.

Key words: gas production, solid culture, *Pleurotus sapidus*, *Fomes Fomentarius*

INTRODUCCIÓN

La producción de grano de sorgo en México es 5, 972,628 t año⁻¹(SIAP, 2008), genera 10, 351,868 t de paja usada en dietas para rumiantes, que tiene un alto contenido de FDN y baja digestibilidad (Álvarez y Combellas, 2005) por lo cual se usan tratamientos físicos, químicos y biológicos para mejorar la digestibilidad de la paja de sorgo. Algunos tratamientos biológicos usan el cultivo sólido con hongos de la pudrición blanca como *Pleurotus* sp. y *Fomes* sp., que secretan celulasas, xilanasas y lacasas (Márquez *et al.*, 2008). Además se usa el Ca (OH)₂ como tratamiento químico (Gandi *et al.*, 1997). Mediante la técnica de producción de gas *in vitro* se puede determinar efectos de compuestos secundarios en la actividad microbiana ruminal, describir la cinética de fermentación, analizar efectos asociativos de diversos alimentos, examinar el efecto de aditivos en la fermentación ruminal y elucidar la composición de gases de la fermentación (Getachew *et al.*, 2005; Posada y Noguera, 2005). Aiple *et al.* (1996) indican que el método de producción de gas es mejor para predecir la energía neta en ingredientes alimenticios pero las respuestas son variables al usar pajas tratadas con hongos de la pudrición blanca (Karma y Zadrazil, 1986) o enzimas exógenas (Tricarico y Dawson, 2005) en estudios de fermentación *in vitro*, lo cual se atribuye a la especificidad enzimática por el sustrato, contenido de humedad en el alimento y la especie de hongo (Karunananda *et al.*, 1995). El objetivo del presente trabajo fue evaluar la fermentación y desaparición de la materia seca mediante la técnica de producción de gas *in vitro*, de la paja de sorgo tratada con Ca (OH)₂, (0.7 %) por 24 h combinado con el cultivo sólido con *F. fomentarius* EUM1 o *P. sapidus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tratamiento de la paja de sorgo

La paja de sorgo se cortó (2 a 5 cm), una porción se remojó con agua destilada y otra con una solución alcalina de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, 0.7 %, para alcanzar una humedad de 80 % por 24 h. Después la paja se esterilizó a 15 lb PSI por 20 min y se enfrió. Una porción de 10 g se inoculó con *P. sapidus* y otra con *F. fomentarius* EUM1, colocando cinco cuadros de agar paja de sorgo de 1 cm² colonizado por 7 d con los hongos. La paja inoculada con *P. sapidus* se mantuvo en una estufa de cultivo a 28 °C y la de *F. fomentarius* EUM1 a 35 °C, por 20 d. La proporción final de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, en la paja fue de 5 g por cada 100 g MS de paja.

Tratamientos de la producción de gas *in vitro*

Los tratamientos húmedos fueron paja sin y con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ tratada con *P. sapidus* (PL y PLc), o con *F. fomentarius* EUM1, sin y con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (TR y TRc); los tratamientos testigos: fueron paja de sorgo humedecida con agua o humedecida con la solución de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (D0, D0c), preparados 24 h antes de iniciar la prueba de desaparición de la MS *in vitro*. Los tratamientos secos fueron paja tratada con *P. sapidus* (PLs), paja tratada con *F. fomentarius* EUM1 (TRs) y paja sin tratar (PS), estos se secaron y molieron antes de la prueba *in vitro*. Hubo cinco repeticiones por tratamiento.

Fermentación y desaparición de la materia seca *in vitro*

Se usó la técnica de producción de gas (Theodorou *et al.*, 1994), para evaluar la fermentación. Las muestras de paja de sorgo (intervalo de tamaño de partícula de 1

mm a 1 cm) se colocaron en frascos de vidrio ámbar (125 mL): 2.5 g para los húmedos y 0.5 g para los secos, se les agregó 90 mL de inóculo ruminal estandarizado con un flujo continuo de CO₂ y se cerraron herméticamente. Se incluyeron tres frascos como blancos, que sólo contenían inóculo ruminal. Los frascos se colocaron en un baño maría a 39 °C y se midió la presión de gas a 0, 1, 2, 3, 5, 7, 9, 12, 15, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 60, 72, 96 h de incubación, mediante un manómetro manual (escala de 0 a 1 kg cm⁻²). Las lecturas de presión (kg cm⁻²) se transformaron a volumen de gas con la ecuación de regresión lineal $V = (P + 0.0145) (0.018)^{-1}$ (Orskov y Mc Donald, 1979). Los datos de volumen de gas y tiempo de incubación se usaron para obtener el volumen fraccional (Vf). Las variables de la cinética de producción de gas: volumen máximo de gas producido (Vmax), fase de retardo (L) y tasa de producción de gas (S) se obtuvieron con un modelo logístico (Pitt *et al.*, 1999). El inóculo ruminal se obtuvo de una vaca Holsteín alimentada con alfalfa y concentrado (70:30). El líquido ruminal se filtró y mezcló con una solución mineral reducida en proporción de 1:9 v/v. La solución mineral reducida contenía por L de solución (4 g Ca₂CO₃, 0.45 g K₂HPO₄, 0.45 g KH₂PO₄, 0.45g (NH₄)₂SO₄, 0.90 g NaCl, 0.18 g MgSO₄, 0.07 g CaCl₂, 50 mL de agua destilada, 2 mL NaOH (1 N), 0.5 g de Na₂S₂O₄, 0.5 g L-Cisteína, 1 gota de rezarsurina), en baño María a 39 °C con flujo continuo de CO₂. Al final de la incubación se filtró el contenido de los frascos con papel filtro N 541 (Ø poro 10 µm) y se secó a 60 °C por 24 h; se pesó para calcular la MS residual y calcular la DIVMS. En la MS residual se determinó FDN residual (FDNr).

