



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GANADERÍA

“CARACTERIZACIÓN DEL RESIDUO DEL CULTIVO DE *Agaricus bisporus* Y SU UTILIZACIÓN EN DIETAS PARA OVINOS”

ANGELICA NAYUD VÁSQUEZ DOMÍNGUEZ

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE**

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

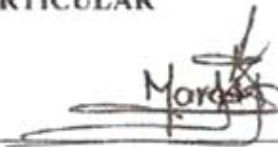
2010

La presente tesis titulada: **Caracterización del residuo del cultivo de *Agaricus bisporus* y su utilización en dietas para ovinos**, realizada por la alumna **Angélica Nayud Vásquez Domínguez**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA**


CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



DR. MARCOS MENESES MAYO

ASESOR



DR. SERGIO S. GONZÁLEZ MUÑOZ

ASESOR



DRA. MARICELA AYALA MARTÍNEZ

ASESOR



DR. OCTAVIO LOERA CORRAL

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Julio de 2010

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca No. 207680 otorgada para la realización de mi maestría.

Al Colegio de Postgraduados por ser el alma mater que me brindo la oportunidad de estudiar una maestría

Al Dr. Marcos Meneses Mayo por su apoyo y dirección durante toda mi formación académica y profesional, ya que gracias a sus consejos y conocimientos se culminó la presente investigación.

Al Dr. Sergio S. González Muñoz por su valiosa participación en la revisión de la presente tesis.

A la Dra. Maricela Ayala Martínez por su apoyo y participación en la revisión de la presente investigación.

Al Dr. Octavio Loera Corral por su participación en la revisión de la presente tesis.

Al Dr. Luis A. Miranda Romero por el valioso aporte de sus conocimientos que fueron fundamentales para que esta investigación se llevara a cabo, así como por las facilidades que nos otorgó de las instalaciones del laboratorio para realizar el proceso de la investigación.

Al Dr. Efrén Ramírez Bribiesca por su colaboración en el aporte de ideas fundamentales para la realización de la tesis.

A mis compañeros de maestría que me apoyaron en la realización de los experimentos, a los técnicos y a la Dra. Magda, que se hizo participe en mi enseñanza durante la maestría.

DEDICATORIA

Dedicó esta tesis con todo mi amor a mi madre, que es el motor que impulsa mi vida, por su apoyo incondicional y por creer en mí siempre, le agradezco el hacerme fuerte con sus consejos para no darme por vencida ante las adversidades y lograr mis metas, porque este logro también es tuyo. TE AMO.

A Sami, Fer y Naye porque siempre están conmigo en las buenas y en las malas, por su apoyo y su amor, porque son lo más grande y lo que le da sentido a mi vida. Gracias las AMO.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1 JUSTIFICACIÓN.....	4
2 OBJETIVOS.....	4
2.1 OBJETIVO GENERAL.....	4
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
3 HIPÓTESIS	4
4 REVISIÓN DE LITERATURA	4
4.1 Perspectiva del hongo <i>A. bisporus</i> y su producción en México.....	4
4.2 Nutrición, morfología y taxonomía de <i>A. bisporus</i>	5
4.3 Producción de <i>A. bisporus</i>	8
4.4 Minerales en la producción animal.....	10
4.5 Requerimientos minerales en rumiantes	11
4.5.1 Macrominerales	12
4.5.2 Microminerales.....	14
4.6 Digestibilidad de la materia seca y producción de gas <i>in vitro</i>	16
4.6.1 Tamaño y preparación de la muestra.....	16
4.6.2 Inóculo y solución amortiguadora.....	16
4.6.3 Condiciones de incubación y tiempo de lectura.....	17
5 LITERATURA CITADA	18

CAPITULO 1. CARACTERIZACIÓN BROMATOLÓGICA Y COMPOSICIÓN MINERAL DEL RESIDUO (COMPLETO Y PENSADO) DEL CULTIVO DE A. BISPORUS

1	22
1.1 INTRODUCCIÓN.....	22
1.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
1.2.1 Obtención del residuo completo y prensado del cultivo de <i>A. bisporus</i>	22
1.2.2 Caracterización bromatológica del residuo del cultivo de <i>A. bisporus</i>	23
1.2.3 Análisis Estadístico	23
1.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
1.3.1 Caracterización del residuo del cultivo de <i>A. bisporus</i>	24
1.3.2 Contenido de minerales totales en el residuo del cultivo de <i>A. bisporus</i> de 60d de cultivo	26
1.4 CONCLUSIONES.....	27
1.5 LITERATURA CITADA	28

CAPITULO 2. DIGESTIBILIDAD Y FERMENTACIÓN RUMINAL <i>IN VITRO</i> DE DIETAS PARA OVINOS ELABORADAS CON RESIDUO DEL CULTIVO DE <i>AGARICUS BISPORUS</i>	30
2	30
2.1 <i>INTRODUCCIÓN</i>	30
2.2 <i>MATERIALES Y MÉTODOS</i>	30
2.2.1 Preparación de las muestras.....	30
2.2.2 Cinética de producción de gas <i>in vitro</i>	31
2.2.3 Determinación de las variables estimadas mediante modelos matemáticos: biomasa microbiana (BM mg), energía metabolizable (EM MJ/KgMS), digestibilidad de la materia orgánica (DMO %)	31
2.2.4 Determinación de ácidos grasos volátiles (AGV) y nitrógeno amoniacal (NA) ..	32
2.2.5 Análisis estadístico	32
2.3 <i>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</i>	33
2.3.1 Digestibilidad verdadera (DV) y producción de gas <i>in vitro</i> de la MS	33
2.3.2 Variables estimadas de la fermentación ruminal <i>in vitro</i>	35
2.4 <i>CONCLUSIONES</i>	39
2.5 <i>LITERATURA CITADA</i>	40
CONCLUSIONES GENERALES	42