Determinación de AGV y nitrógeno amoniacal

Se tomaron muestras del contenido líquido de los frascos de la prueba de desaparición de la MS de dos repeticiones por tratamiento, a las 12 y 24 h, se mezclaron con ácido metafosfórico (25 % p/v) en una relación 4:1, y se refrigeraron. Después las muestras se centrifugaron 20 min a 11,000 PSI, del sobrenadante de cada muestra se tomó 1 μ L y se inyectó a un cromatógrafo de gases (Perkin Elmer, modelo Clarus 500) con columna capilar (Elite PFAP) (Erwin *et al.*, 1961). Como gas acarreador se utilizó H₂ a un flujo de 5.5 mL min⁻¹, la temperatura de inyector y detector fue 250 °C, y la del horno 80 °C durante 1 min con incrementos de 20 °C min⁻¹ hasta alcanzar 140 °C, con un tiempo por lectura de 8 min (Kung y Hession, 1995). Para determinar la concentración de N-NH₃ se tomaron 20 μ L del sobrenadante y se vertieron en tubos de 10 mL, adicionando 1 mL de fenol (10 %) y 1 mL de hipoclorito de sodio (5 %), se incubaron en baño maría a 38 °C por 30 min. Después a cada tubo se agregó 5 mL de agua destilada. La absorbancia se leyó con un espectrofotómetro (VARIAN, modelo CARY I-E) a 630 nm.

Determinación: energía metabolizable (EM), digestibilidad de la materia orgánica (DMO) y masa microbiana (MM)

Dado que la producción de gas es proporcional a la MS degradada se usó la producción neta de gas a 24 h de incubación del sustrato a partir de la obtenida por 0.5 g (Menke, 1979). Para cada tratamiento y repetición se calculó la EM (Kj kg⁻¹), DMO (%) y MM (mg g⁻¹), usando los modelos propuestos por Menke y Steingas (1998).

Diseño experimental y análisis de los datos

Se analizó el perfil de producción de gas para evaluar las fracciones de degradación del alimento (FI rápida fermentación, FII fermentación intermedia y FIII fermentación tardía) en función de los picos de mayor producción de gas. El diseño experimental fue bloques al azar generalizados y el bloque fue la repetición del experimento en el tiempo. Los valores de volumen fraccional (Vf) para cada pico (FI, FII y FIII) se analizaron con la prueba de comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$). Las variables Vmax, L, S, DIVMS, AGV, FDNr, proporción molar de acético, propiónico, butírico y así como: EM, DMO y MM, se analizaron con el procedimiento MIXED (SAS., 1999). La comparación de medias se realizó por contrastes ortogonales (Cuadro 1). (Steel y Torrie, 1986); las diferencias fueron aceptadas cuando $p \leq 0.01$

Cuadro 1. Contrastes ortogonales para el efecto del tratamiento de la paja de sorgo con *Pleurotus sapidus*, *Fomes fomentarius* EUM1 y Ca (OH)₂.

Contrastes	Tratamientos	Efecto analizado
C1	D0, D0c vs. PL, PLc, TR, TRc	T*. biológico vs, alcalino con humedad
C2	PL, PLc, PLs vs TR, TRc y TRs	Tipo de hongo
C3	D0 vs PL y TR	T biológico con humedad sin T alcalino
C4	PLs TRs vs TR y PL	Secado y tamaño de partícula sin T. alcalino
C5	PS vs PLs y TRs	T. biológico en seco sin tratamiento

		alcalino
C6	PL, PLc vs TR y TR cal	Tipo de hongo en humedad con o sin T.
		alcalino
C7	PS, PLs, TRs vs D0, PL y TR	Humedad sin T. alcalino
C8	D0c, PLc, TRc vs D0, PL y TR	T. alcalino-biológico

*T =tratamiento

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La producción de gas resulta de la fermentación de los carbohidratos solubles y estructurales del sustrato mientras, que la fermentación de proteína y lípidos es escasa (Getachew *et al.*, 1998). El perfil del Vf de gas (Figuras 1, 2 y 3) mostró que los tratamientos D0 y D0c producen más gas entre las 60 y 80 h de fermentación que PS (Figura 1), pero PS produce más gas de cero a 40 h de incubación en comparación con PL, PLc, PLs (Figura 2). Este efecto es poco notorio en TR, TRc y TRs (Figura 3) y en el ultimo tratamiento fue notorio que el secado redujó la producción de gas *in vitro* (Figura 3). El FI se presentó entre 5 y 12 h de incubación, FII entre 24 y 39 h y FIII entre 74 y 84 h.