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Taxonomía del hongo <i>Agaricus bisporus</i>	8
Cuadro 2. Requerimientos minerales en ovinos.....	12
Cuadro 1. 1. Componentes de composta (24-25 kg).....	23
Cuadro 1. 2. Análisis bromatológico de PT, MS, MO, Cenizas, FDN y FDA (% de MS) del residuo del cultivo de <i>A. bisporus</i> completo y prensado a diferentes días de siembra.	25
Cuadro 1. 3. Porcentaje de macrominerales y microminerales en el residuo del cultivo de <i>A. bisporus</i> completo y prensado en el día 60 de siembra.....	27
Cuadro 2. 1 Dietas experimentales y su composición bromatológica.	33
Cuadro 2. 2. Variables de la cinética de producción de gas y digestibilidad ruminal in vitro de los tratamientos con diferentes proporciones del residuo completo del cultivo de <i>A. bisporus</i> del día 60 de siembra.	35
Cuadro 2. 3. Variables estimadas de la fermentación ruminal in vitro de dietas con diferentes proporciones del residuo completo del cultivo de <i>A. bisporus</i> del día 60 de siembra.	37
Cuadro 2. 4. Variables ruminales obtenidas de la digestibilidad y producción de gas in vitro a las 12 h de fermentación.	38
Cuadro 2. 5. Variables ruminales obtenidas de la digestibilidad y producción de gas in vitro a las 24 h de fermentación.	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Morfología del champiñón.....	7
Figura 2. Proceso de pasteurización del hongo	10

LISTA DE ANEXOS

ANEXO I	43
I.I. Obtención del inóculo ruminal.....	43
I.II. Preparación de la Solución Mineral Reducida (SMR).....	43

ABREVIATURAS

A. bisporus *Agaricus bisporus*

Tm Toneladas métricas

Ca Calcio

K Potasio

P Fósforo

N Nitrógeno

CO² Bóxido de carbono

CH⁴ Metano

AGV Acidos Grasos Volátiles

Mg Magnesio

Na Sodio

Cl Cloro

S Azúfre

Cu Cobre

Mo Molibdeno

Fe Hierro

Se Selenio

Zn Zinc

PT Proteína Total

MS Materia Seca

MO Materia Orgánica

C Cenizas

FDN Fibra Detergente Neutro

FDA Fibra Detergente Ácido

SO⁴ Sulfato

NO³ Nitrato

V_más Volumen máximo de gas producido

S Tasa de producción de gas

L Tiempo de retardo o fase Lag

BM Biomasa Microbiana

EM Energía Metabolizable

AGV Ácidos Grasos Volátiles

NA Nitrógeno Amoniacal

DV Digestibilidad Verdadera

Caracterización del residuo del cultivo de *Agaricus bisporus* y su utilización en dietas para ovinos

Vásquez Domínguez Angélica Nayud, MC

En México se producen anualmente 30000 t de champiñones (*A. bisporus*); cada kilogramo de producto comestible genera alrededor de 5Kg de residuos, constituidos principalmente por paja fermentada y no fermentada, tierra, residuos de material vegetativo entre otros. Los residuos del cultivo del champiñón frecuentemente son empleados directamente en la agricultura como abono, bioremediación de suelos por su alto contenido de N, Ca, P y K principalmente y en ocasiones en la alimentación animal. El objetivo del presente estudio fue caracterizar y usar el residuo del cultivo de *A. bisporus* como ingrediente en una dieta para ovinos y su estudio mediante producción de gas *in vitro*. Diversos estudios indican que el residuo fermentado por *A. bisporus* contiene una gran cantidad de enzimas fibrolíticas, sin embargo no se ha estudiado el efecto del alto contenido mineral y su acción enzimática en formulaciones para animales rumiantes. En este estudio se determinó la composición química de PT, MS, MO, FDN, FDA y cenizas a 50, 60 y 90 d de siembra del cultivo de *A. bisporus*, empleando únicamente el material residual completo (sin extracción de enzimas) y prensado (residuo posterior a extracción enzimática); se cuantificó el porcentaje de macro y microminerales del residuo completo y prensado a 60 d de siembra del champiñón. Se usó un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial de tratamientos, se analizaron los resultados con el procedimiento GLM y comparación de medias Tukey ($p \leq 0.05$). Se realizó una prueba de digestibilidad y fermentación ruminal *in vitro* de dietas para ovinos elaboradas con residuo del cultivo de *A. bisporus*. Se realizaron formulaciones con ingredientes base y con 0, 3, 6, 9, 12, 15, 20, 30 y 40%, respectivamente del residuo del champiñón. Se usó un diseño experimental completamente al azar con bloques generalizados, se analizaron los resultados con el procedimiento GLM y comparación de medias Tukey ($p \leq 0.05$). La PT se incrementó en el día 60 ($p \leq 0.01$) con respecto a los otros días de siembra; mientras que las cenizas aumentaron al día 90 ($p \leq 0.01$). La MO disminuyó con los días de siembra ($p \leq 0.01$), la FDN y la FDA disminuyeron a los 60 d con respecto al día 90 de siembra ($p \leq 0.01$), lo que sugiere que la fermentación sólida (FS) tuvo efecto positivo sobre la calidad del subproducto en estudio, observándose la misma tendencia en ambos residuos. Se presentó diferencia en el contenido de minerales ($p \leq 0.01$) para el residuo completo y prensado a excepción del Ca ($p \geq 0.01$). Los resultados indican que al aumentar el porcentaje

del residuo del cultivo de *A. bisporus* en las dietas experimentales el $V_{\text{máx}}$ (mL g MS^{-1}) se reduce ($p \leq 0.01$). Por otro lado, la dieta sin residuo comparados con aquellas dietas con inclusión de 3, 6, 9 y 12 % del residuo no tuvieron diferencias ($p \geq 0.01$), observándose la misma tendencia en la DV. Las dietas que incluyeron más del 15 % del residuo presentaron disminución en la DV ($p \leq 0.01$).

Bromatological characterization and *in vitro* digestibility of solid wastes after *Agaricus bisporus* growth and its use ovine diets

Vásquez Domínguez Angélica Nayud, MC

In Mexico, 30 000 t annually produce mushrooms *A. bisporus*, each tonne of edible product generates about 5 kg of waste, consisting mainly of fermented and unfermented straw, soil, waste and other vegetative material. The mushroom crop residues are often directly employed in agriculture as fertilizer, bioremediation of soils due to its high content of N, Ca, P and K and sometimes mainly in animal feed. The aim of this study was to characterize and use the crop residue *A. bisporus* as an ingredient in a diet for sheep and their study using *in vitro* gas production. Several studies indicate that the waste fermented by *A. bisporus* contains a large quantity of fibrolytic enzymes has not yet studied the effect of high mineral content and enzymatic activity in formulations for ruminant animals. In this study we determined the chemical composition of PT, MS, MO, NDF, ADF and ash 50, 60 and 90 d after sowing cultivation of mushrooms, using only the full residual material (without removal of enzyme) and pressing (residue after enzymatic extraction) was quantified the percentage of macro and trace the residue completely and pressing to 60 d of planting mushrooms. We used a completely randomized design with factorial arrangement of treatments, results were analyzed using the GLM procedure and Tukey comparison of means ($p < 0.05$). A test was conducted digestibility and rumen fermentation *in vitro* prepared diets for sheep farming with residue *A. bisporus*. Were made with basic ingredients and formulations with 0, 3, 6, 9, 12, 15, 20, 30 and 40% respectively of waste mushroom. Experimental design was completely randomized block generalized the results were analyzed using the GLM procedure and Tukey comparison of means ($p < 0.05$). The PT was increased at day 60 ($p \leq 0.01$) compared to other days of sowing, while Ash increased at day 90 ($p \leq 0.01$). The MO decreased with days of sowing ($p \leq 0.01$), NDF and the FDA declined to 60 d when compared to day 90 of planting ($p \leq 0.01$), suggesting that fermentation solid had a positive effect on the quality of the product under study, showing the same trend in both residues. Is present difference in mineral content ($p \leq 0.01$) for full and pressing the residue with the exception of Ca ($p \leq 0.01$). The results indicate that increasing the percentage of crop residue *A. bisporus* in the experimental diets V_{max} (mL g MS^{-1}) was reduced ($p \leq 0.01$). On the other hand, residue-free diet compared with those diets including 3, 6, 9 and 12% of the waste did not differ ($p \geq 0.01$), observing the same trend in DV. The diets included more than 15% of the residue showed a reduction in DV ($p \leq 0.01$).

INTRODUCCIÓN GENERAL

El consumo de *Agaricus bisporus* (*A. bisporus*) conocido como champiñón es el más importante en el mundo con una producción de 2 millones de t anuales (Martínez *et al.*, 2007). En el año 2000 el mayor productor de champiñón fue China con una producción de 637 304 t, seguido por Estados Unidos (391 000 t), los Países bajos, Francia e Italia con producciones de 263 000; 180 000; 102 000 t, respectivamente (Chang y Miles, 2004). En el año 2007, México produjo aproximadamente 45,260 t (Martínez *et al.*, 2007).

El alto valor nutrimental del champiñón, hace de este un alimento con un excelente contenido en proteínas y aminoácidos esenciales (triptofano, treonina, lisina y metionina), además de aportar un contenido importante de vitaminas del complejo B y minerales como calcio (Ca), potasio (K) y fósforo (P). Martínez *et al.*, (2007) indican que en México existe un consumo considerable de este hongo comestible para la alimentación humana, lo que ha generado en las empresas champiñoneras un exceso de residuos derivados de una alta producción; por lo que estas empresas han recurrido a utilizarlos en la agricultura y horticultura incorporándolos a terrenos de cultivo, y como ingrediente en la alimentación animal, limitando su uso por las altas concentraciones en minerales. El depósito de residuos del cultivo de champiñón en cuerpos de agua y suelo, causa un problema de eutroficación, por los altos niveles de nitrógeno (N) y minerales (Ca, P y K), generando acumulación de nitratos y nitritos, fósforo, azufre, calcio, magnesio, manganeso, sodio y sílice (García y Dorronsoro, 2005). Williams *et al.*, (2001) indican que industrialmente se generan por cada kilogramo de champiñón producido cerca de 5 kg de residuo, por lo que en países del noroeste de Europa la producción de *A. bisporus* no es permitida sin antes dar solución al problema de acumulación de residuos. La alimentación es uno de los aspectos más importantes y de mayor peso económico en una explotación pecuaria, por lo que se han buscado alternativas para mejorar la utilización de nutrientes en especial de los forrajes, por lo que la adición de enzimas fibrolíticas exógenas en los alimentos para rumiantes puede ser una alternativa, al tener efecto sobre la hidrólisis de los carbohidratos estructurales de la pared celular, haciendo disponibles los nutrientes para los microorganismos del rumen (Moreno *et al.*, 2007). La aplicación *in vitro* de forma exógena de enzimas producidas por hongos y bacterias (lacasas, xilanasas, celulasas) mejoran la digestión de la materia seca y de la fibra detergente neutro, sugiriendo que la adición directa de éstas, al alimento mejoran la utilización del forraje (Yescas *et al.*, 2004), por tal motivo, la

incorporación de residuos del subproducto del cultivo de *Agaricus bisporus* en la producción pecuaria representa una ventaja, ya que el micelio del hongo actúa sobre el sustrato, produciendo enzimas que ayudan a la predigestión ó degradación de la fibra en la composta, haciendo que esta sea más disponible para los animales rumiantes (Ayala *et al.*, 2007).

Al respecto, se han realizado investigaciones sobre la utilización del residuo del cultivo de *A. bisporus* para la extracción de enzimas (Semple y Fermor, 1997) y recientemente Trejo-Hernández *et al.*, (2001) obtuvieron resultados positivos de la acción de estas enzimas en la degradación de hidrocarburos complejos provenientes de la industria petroquímica. Estos residuos también se han utilizado como fertilizante en la agricultura y como mejoradores de suelos (Westerman y Bicudo, 2005) además de ser empleados en la generación de electricidad, gas y combustibles (Williams *et al.*, 2001; Westerman y Bicudo, 2005).