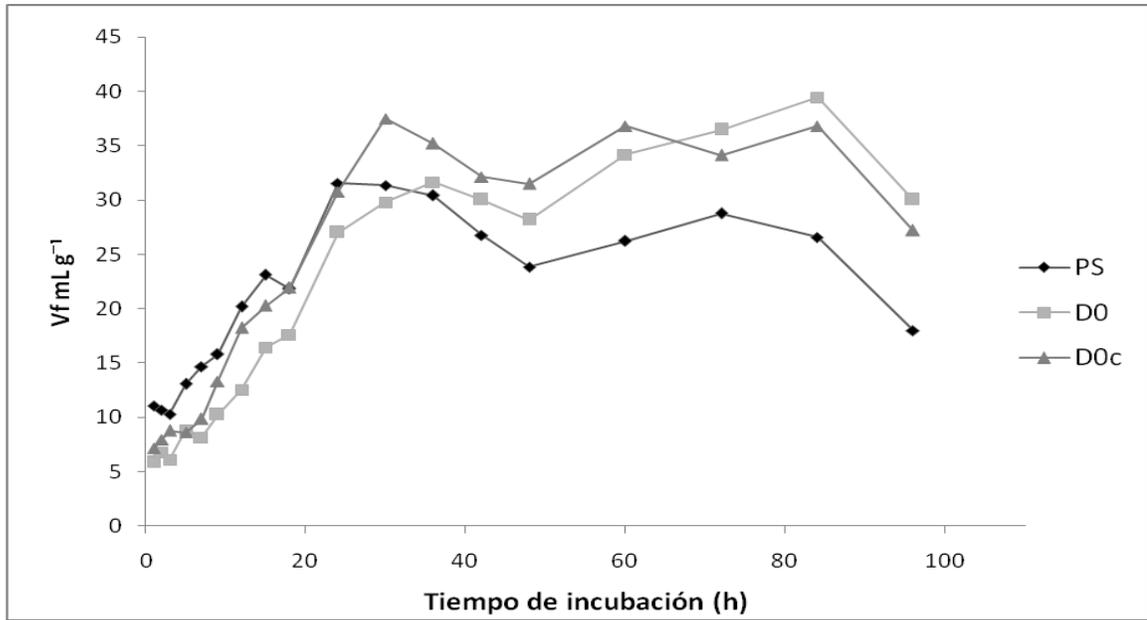


Figura 1. Perfil de producción fraccional de gas *in vitro* de paja de sorgo, paja húmeda (D0) y paja tratada con CaOH_2 (0.7 %; D0c).

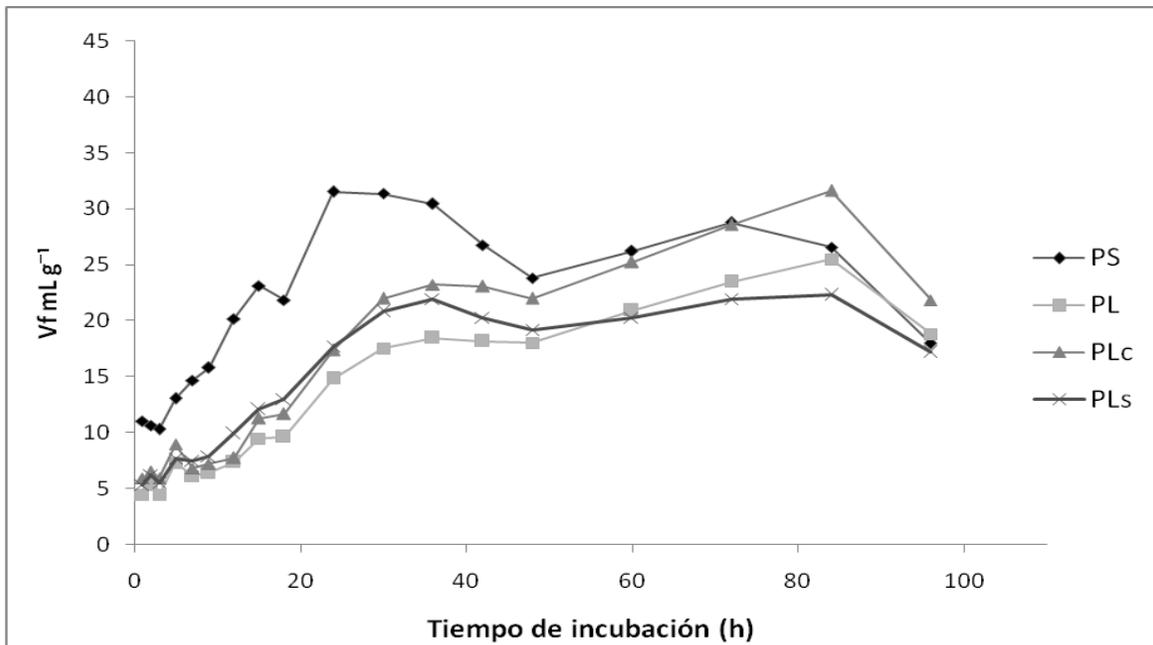


Figura 2. Perfil de producción fraccional de gas *in vitro* paja tratada con: *P. sapidus* (PL), CaOH_2 (0.7 %) más PL (PLc) y seca (PLs).

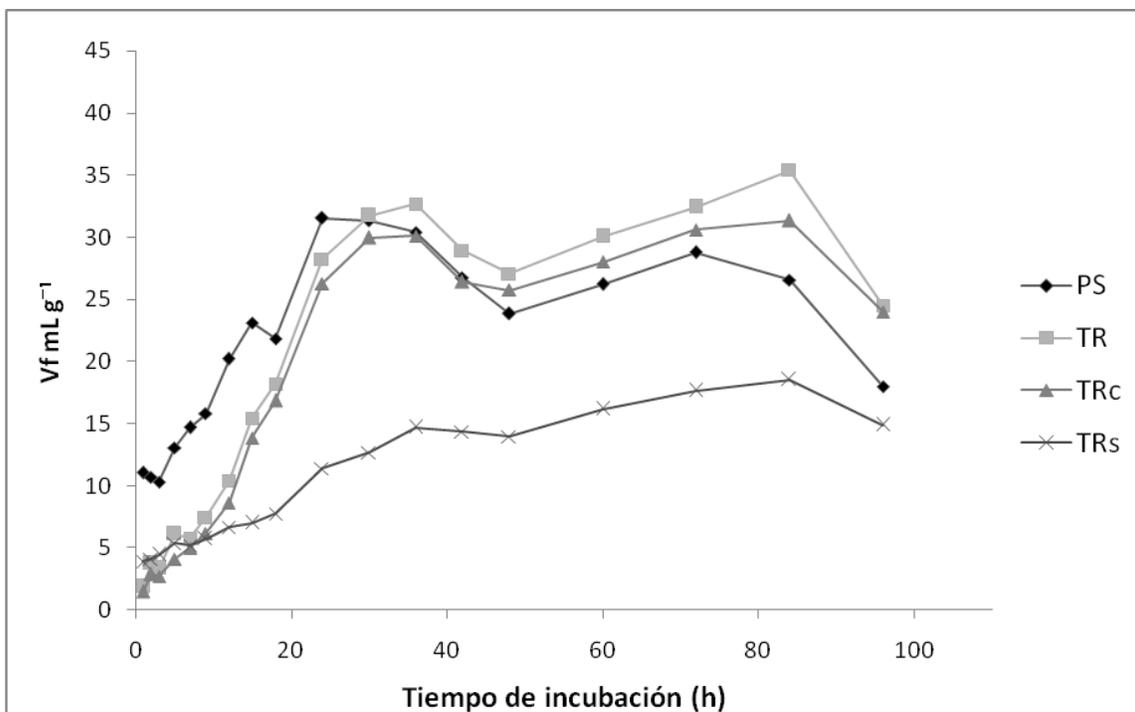


Figura 3 Perfil de producción fraccional de gas *in vitro* de paja de sorgo, paja tratada con: *Fomes fomentarius* EUM1 (TR), Ca OH₂ (0.7 %) más *F. fomentarius* EUM1 (TRc) y seco (TRs).

En el Cuadro 2 se presentan los valores medios de la producción de gas (FI, FII y FIII). PS produjo más gas ($p \leq 0.05$) en FI (23.123 mL g⁻¹) en comparación a D0 y D0c pero D0c genera más gas ($p \leq 0.05$) en FII (37.433 mL g⁻¹) y FIII (37.425 mL g⁻¹) que PS; el tratamiento alcalino, causó cambios estructurales, en las fases I y II de Vf. Tarkow y Feist (1969) encontraron que el tratamiento con álcalis hidroliza la celulosa provocando la pérdida parcial de su fracción cristalina, transformándola en celulosa amorfa, más vulnerable al ataque enzimático; y la saponifica mediante la formación de ésteres entre ácidos urónicos y hemicelulosa; además, la acción de los álcalis modifica algunos de los componentes fibroso de la paja (Chen *et al.*, 2007). El D0 sólo supera la producción de gas a PS en FIII. En general, el tratamiento con *P. sapidus* (PL, PLc,

PLs) disminuyó ($p \leq 0.05$) la producción de gas en las fracciones FI, FII y FIII, con respecto a PS (Cuadro2). Para *P. sapidus*, la mezcla de tratamientos (PLc) favoreció ($p \leq 0.05$) la producción de gas en FII y FIII (11.317 y 23.257 mL g^{-1}) en comparación a PL (9.788 y 18.019 mL g^{-1}). El tratamiento con *F. fomentarius* EUM1 (TR, TRc, TRs) disminuyó ($p \leq 0.05$) la producción de gas solo en FI, con respecto a PS, excepto en TRs que se secó y molió antes de fermentarla *in vitro*. El tratamiento con hongos o cultivo sólido, redujó la producción del Vf en FI y modificó marcadamente la fase II, lo cual refiere el cambio estructural provocado por los hongos. Lo anterior se puede deber a que *P. sapidus* y *F. fomentarius* EUM1 consumen nutrientes de la paja durante su crecimiento y producen otros metabolitos como enzimas. Meneses *et al.* (2009) determinaron que la máxima actividad enzimática de xilanasas y celulasas de *P. sapidus* y *F. fomentarius* EUM1 en paja de sorgo, ocurre antes de la máxima producción de lacasas entre los días 9 y 15. Así los tratamientos con mejor actividad de xilanásas fueron TR y TRc 79.47 ± 8.69 y $68.95 \pm 0.07 \text{ U g}^{-1} \text{ MS}$, 15.24 ± 0.99 y $12.01 \pm 0.07 \text{ U g}^{-1} \text{ MS}$ de celulasas y para lacasas de 2.45 ± 0.00 y $10.66 \pm 0.21 \text{ U g}^{-1} \text{ MS}$, respectivamente. Las celulasas y xilanasas actúan sinérgicamente para hidrolizar mejor las paredes celulares (Bhat y Hazlewood, 2001); además los hongos de la pudrición blanca utilizan carbohidratos solubles antes de degradar lignina (Krause *et al.* 2003). Contradictoriamente para preparaciones enzimáticas (actividad xilanasas y celulasas) de *Trichoderma viridae*, *T. longibratum* y *Aspergillus niger* en heno de pasto, los tratamientos con enzimas estimulan las fases iniciales de degradación del sustrato pero estos efectos se reducen a medida que aumenta el tiempo de fermentación (Giraldo *et al.*, 2007).

Cuadro 2. Volumen fraccional de gas producido durante la fermentación ruminal *in vitro* (96 h) de la paja de sorgo tratada con *Pleurotus sapidus*, *Fomes fomentarius* EUM1 o CaOH₂ (0.7 %).

Tratamiento	Fracción de alimento ^Z		
	FI	FII	FIII
	----- Volumen fraccional de gas (mL g ⁻¹) -----		
PL	9.788 ^a	18.019 ^b	25.477 ^b
PLc	11.317 ^a	23.257 ^a	31.626 ^a
PLs	10.460 ^a	21.571 ^a	22.664 ^c
TR	12.416 ^a	32.496 ^a	35.411 ^a
TRc	9.740 ^b	30.465 ^a	32.388 ^a
TRs	7.394 ^c	15.973 ^b	19.449 ^b
D0	13.633 ^b	31.633 ^{a,b}	39.923 ^a
D0c	9.911 ^c	37.433 ^a	37.425 ^b
PS	23.123 ^a	31.535 ^b	30.236 ^c

Medias con distinta literal en una columna son diferentes ($p \leq 0.05$). ^Z FI: fracción de carbohidratos de rápida fermentación, FII: fracción de carbohidratos estructurales FIII: fracción de compuestos como lignina.