Estos residuos tienen una diversidad de enzimas celulasas, lacasas, xilanasas, proteasas y lipasas (Ayala *et al.*, 2010) capaces de degradar sustratos lignocelulósicos, por lo que la combinación de estas actividades enzimáticas son las responsables de degradar los complejos polímeros que se encuentran en la composta (Baldrian y Jirí 2003). Así después de haber cosechado el hongo, en el residuo podemos encontrar diversos grupos enzimáticos: celulasas (endocelulasas), que hidrolizan la celulosa en azúcares simples (glucosa y celobiosa) que son asimilables por el micelio de *A. bisporus*; las xilanasas, otro grupo de enzimas extracelulares presentes en la composta que utilizan como sustrato el xilano, segundo polímero más importante en los rastros. Las lacasas, utilizadas por los hongos degradadores de la madera para degradar lignina (Arce, 2007). Además de este tipo de residuos se puede obtener proteína extracelular, que es la fuente más abundante de nitrógeno disponible para el hongo en la composta, convirtiendo ésta en proteína microbiana (Moore y Chiu, 2002). Ayala *et al.*, 2010 midieron la actividad enzimática del extracto del residuo de la cosecha de *A. bisporus* a diferentes días de cultivo (50, 60 y 90d) obteniendo actividad de xilanasas, celulasas, lacasas y proteína soluble, encontrando que la mejor respuesta se obtuvo a 50 y 60 d de cultivo en el residuo de champiñón, para xilanasas, celulasas y proteína, en cambio para lacasas a 90 d, concluyendo que es posible extraer enzimas del residuo del champiñón, y utilizarlo como aditivo en la alimentación de rumiantes. Otro estudio relacionado con la actividad enzimática de hongos fue realizado por Márquez-Araque *et al.*, 2007 en el que estudiaron la actividad enzimática de xilanasas, celulasas y lacasas de *Trametes sp.*, *Pleurotus ostreatus* y *Aspergillus*

niger a los 14 y 19 d de fermentación sólida en bagazo de caña de azúcar, encontrando que las xilanasas y celulasas producidas por *Trametes sp* mostraron la mayor actividad. La actividad de estas enzimas en *P. ostreatus* y *A. niger* fueron menores que *Trametes sp*. La mayor actividad de lacasas fue expresada por *P. ostreatus*, concluyendo que *Trametes sp*. tiene potencial para la producción de enzimas exógenas con posible aplicación comercial particularmente para la alimentación de rumiantes.

Se ha empleado el residuo de *A. bisporus* en la alimentación de diversas especies pecuarias ovejas, cabras y carpas, por su alto contenido proteínico (Grodzinskaya *et al.*, 2002; Rinker 2007). Los animales rumiantes tienen la capacidad de degradar los hidratos de carbono complejos (celulosa, hemicelulosa y lignina) de los forrajes y subproductos agrícolas, por lo que la degradación del alimento se realiza mayoritariamente por digestión fermentativa y no por acción de enzimas digestivas. Por esta razón se debe tener presente que al alimentar a los rumiantes, primero se deben cubrir las necesidades de los microorganismos ruminales y posteriormente del animal (Relling y Mattioli, 2003). La fibra se degrada en el rumen lentamente por acción de las bacterias celulolíticas, el proceso inicia con la adhesión de las bacterias a la pared vegetal, a una velocidad inversamente proporcional con el grado de lignificación de esta pared; por la acción de las celulasas y hemicelulasas y varía según la composición del forraje. Así, las bacterias celulolíticas producen glucosa o pentosas como productos intermedios, y utilizan vías fermentativas que conducen a la producción de acetato como producto final (Carrillo, 2003). Es relevante en la producción ganadera la predicción del consumo de alimento, uso de los forrajes, para obtener la relación entre productos finales de la digestión, producción, metabolismo animal y microbiano.

Para lograr este objetivo es necesario un adecuado análisis bromatológico, para identificar los contenidos nutritivos de los ingredientes y así clasificarlos en función de su contenido proteínico y cantidad de fibra (Pedraza, 2001). Por tanto, el valor nutritivo de los alimentos se determina por la biodisponibilidad de nutrientes y dinámica de los procesos de solubilización e hidrólisis en el tracto gastrointestinal. Otros estudios de digestibilidad *in vitro* e *in situ* estiman la desaparición de la materia seca y de la materia orgánica de los alimentos para rumiantes (Rosero y Posada, 2007) mientras que para la desaparición del sustrato se ha propuesto la medición de la producción acumulada de gas, como indicador del metabolismo del carbono, y la acumulación de productos finales de la fermentación: bióxido de carbono

(CO₂), metano (CH₄) y ácidos grasos volátiles (AGV). Este sistema presenta la ventaja de que el producto final que se mide (gas), es resultado directo del metabolismo microbiano, en lugar de sólo registrar la desaparición de sustrato como es el caso de la digestibilidad *in vitro* e *in situ* (Bruni y Chilibroste 2001).

1 JUSTIFICACIÓN

Al utilizar el residuo del cultivo de *A. bisporus* para darle valor agregado, se evita su acumulación, ofreciéndolo como ingrediente en dietas para ovinos, infiriendo que el subproducto contiene metabolitos de interés nutricional y enzimas fibrolíticas producidas durante el cultivo del champiñón.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el residuo del cultivo de *A. bisporus* como ingrediente en una dieta para ovinos mediante producción de gas *in vitro*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Analizar la composición bromatológica del residuo del cultivo de *A. bisporus*: completo y prensado a los 50, 60 y 90 d de cultivo del champiñón.

2.2.2 Evaluar el efecto de diferentes porcentajes del residuo del cultivo de *A. bisporus* (0, 3, 6, 9, 12, 15, 20, 30 y 40 %) sobre la digestibilidad de la materia seca y producción de gas *in vitro*, en una dieta para ovinos.

3 HIPÓTESIS

La utilización del residuo del cultivo de *A. bisporus* como ingrediente en una dieta para ovinos, cubrirá los requerimientos nutricionales de los animales que lo consuman y mejorará la digestibilidad de los componentes fibrosos y coadyuvará evitando contaminaciones indeseables.

4 REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 Perspectiva del hongo *A. bisporus* y su producción en México

La industria de los hongos comestibles ha tenido un gran desarrollo durante los últimos 32 años a nivel internacional incrementando la producción mundial 17 veces (Medina, 2004), llegando a una producción de 7 millones de t por año, cuyo valor aproximado supera los 30 billones de dólares. La tasa promedio de incremento anual en la producción de hongos es superior al 11 %. (Martínez *et al.*, 2007). A nivel mundial el champiñón (*A. bisporus*) es el

hongo comestible más importante con una producción de 2 millones de t anuales. Para el año 2000 el país con mayor producción fue China con 637 304 t, seguido por Estados Unidos con 391 000 t, Los Países bajos con 263 000 t, 180 000 t en Francia y 102 000 t en Italia (Chang y Miles, 2004). México en el 2007, se benefició con una producción de 45,260 t/año (Martínez *et al.*, 2007). La importancia ecológica de esta actividad radica en la utilización de los subproductos agrícolas, agroindustriales y forestales como sustratos para el cultivo de los hongos (Martínez *et al.*, 2007), siendo desechos ricos en lignocelulosa, representando cerca del 40 % de la biomasa producida por la fotosíntesis y que no puede ser aprovechada en forma directa para la alimentación humana y animal, por su baja digestión, el cultivo de los hongos sugiere un proceso de bioconversión de estos desechos (Grodzinskaya *et al.*, 2002).