En el Cuadro 3 se presentan los valores para Vmax, L, S, DIVMS y FDNr. Para Vmax hubo efecto ($p \leq 0.01$) en C1, C3, C4, C5, C6 y C7, pero no ($p \geq 0.01$) para C2 y C8. El efecto del tratamiento biológico (C1) produjo 93 mL g⁻¹ menos de Vmax en

comparación al tratamiento alcalino (D0 y D0c). Además los tratamientos TR y TRc aumentan $176 \text{ mL g}^{-1} V_{\text{max}}$ en comparación con los tratamientos con PL y PLc (C6). La variable V_{max} se relaciona con la fermentación potencial de un alimento y está relacionada con la cantidad, disponibilidad y composición química del sustrato; la fase Lag o fase de retardo, es el tiempo en el que los microorganismos inician la degradación de los componentes del sustrato. La tasa de producción de gas es directamente proporcional a la tasa de degradación del sustrato (France *et al.*, 2000). Al respecto V_{max} , S y L fueron mayores cuando la paja fue tratada con $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Las variables de fermentación fueron menores en la paja tratada con *P. sapidus* y la tratada con *F. fomentarius* EUM1 y $\text{Ca}(\text{OH})_2$. La producción de gas mejora al incubar forrajes tratados con enzimas exógenas (Colombatto *et al.*, 2003; Carro *et al.*, 2005), pero en el presente estudio se redujo.

La velocidad con la que los microorganismos del rumen fermentan los componentes del alimento o tasa de producción de gas, S, mostró un efecto ($p \leq 0.01$) en C2, C4, C5, C6; el C5 hace suponer que el tratamiento biológico (PLs y TRs) disminuye S y al comparar el tipo de hongo, *F. fomentarius* EUM1 fermentó más rápidamente (0.02 h^{-1} ; $p \leq 0.01$) la paja que *P. sapidus* (C2 y C6). Además el proceso de secado de la paja antes de la producción de gas *in vitro* disminuyó S (0.01 h^{-1}) en comparación con los tratamientos húmedos (C4) donde hay mayor ($p \leq 0.01$) producción. En la fase de retardo (L) se el tratamiento de la paja con *P. sapidus* muestra un menor tiempo de retardo de la producción de gas *in vitro* en contraste al tratamiento con *F. fomentarius* EUM1 (C2 y C6). También se observó que secar la paja (PLs y TRs) antes de la producción de gas *in vitro* redujó el tiempo de retardo (C4). En

la DIVMS contrariamente a V_{max} , el tratamiento de la paja con *P. sapidus* mejoró la digestibilidad en comparación al tratamiento con *F. fomentarius* EUM1 (C2 y C6). Además el tratamiento biológico (PLs, PL, TR y TRs) disminuyó la digestibilidad de la paja de sorgo (C3, C5 y C7).

En el presente estudio el tratamiento con hongo disminuyó la DIVMS, explicado por el consumo de nutrientes durante el tiempo de crecimiento del hongo sobre la paja de sorgo; sin embargo hay datos contradictorios pues Peláez *et al.* (2008) indican que el tratamiento con hongos mejora la DIVMS *in vitro*. Agosin *et al.* (1985) encontraron un incremento de 30 % en la DIVMS de paja de trigo tratada con *Dichomitus squalens* y *Cyathus stercoreus*, pero Eun y Beauchemin (2007) señalan que muchos productos enzimáticos disminuyen la eficiencia de fermentación así como la materia orgánica degradada por mL de gas producido en 18 h de incubación y que la degradación es proporcional a la cantidad de endoglucanasas usadas. Según el análisis estadístico para las variables de respuesta V_{max} , L, S, DIVMS y FDNr, no existió efecto ($p > 0.01$) de bloque, pero sí de tratamiento y bloque por tratamiento ($p \leq 0.01$).

Cuadro 3. Variables de producción de gas *in vitro* (96 h)

Tratamiento	Vmax (mL g ⁻¹)	S (h ⁻¹)	L (h)	DIVMS	FDNr (%)
PS (1)	351.60	0.02	2.24	53.49	67.98
D0 (2)	343.65	0.01	7.61	29.60	86.79
D0c (3)	382.10	0.01	6.31	37.53	86.60
PL (4)	217.75	0.01	5.79	51.76	91.67
PLc (5)	264.75	0.01	6.22	46.85	92.11
TR (6)	311.51	0.02	10.89	35.22	87.11
TRc (7)	281.20	0.02	11.86	39.77	89.72
PLs (8)	233.38	0.01	4.71	43.24	80.24
TRs (9)	168.61	0.01	5.07	36.47	81.01
EEM	10.12	0.00	0.53	1.04	2.44

Contrastes: C1=2,3 vs 4,5,6,7; C2=4,5,8 vs 6,7,9; C3=2 vs 4,6; C4=8,9 vs 4,6; C5=1 vs 8,9; C6=4,5 vs 6,7; C7=1,8,9 vs 2,4,6; C8=3,5,7 vs 2,4,6. Contrastes significativos: 1) Vmax: C1, C3, C4, C5 C6 C7≤0.001; 2) S: C2, C4, C5, C6 ≤0.001; 3) L: C1≤0.002, C2,C4 ≤0.001, C5 ≤0.003, C6, C7 ≤0.001; 4) DIVMS: C2,C3,C5 ≤0.001, C6≤0.003, C7≤0.001; 5) FDNr: C4≤0.001, C5≤0.006, C7≤0.001.

La proporción de AGV totales (Cuadro 4) fue de 12 a 23 mmol dL⁻¹. La proporción molar de ácido acético fue de 69 a 71 mmol dL⁻¹, de ácido propiónico de 19 a 21 mmol dL⁻¹ y de ácido butírico de 8 a 11 mmol dL⁻¹. No se encontraron diferencias (p>0.01) en la proporción de cada ácido 12 vs 24 h de incubación. En el análisis de los

AGV totales, así como acético, propiónico y butírico no existió efecto de tratamiento ($p > 0.01$) a 12 h de fermentación, contrario a 24 h en donde si hubo efecto de bloque y tratamiento ($p \leq 0.01$). Las concentraciones de ácido acético propiónico y butírico a 12 h de incubación no se reportan en este documento ya los contrastes no mostraron diferencias ($p > 0.01$), por lo cual el análisis se orientó a los datos de 24 h. La concentración de AGV totales disminuyó ($p \leq 0.01$) por el tratamiento fúngico de la paja (C1, C5); mientras que incrementó ($p \leq 0.01$) debido al tratamiento con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (C8). La proporción molar de ácido acético y propiónico fue ligeramente mayor ($p \leq 0.01$) cuando la paja se secó y se molió antes de realizar la prueba de fermentación (C4), y fueron menores ($p \leq 0.01$) cuando la paja se trató con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (C8). Este último contraste también mostró efecto para ácido butírico. La concentración de H-NH_3 (Cuadro 4) entre 12 y 24 h fue equivalente en los diferentes tratamientos ($p \geq 0.01$) de 15 a 20 mmol dL^{-1} . Y los contrastes no mostraron efecto para esta variable ($p > 0.01$).

Cuadro 4. Ácidos grasos volátiles y nitrógeno amoniacal

Tratamiento	Total AGV Mmol dL ⁻¹		Acético	Propiónico	Butírico	N-NH ₃ mol dL ⁻¹
	12 h	24 h	%	%	%	
			24 h			
PS (1)	16.20	23.20	69.80	21.23	8.96	20.41
D0 (2)	13.00	16.50	70.99	19.56	9.44	17.72
D0c (3)	17.40	21.90	70.05	20.37	9.56	18.65
PL (4)	14.70	17.10	70.55	20.50	8.94	18.14
PLc (5)	14.20	16.00	70.19	20.69	9.11	15.14
TR (6)	12.60	17.10	70.22	20.84	8.92	17.40
TRc (7)	12.60	18.10	69.53	20.70	9.75	18.82
PLs (8)	12.70	16.50	70.83	20.23	8.93	20.16
TRs (9)	12.30	15.10	71.38	19.78	8.83	20.14
EEM	0.01	0.01	0.65	0.32	0.36	1.51

Contrastes: C1=2,3 vs 4,5,6,7; C2=4,5,8 vs 6,7,9; C3=2 vs 4,6; C4=8,9 vs 4,6; C5=1 vs 8,9; C6=4,5 vs 6,7; C7=1,8,9 vs 2,4,6; C8=3,5,7 vs 2,4,6. Contrastes significativos: 1) Total AGV 12h: C1≤0.003, C5≤0.002, 24 h: C1, C5, C8≤0.001; 2) Acético: C4≤0.002, C5≤0.003; 3) Propiónico: C3, C4, C5 ≤0.001; 4) Butírico: C3≤0.006, C8≤0.003.

La EM y DMO calculadas (Cuadro 5) fueron menores ($p \leq 0.01$) en la paja tratada con *P. sapidus* y *F. fomentarius* EUM1, en comparación con los tratamientos húmedos D0 y D0c o PS (C1, C3, C5). La biomasa microbiana (MM) y adherencia (Cuadro 5) fueron mayores cuando la paja fue tratada con *P. sapidus* y *F. fomentarius* EUM1, con o sin Ca (OH)₂, (C1, C3, C5). Cuando se comparó PL vs TR(C6), PL incrementó

($p \leq 0.01$) la MM y la adherencia según los cálculos con los modelos matemáticos de Menke y Steingas (1998). Cuando *P. sapidus* crece sobre la paja se forman o liberan sustancias nutritivas que pueden actuar como promotores del crecimiento microbiano. Según Martin y Nisbet (1992) los productos de la fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* y *Aspergillus oryzae* contienen metabolitos o productos de la fermentación que estimulan el crecimiento de microorganismo ruminales. Muchas enzimas fibrolíticas exógenas mejoran algunos componentes de forrajes para rumiantes; son varios mecanismos de acción, algunos aumentan el ataque microbiano y otros mejoran la colonización de la pared vegetal (Newbold, 1997). Sin embargo algunos efectos no pueden ser equiparables al cultivo sólido ya que este no únicamente contiene complejos enzimáticos lignocelulósicos si no también otros metabolitos producto del crecimiento de los hongos.

Cuadro 5. Variables calculadas de la producción de gas *in vitro* (96 h)

Tratamiento	EM kJ kg ⁻¹ MS	DMO %	MM mg g ⁻¹ MS	Adherencia Microbiana mg g ⁻¹ MS
PS	7.14	48.32	270.03	147.53
D0	5.58	37.71	104.14	56.45
D0c	6.38	43.25	142.66	74.05
PL	4.48	30.72	305.72	116.36
PLc	4.89	33.52	209.39	93.69
TR	5.16	35.23	174.34	70.22
TRc	4.79	32.94	204.45	77.81
PLs	4.96	33.85	235.69	96.26
TRs	4.09	28.28	218.64	76.53
EEM	0.20	1.37	10.08	4.02

Contrastes: C1=2,3 vs 4,5,6,7; C2=4,5,8 vs 6,7,9; C3=2 vs 4,6; C4=8,9 vs 4,6; C5=1 vs 8,9; C6=4,5 vs 6,7; C7=1,8,9 vs 2,4,6; C8=3,5,7 vs 2,4,6. Contrastes significativos: 1) EM: C1≤0.001, C3≤0.005, C5≤0.001; 2) DMO: C1≤0.001, C3≤0.007, C5≤0.001; 3) MM: C1, C2, C3≤0.001, C5≤0.001, C6, C7≤0.001; 4) Adherencia microbiana: C1, C2, C3, C5 C6, C7≤0.001.