Los hongos lignocelulíticos enriquecen los sustratos vegetales mediante la producción de enzimas, vitaminas y minerales, ya que en el proceso de fermentación los hongos degradan lignina y celulosa. El sustrato utilizado por el hongo, puede ser utilizado como abono orgánico, debido a que el micelio es fuente de fitohormonas y sustancias biológicamente activas como son las enzimas (Grodzinskaya *et al.*, 2002).

4.2 Nutrición, morfología y taxonomía de *A. bisporus*

Los hongos se han adscrito al Reino Vegetal, a pesar de no tener clorofila, tejidos especializados, ni flores, forman parte de un grupo llamado Reino de los hongos o Reino *fungi*. La pared celular de los hongos está compuesta de quitina y glicoproteínas (Pónton, 2008) como la de los animales, y no de lignina y celulosa como los vegetales. Los hongos almacenan glucógeno y no almidón. La palabra *fungi* (singular *fungus*), significa florecimiento o excrecencia de la tierra, la que concuerda con la denominación purépecha de los pobladores de Michoacán (México) “*echeri uetsikuaro anganaka*”, que significa nacido de la tierra (Guzmán *et al.* 2002). Los hongos viven de la materia orgánica, ya sea viva o muerta, la cual degradan para alimentarse de ella. Para el buen crecimiento del hongo es necesario que el sustrato contenga los nutrientes necesarios, como carbono, fósforo y nitrógeno, ya que los utiliza como fuente de energía para la elaboración de sustancias estructurales de la célula. Entre los compuestos más comunes están los carbohidratos (mono y polisacáridos), ácidos orgánicos, aminoácidos, algunos alcoholes y lignina. Como se había mencionado con anterioridad los hongos son capaces de aprovechar los componentes de los subproductos agrícolas, agroindustriales o forestales, conteniendo celulosa (40-60 %), hemicelulosa (15-50

%) y lignina (10-30 %), siendo esta última de los componentes más difíciles de degradar (Guzmán *et al.* 2002). El hongo necesita nitrógeno para convertirlo en proteína; empleando aminoácidos, peptona, sulfatos y nitratos de amonio. Los minerales que necesita el hongo son el hierro, cobre, magnesio, sodio, potasio, calcio y fósforo, los cuales pueden ser adicionados en forma de cloruros, fosfatos y carbonatos. El empleo de vitaminas como la tiamina y fitohormonas (ácido giberélico) ayudan al crecimiento del micelio del hongo.

Su incomparable gusto y aroma, alto contenido de proteínas, así como la presencia de vitaminas y minerales atestiguan su valor en la dieta humana. Datos recientes indican la presencia de compuestos biológicamente activos como anticancerígenos, estimulantes de la función hepática, inmunomoduladores y controlan los niveles de colesterol (Wasser y Weiss, 1999; Stamets, 2000).

El hongo comestible *A. bisporus*, puede degradar sustratos lignocelulósicos como esquilmos agrícolas, subproductos agrícolas, agroindustriales y maderables (Martinez *et al.*, 1984) ya que es un hongo saprófito, que crece sobre la madera en descomposición (González, 1991), es rico en proteínas y contiene aminoácidos esenciales como el triptófano, treonina, lisina y metionina, vitaminas del complejo B y minerales como calcio (Ca), potasio (K) y fósforo (P), por lo que es una fuente importante de nutrientes para la alimentación humana y animal, además de producir enzimas extracelulares lacasas, que degradan lignina, facilitando que el hongo utilice la celulosa y hemicelulosa de la paja fermentada (Rimko *et al.*, 2003). El uso de la fermentación sólida para el enriquecimiento proteico de subproductos lignocelulíticos, ha sido aceptado debido a sus bajos requerimientos de tecnología, ya que reduce el volumen por unidad de peso de sustrato convertido. La fermentación sólida puede ser definida como un cultivo de microorganismos (bacterias, levaduras y hongos) adheridos a un soporte sólido poroso y humedecido en el cual el medio líquido está extendido en una capa muy fina en contacto con una interface aérea (Sarıkaya, *et al.*, 1999; Cira, *et al.*, 2002; Bastida y Velásquez, 2004; Muller dos Santos, *et al.*, 2004).

En un champiñón se distinguen las siguientes partes (Fig. 1):

- ✓ **Sombrero.** Es la parte más carnosa del hongo; tiene forma redondeada, globosa, que recuerda a la de un paraguas; su tamaño alcanza hasta 15 cm de diámetro.

- ✓ **Pie o estipe.** Es la parte del hongo que sirve de soporte al sombrero; tiene forma cilíndrica, es liso, blanco y por su parte inferior está unido al micelio o filamentos del hongo que crecen en el sustrato.
- ✓ **Himenio.** Está situado en la parte inferior del sombrero y está formado por numerosas laminillas, dispuestas a manera de radios, que van desde el pie hasta el borde externo del sombrero. El color de las laminillas es rosado al principio, después se vuelve pardo e incluso negro. Cuando el hongo es pequeño el himenio está protegido por una fina membrana llamada velo, que está unida al sombrero y al pie. Cuando el champiñón alcanza su completo desarrollo, este velo se rompe y sólo queda de él un pequeño trozo unido al pie, llamado anillo.
- ✓ **Laminillas:** entre estas se encuentran millones de esporas, que cuando germinan dan lugar a unos hilillos o filamentos, que constituyen el micelio o "blanco" del champiñón.

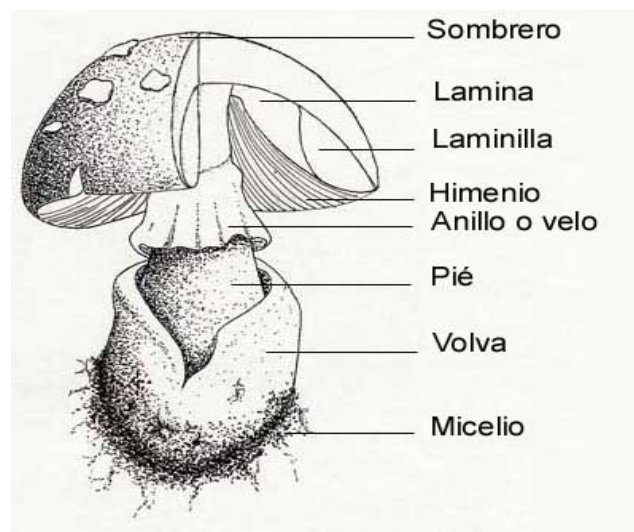


Figura 1. Morfología del champiñón

Cuadro 1. Taxonomía del hongo *Agaricus bisporus*.