En este estudio no se encontró efecto de secado (C4), pero dichos efectos pueden ser confundidos con el efecto de tamaño de partícula. Las muestras en fresco pueden producir menores volúmenes de gas que los secos (Lowman *et al.*, 2002), debido a que el secado modifica a los alimentos lo que puede facilitar el ataque

microbiano, la fermentación, y como resultado aumenta la producción de gas. Según Rymer *et al.* (1999), cuando se hidratan muestras antes de la fermentación, la hidratación aumenta el volumen de gas producido y mejora el inicio de la segunda fase de producción de gas. Además el hecho de que el humedecimiento de la paja haya reducido V_{max} y S , puede deberse a que el tamaño de partícula fue menor en el sustrato seco y mayor en el húmedo. Wimer *et al.* (1990) mencionan que el tamaño de partícula es un factor importante en la degradación ruminal y el ataque de enzimático pues las bacterias ruminales tienen mayor acceso a la superficie de las paredes vegetales, para su subsecuente degradación.

CONCLUSIONES

El tratamiento alcalino mejoró las variables fermentativas. Pero el tratamiento de la paja con *Pleurotus sapidus* promovió la formación de biomasa microbiana y la producción de AGV totales y ácido propiónico a las 24 h. Aunque el tratamiento fúngico reduce las variables de la producción de gas *in vitro*, el aumento significativo en la formación de masa microbiana es importante en la nutrición de rumiantes, pero la sinergia entre tratamiento alcalino y hongos no mostró resultados significativos en las variables fermentativas.

LITERATURA CITADA

- Agosin, E., B. Monties, and E. Odier. 1985. Structural changes in wheat straw components during decay by lignin-degrading white-rot fungi in relation to improvement of digestibility for ruminants. *J. Sci. Food. Agric.* 36: 925-935.
- Aiple, K.P., H. Steingass, and W. Drochner. 1996. Prediction of net energy content of raw materials and compound feeds for ruminants by different laboratory methods. *Arch. Anim. Nutr.* 23: 1508-1513.
- Álvarez, R., y J. Combellas. 2005 Evaluation of poultry litter on sorghum straw intake and dry matter disappearance by dry. *Rev. Bras. Zootec.* 34(2): 584-588.
- Bhat, M.K., and G.P. Hazlewood. 2001. Enzymology and other characteristics of cellulases and xylanases. In: Bedford, M.R., Partridge, G.G. (eds). *Enzymes in Farm Animal Nutrition*. CABI Publishing, Wallingford, Oxon, UK. pp: 11–60.
- Carro, M.D., M.J. Ranilla, and M.L. Tejido. 2005. Using an *in vitro* gas production technique to examine feed additives: effects of correcting values for different blanks. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123-124: 173-184.
- Colombatto, D., D.P. Morgavi, A.F. Furtado, and K.A. Beauchemin. 2003. Screening of exogenous enzymes for ruminant diet: relationship between biochemical characteristics and *in vitro* ruminal degradation. *J. Anim. Sci.* 81: 2628-2638.
- Corley, R.N., J.E. Wold, S.N. Carithers, A.O. Bahaa, and M.R. Murphy. 1998. Effect of feed hydration on the dynamics of *in situ* ruminal digestion. *Anim. Feed Sci. Technol.* 72: 295-301.
- Chen, X.L., J.K. Wang, Y.M. Wu, and J.X. Liu. 2007. Effects of chemical treatments of rice straw on rumen fermentation characteristics. *Anim Feed Sci. Technol.* 141 (1): 1-14
- Eun, J.S., and K.A. Beauchemin. 2007. Assessment of the efficacy of varying experimental exogenous fibrolytic enzymes using *in vitro* fermentation characteristics. *Anim Feed Sci. Technol.* 132: 298-315.

- Erwin, E.S., G.T. Marco, and E.M. Emery, 1961. Volatile fatty acid analysis of blood and rumen fluid by gas chromatography. *J. Dairy Sci.* 44: 1768–1771.
- France, J., J. Dijkstra, M.S. Dhanoa, S. Lopez, and A. Bannink: 2000. Estimating the extent of degradation of ruminant feeds from a description of their gas production profiles observed *in vitro*: Derivation of models and other mathematical considerations. *Br J. Nutr.* 83: 143-150.
- Gandi, J., M.T. Holtzaple, A. Ferrer, F.M. Byers, N.D. Turner, M. Nagwani, and S. Chang. 1997. Lime treatment of agricultural residues to improve rumen digestibility. *Anim. Feed Sci. Technol.* 68: 195-211.
- Getachew, G., M. Blümmel, H.P.S. Makkar, K. Becker.1998. *In vitro* gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: A review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 72: 261-281.
- Getachew, G., E.J. De Peters, P.H. Robinson, and J.G. Fadel. 2005. Use of an *in vitro* rumen gas production technique to evaluate microbial fermentation of ruminant feeds and its impact on fermentation products. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123-124: 547-559.
- Giraldo, L.A., M.L. Tejido, M.J. Ranilla, and M.D Carro. 2007. Effects of exogenous fibrolytic enzymes on *in vitro* ruminal fermentation of substrates with different forage: concentrate ratios. *Anim. Feed Sci. Technol.* 16 (2): 25-30.
- Karma, D.N., and F. Zadrazil. 1986. Influence of gaseous phase, light and substrate pretreatment on fruit body formation, lignin degradation and *in vitro* digestibility of wheat straw fermented with *Pleurotus* sp. *Agric. Wastes* 18: 1-17.
- Karunananda, K., G.A. Varga, D.E. Akin, L.L. Rigsby, and D.J Royse. 1995. Botanical fractions of rice straw colonized by white-rot fungi: changes in the chemical composition and structure. *Anim. Feed Sci. Technol.* 55: 179-199.
- Krause, D.O., S.E. Denman, R. Mackie, M. Morrison, A.L. Rae, G.T. Attwood, and C.S. McSweeney. 2003. Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology, and genomics. *FEMS Microbiol. Rev.* 797: 1-31.

- Kung, L.Jr., A.O. Hession. 1995. Preventing in vitro lactate accumulation in ruminal fermentation by inoculating with *Megasphaera elsdenii*. J. Anim. Sci. 73: 250-256.
- Lowman, R.S., M.K. Theodorou, and D. Cuddeford. 2002. The effect of sample processing on gas production profiles obtained using the pressure transducer technique. Anim. Feed Sci. Technol. 97: 221–237.
- Márquez-Araque, A. T., G. D. Mendoza Martínez, S. S. González Muñoz, S. E. Búntix Dios, y O. Loera Corral. 2007. Actividad fibrolítica de enzimas producidas por *Trametes* sp. EUM1, *Pleurotus ostreatus* IE8 y *Aspergillus niger* AD96.4 en fermentación sólida. Interciencia 32 (11):780-785.
- Meneses, M., M. Villegas, S. González, L. Miranda, y O. Loera. 2009. Estudio de la composición nutrimental de paja de sorgo tratada con *Trametes* sp.EUM1 y *Pleurotus sapidus*. In: Memorias del XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Guerrero, México.
- Menke K.H., and H. Steingass. 1998. Estimation of the energetic feed value from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. Anim. Res. Develop. 28: 7-55
- Newbold, C.J., 1997. Proposed mechanisms of enzymes as modifiers of ruminal fermentation. In: Staple, C.R. (Ed). Proceedings of the 8th Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium, Univ. of Fl., USA. pp: 146-159.
- Nsereko, V.L., L.M. Rode, K.A. Beauchemin, T.A. McCallister. D.P. Morgavi, A. Furtado, Y. Wang, A.D. Iwaasa, and W.Z., Yang. 1999. Effect of feeding a fungal enzyme preparation from *Trichoderma longibrachiatum* on the ruminal microbial population of dairy cows. IX International Symposium on Rumen Physiology. Pretory. South Africa. pp: 17-22 p.
- Ørskov, E.R., and L.M. McDonald. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurement weighted according to rate of passage. J. Agric. Sci. (Cambridge) 92: 499-503

- Peláez, A. A., M. Meneses, R.L. Miranda, R.M. Megias, G.R. Barcena, y O. Loera. 2008. Ventajas de la fermentación sólida con *Pleurotus sapidus* en ensilajes de caña de azúcar. Arch. Zootec. 57(217): 25-33.
- Pitt, R. E., T.L. Cross, A.N. Pell, P. Shofield, and P.H. Doane. 1999. Use of *in vitro* gas production models in ruminal kinetics. Math. Biosci. 159: 145-163.
- Posada S.L., y R.R. Noguera. 2005. Técnica *in vitro* de producción de gases: Una herramienta para la evaluación de alimentos para rumiantes. Liv. Res. Rural Development 17:36. February 7, 2009. <http://www.cipav.org.co/lrrd/lrrd17/4/posa17036.htm>.
- Rymer, C., J.A Huntington, B.A. Williams, and D.I. Givens. 2005. *In vitro* cumulative gas production techniques: History, methodological considerations and challenges. Anim. Feed Sci. Technol. 123- 124: 9-30.
- SAS, 1999. SAS/STAT User's Guide, Version 8. Statistical Analysis System Institute Inc., Cary, NC, USA.
- SIAP, 2008 http://www.siap.sagarpa.mx/ar_compec_avan.html (consultado noviembre del 2008).
- Steel, G. R., and J. H. Torrie. 1986. Bioestadística: Principios y Procedimientos. 2da edición. Ed. McGraw-Hill. México, D.F. pp: 167-171.
- Tarkow, H., and W.C. Feist. 1969. A mechanism for improving the digestibility of lignocellulosic materials with dilute alkali and liquid ammonia. Amer. Chem. Soc. Adv. Chem. Ser. (95): 197-218.
- Theodorou, M.K., B.A. Williams, M.S. Dhanoa, A.B., McAllan, and J. France. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. Anim. Feed Sci. Technol. 48: 185-197.
- Tricarico, J.M., and K.A. Dawson. 2005. Influence of supplemental endoglucanase or xilanase on volatile fatty acid production from ruminant feed by ruminal *in vitro* cultures. Archiv. Anim. Nutri. 59 (5): 325-34

Wimer, P.J., Lopez- Guisa, and A.D. French. 1990. Effect of cellulose fine structure on kinetics of its digestion mixed microorganism in vitro. *Appl. Environ. Microbiol.* 56(26): 1-275.

CONCLUSIONES GENERALES

El tratamiento con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ y *Pleurotus sapidus* o *Fomes fomentarius*. EUM1 sobre paja de sorgo, modificó su composición nutricional, la modificación se realiza en los componentes de las paredes celulares (celulosa, hemicelulosa y lignina). *F. fomentarius* EUM1 produjo más enzimas xilanasas y lacasas en comparación con *P. sapidus*. La remoción en el contenido de lignina del esquilmo fue menor que otros componentes como la hemicelulosa o celulosa. En las variables fermentativas el cultivo con *P. sapidus* incrementó la masa microbiana en las pruebas *in vitro*, lo cual es un factor de suma importancia en el ambiente ruminal. Este último aspecto debe ser estudiado con mayor énfasis ya que según distintos referentes los cultivos sólidos con hongos de la pudrición blanca pueden generar metabolitos de gran valor nutricional o comercial. El uso combinado del tratamiento con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ y hongos no mejoro las variables fermentativas *in vitro*. Y se concluye en el análisis conjunto que el tratamiento únicamente con $\text{Ca}(\text{OH})_2$, es un tratamiento viable a nivel enzimático y de variables fermentativas.