Reino:	Hongos
División:	Basidiomycota
Clase:	Agaricomycetes
Subclase:	Homobasidiomycetidae
Orden:	Agaricales
Familia:	Agaricaceae
Género:	<i>Agaricus</i>
Especie:	<i>Agaricus bisporus</i>

4.3 Producción de *A. bisporus*

El proceso de producción del champiñón incluye siete fases:

- 1) **Fermentación al aire libre (compostaje).** Este proceso comprende la mezcla y fermentación de la composta. Tiene una duración de tres semanas. Esta fase comprende dos etapas: la etapa I; es el paso en donde las materias primas como paja, pollinaza (fuente de nitrógeno) (Kenji *et al.*, 1994) y sulfato de calcio son mezcladas, humedecidas y colocadas en un silo tipo bunker aireado. En la etapa II se comienza la fermentación debido a la actividad de los microorganismos que crecen en ella. Este proceso tarda 7 d. Las pilas deben ser volteadas dos o tres veces, para mezclar el agua y redistribuir las materias primas para que sea un proceso más homogéneo (Royse, 2007).
- 2) **Fermentación controlada.** La fase II puede durar 6-8 d, según la habilidad de los microorganismos para convertir el amonio en proteína microbiana. En esta etapa se pasteuriza (50 °C a 24 °C) y acondiciona controlando la temperatura (25-28 °C), la aireación, la concentración de los gases y la humedad relativa (Fig. 2) (Sánchez *et al.*, 2004; Royse, 2007). Gea (1997) y Arce (2007) indican que si el proceso de composteo se realizó correctamente, se obtendrá una composta con las siguientes características: pH de 7.3 (± 0.2); humedad de 66% (± 3); nitrógeno total de 2.05% (± 0.15); materia orgánica de 73% (± 3); cenizas de 27% (± 3); relación carbono/nitrógeno (C/N) 17.6% (± 1.63); libre de amoníaco residual, de parásitos y competidores.
- 3) **Siembra y crecimiento vegetativo.** La semilla consiste en un grano esterilizado, que es colonizado por el micelio del hongo y usado para sembrar la composta (Royse,

2007). La semilla debe distribuirse cuidadosamente en toda la composta. La tasa de semilla que se utiliza es de aproximadamente del 1% del peso fresco del sustrato (Gea, 1997) (100-150 g de semilla a 4 °C/18 kg⁻¹ de composta). Una vez sembrado el inóculo en la composta, los bloques se trasladan a los cuartos de cultivo en donde se lleva a cabo la incubación, en donde es necesario tener un control de la temperatura, humedad y concentración de CO₂.

- 4) **Cobertura.** Una capa de tierra de cobertura sobre la composta es necesaria para obtener una buena producción de hongos. La principal función de la tierra de cobertura es mantener la humedad y suplir de agua al micelio y los cuerpos de fructificación estimulando la formación de los champiñones, es importante que esta capa sea homogénea y que tenga un espesor apropiado de 2 a 4 cm. La tierra se desinfecta con formalina. Además se le agrega carbonato de calcio para incrementar el pH y se mantenga entre 7.0-7.7 (Gea, 1997).
- 5) **Inducción.** Después de 7 a 9 d de haber puesto la tierra de cobertura, tiene lugar la producción del micelio en la superficie de la tierra, tiempo en el que se da paso a la formación de los carpóforos, interrumpiéndose el crecimiento vegetativo del micelio e induciéndose la etapa de fructificación (Gea, 1997).
- 6) **Producción.** La producción de los hongos ocurre en cortes o cosechas, en las cuales el pico de producción se presenta aproximadamente cada 7 d. La mayoría de los productores realiza 2-3 cortes y termina porque la producción declina después del segundo corte (Arce, 2007).
- 7) **Cosecha.** Se cosecha dándole vuelta y se jala. El tallo y raíz se queda con tierra de cobertura pero se le retira con la navaja. Se cosecha con la mano izquierda y se corta el tallo con la mano derecha. Durante la fase de cosecha es importante mantener una humedad relativa adecuada (85%), debe haber mayor ventilación para obtener evaporación, desde la aparición de los champiñones hasta la cosecha (Arce, 2007).

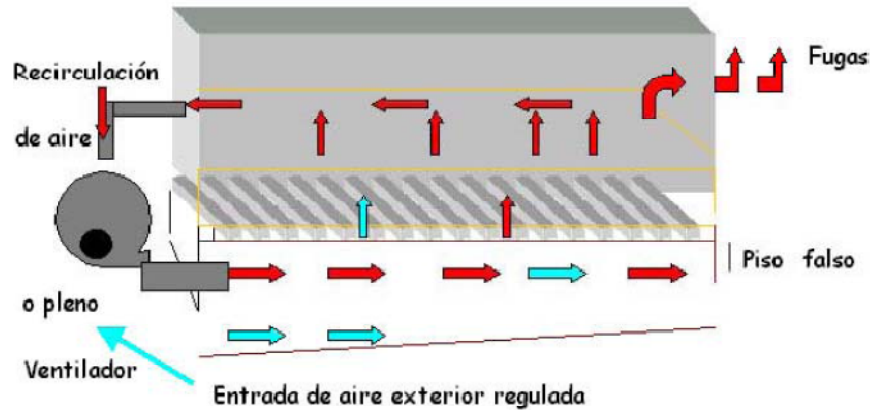


Figura 2. Proceso de pasteurización del hongo

4.4 Minerales en la producción animal

Todos los tejidos animales y vegetales contienen elementos inorgánicos o minerales en proporciones variables. Los elementos inorgánicos existen en las cenizas principalmente como óxidos, carbonatos y sulfatos, así que el porcentaje del total de cenizas es más alto que la suma de los elementos inorgánicos determinados individualmente (Underwood, 1981). Un mineral posee una composición química definida, la cual puede variar de ciertos límites, posee una disposición ordenada de átomos de los elementos de que está compuesto, y esto da como resultado el desarrollo de superficies planas conocidas como caras. Si el mineral ha sido capaz de crecer sin interferencia, las caras pueden intersecarse para producir formas geométricas características, conocidas como cristales (Church, 1993).

El término “disponibilidad biológica” es un concepto importante en el metabolismo mineral, se define como la proporción de un nutriente presente en el alimento, determinada generalmente químicamente, que puede ser absorbida por un animal y utilizada por los tejidos para realizar funciones biológicas (Church, 1993).

Aunque la mayoría de los elementos minerales se encuentran en los tejidos animales, hay minerales que el organismo no puede sintetizar por lo que hay que adicionarlos a la dieta para su asimilación. La expresión “elementos minerales esenciales” se reserva para aquellos que han demostrado realizar funciones metabólicas en el organismo. Para que un elemento mineral se considere esencial, es necesario comprobar que las dietas en las que falta el elemento provocan síntomas de deficiencia en los animales, y que dichos síntomas pueden curarse o prevenirse al incluir en la dieta experimental el elemento en cuestión (McDonald, 1975).

La clasificación de los minerales esenciales en macroelementos y microelementos o elementos traza, depende de su concentración en los animales o las cantidades necesarias en la ración. Normalmente, los elementos traza se encuentran en el organismo animal en cantidades inferiores a 50 mg/kg y son necesarios en cantidades inferiores a los 100 mg/kg de ración (McDonald, 1975). Aproximadamente el 5 % del peso vivo de un animal son minerales (McDowell, 1997). Casi todos los elementos minerales realizan una o varias funciones catalíticas en la célula. Algunos minerales están firmemente ligados a las proteínas enzimáticas, en tanto que otros forman parte de grupos prostéticos en forma de quelatos. Los quelatos son compuestos cíclicos constituidos por una molécula orgánica y un ión metálico, que se mantiene en el interior de la molécula orgánica como si estuviera sujeto mediante pinzas (McDonald, 1975). Pero ante todo, forman parte del esqueleto de los animales, también son constituyentes esenciales de los tejidos blandos y de los líquidos del organismo (Morrison 1985). Las interacciones entre minerales constituyen un aspecto importante en nutrición animal, ya que los desequilibrios entre elementos minerales a diferencia de las deficiencias en un solo mineral, son importantes en la etiología de diversos trastornos de la nutrición de los animales. Otro factor a tener en cuenta es que la mayoría de los minerales son tóxicos pudiendo provocar enfermedades o incluso la muerte si se administran en cantidades excesivas. Este hecho es especialmente evidente con el cobre, selenio, molibdeno, flúor, vanadio y arsénico (McDonald, 1975).

4.5 Requerimientos minerales en rumiantes

Muchos factores afectan los requerimientos minerales, incluyendo la naturaleza y el nivel de producción, la edad, la forma química y el nivel de los elementos en los alimentos, las interrelaciones con otros nutrientes, consumo del suplemento mineral, la raza y la adaptación animal.

Los requerimientos para ovinos se presentan en el cuadro 2:

Cuadro 2. Requerimientos minerales en ovinos.

MINERAL	UNIDAD DE MEDIDA	REQUERIMIENTO
Sodio	%	0.09-0.18
Calcio	%	0.20-0.82
Fósforo	%	0.16-0.38
Magnesio	%	0.12-0.18
Potasio	%	0.50-0.80
Azufre	%	0.14-0.26
Yodo	ppm	0.10-0.80
Hierro	ppm	30-50
Cobre	ppm	7-11
Molibdeno	ppm	0.5
Cobalto	ppm	0.1-0.2
Manganeso	ppm	20-40
Zinc	ppm	20-33
Selenio	ppm	0.1-0.2

Fuente: NRC, 1985

A continuación se presentan las características de los elementos más representativos en nutrición animal:

4.5.1 Macrominerales

Calcio

El calcio es el elemento mineral más abundante en el organismo animal. Es componente importante de los huesos y dientes, en los cuales se encuentra aproximadamente, el 99 % del calcio total del organismo; en la sangre, el calcio que se encuentra en tejidos suaves es aproximadamente el 1 %, con la mayor concentración en el plasma de la sangre, es componente esencial de las células vivas y líquidos tisulares. Resulta esencial para el funcionamiento de diversos sistemas enzimáticos, como la transmisión de impulsos nerviosos y los responsables de las propiedades contráctiles de los músculos. Interviene en la mineralización de los huesos, en la coagulación de la sangre e integridad de membranas y transporte en membranas plasmáticas, liberación de hormonas y neurotransmisores (Harper, 1988, McDowell, 1997 y McDonald, 1975). La relación de calcio: fósforo más adecuada para los animales es 2:1, aunque existen pruebas de que los rumiantes pueden tolerar relaciones más amplias, siempre que estén cubiertas las necesidades de fósforo (McDonald, 1975 y McDowell, 1997).

Fósforo

Esencial en formación y mantenimiento de huesos y dientes, para secreción normal de leche, producción de músculo y huevo, componente de ácidos nucleicos (transmisión genética y control del metabolismo celular), con otros elementos mantiene balance ácido-base y osmótico, importante en muchas funciones metabólicas, utilización de energía (glucosa-6-P, triosa-P, 3-P-adenosina), formación de fosfolípidos, metabolismo de aminoácidos, componente y activador de muchos sistemas enzimáticos y también está implicado en el control del apetito y la eficiencia de la utilización de los alimentos. Es esencial para el buen funcionamiento de los microorganismos del rumen, especialmente los que digieren la celulosa de las plantas (McDonald, 1975 y McDowell, 1997).

Magnesio

El Mg se encuentra estrechamente relacionado con el Ca y P. Aproximadamente, el 70 % del Mg total se encuentra en el esqueleto y el resto repartido en los tejidos blandos y en líquidos orgánicos. Es el activador más común de las enzimas, por ejemplo en los sistemas que tienen el pirofosfato de tiamina como cofactor, es esencial para la activación de las fosfato transferasas, activa la piruvato carboxilasa, piruvato oxidasa y en las reacciones del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Esencial en el metabolismo de los carbohidratos y lípidos, interviene en la respiración celular, formando complejos tri, di y monofosfatos con la adenosina. La formación del AMPc y otros mensajeros necesitan de Mg. Es absorbido en el rumen (McDonald, 1975 y McDowell, 1997).

Potasio

El potasio es el tercer elemento mineral más abundante en el cuerpo animal y es el principal catión del fluido intracelular. También es constituyente del líquido extracelular donde tiene influencia en la actividad del músculo. Realiza funciones importantes en la regulación osmótica y en el mantenimiento del equilibrio ácido-base. Interviene en la excitabilidad nerviosa y muscular, participando en el metabolismo de los lípidos. Hay un balance iónico entre el K, Na, Ca y Mg. El K de los alimentos se supone que es casi totalmente absorbible para los rumiantes (McDonald, 1975 y McDowell, 1997).

Sodio y Cloro

El Na y el Cl se encuentra en los tejidos blandos y líquidos orgánicos. Al igual que el K intervienen en el mantenimiento del equilibrio ácido-base y en la regulación osmótica. El Na

es el principal catión del plasma y demás líquidos extracelulares. El Na también participa en la transmisión de los impulsos nerviosos, así como en la absorción de los azúcares y aminoácidos. El Cl realiza una importante función en la secreción gástrica en la que se encuentra en forma de ácido clorhídrico y de cloruros, además es necesario para la activación de la amilasa. Estos dos elementos funcionan como electrolitos y están involucrados a nivel celular en el metabolismo del agua y consumo de nutrientes. La transferencia de Na, Cl y de agua tiene lugar a través de la pared del rumen como respuesta a la presión osmótica del líquido ruminal (McDonald, 1975 y McDowell, 1997).

Azufre

El azufre es importante en la síntesis de proteína desde dos importantes aminoácidos, metionina y cistina que contienen S. El S forma parte de las vitaminas, tiamina y biotina, la hormona insulina y del compuesto estructural condroitín sulfato, forma parte del cartílago, hueso, tendones y paredes de los vasos sanguíneos. Es importante en el proceso respiratorio desde la hemoglobina hasta los citocromos. Interviene en el metabolismo de las grasas y carbohidratos, coagulación de la sangre, función endocrina y en el balance ácido-base. Los ruminantes pueden utilizar eficazmente el sulfato de la dieta para la síntesis de aminoácidos, debido a que el sulfato es reducido a sulfito en el rumen por las bacterias, con un pH máximo de 6.5. Mediante el metabolismo de las proteínas también se libera sulfuro dietético que puede ser incorporado a la proteína microbiana. La formación de S en el rumen ejerce efectos adversos sobre la biodisponibilidad del Cu al formarse sulfuro cúprico insoluble. También influye en la captación del Se. El S puede ser absorbido directamente desde el rumen y es absorbido rápidamente desde el intestino delgado (McDonald, 1975 y McDowell, 1997).

4.5.2 Microminerales

Cobre y Molibdeno

El Cu es requerido para la respiración celular, formación de los huesos, para una correcta función cardíaca, desarrollo de tejido conectivo, pigmentación de tejidos, síntesis de prostaglandinas y formación de elastina aórtica. Es un componente de la citocromo oxidasa, que es importante en la fosforilación oxidativa. Forma parte de proteínas de la sangre como la eritrocupreína. El Cu es necesario para la pigmentación del pelo, piel y lana. Se encuentra en el hígado que actúa como reservorio principal del organismo. Las funciones del Mo con independencia de sus reacciones con el Cu, se requiere para el crecimiento, oxidación celular,

metabolismo de las purinas y pirimidinas e interviene posiblemente en el metabolismo del Fe. El Cu es segregado antes del intestino delgado y absorbido en el resto del conducto. La absorción del Mo se realiza en el abomaso e intestino delgado (McDonald, 1975 y McDowell, 1997).

Hierro

Más del 90 % del Fe en el organismo se encuentra combinado con proteínas, la más importante es la hemoglobina, que contiene aproximadamente 3.4 g/kg. También se encuentra en el suero sanguíneo, unido a una proteína llamada transferrina, cuya función es el transporte del Fe en el organismo. La ferritina, es otra proteína que contiene hasta 200 g/kg y se encuentra en el hígado, bazo, riñón y médula ósea y sirve como reserva de Fe. El Fe realiza funciones relacionadas con las enzimas de la cadena de transporte de electrones (citocromos). Entre las enzimas que contienen Fe son las catalasas, peroxidasas, fenilalanina hidroxilasa, entre otras. La absorción del Fe se da más en el duodeno y parte alta del yeyuno (McDonald, 1975 y McDowell, 1997).

Selenio

El Se es esencial para funciones como el crecimiento, la reproducción, prevención de varias enfermedades y protección de la integridad de los tejidos. El selenio forma parte de la glutatión peroxidasa (GSH-Px), enzima que cataliza la eliminación del peróxido de hidrógeno, con lo que protege a las membranas de la oxidación. La glutatión peroxidasa contiene 4 átomos de Se. El Se tiene un efecto ahorrador de vitamina E facilitando su absorción. La vitamina E y el Se intervienen en el sistema inmunitario y proporcionan protección contra la intoxicación por metales pesados. El Se es absorbido principalmente entre el duodeno y el íleon y se excreta en el duodeno. Los microorganismos del rumen pueden incorporar Se en selenoaminoácidos, aunque el Se se une más firmemente a la proteína microbiana (McDonald, 1975 y McDowell, 1997).

Zinc

Aunque se ha encontrado Zn en todos los tejidos del organismo, tiende a acumularse en los huesos más que en el hígado. Se encuentra en gran cantidad en la piel, pelo y lana de los animales. Algunas enzimas de los animales contienen Zn como la carbónico anhidrasa, carboxipeptidasa pancreática, lactato deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa, fosfatasa alcalina y timidina quinasa. Interviene en la replicación y diferenciación celular,

especialmente en el metabolismo del ácido nucleico. Otras funciones del Zn son la producción, conservación y secreción de hormonas, interviene en el sistema inmune y en el balance de electrolitos. El intestino delgado es el principal órgano para la absorción y excreción de Zn en los rumiantes (McDonald, 1975 y McDowell, 1997).

4.6 Digestibilidad de la materia seca y producción de gas *in vitro*

La degradación de alimentos por los microorganismos del rumen produce gas. El estudio de la producción de gas *in vitro* puede ser utilizado para describir la digestibilidad del forraje y la cinética de fermentación ruminal de los alimentos (Pulido *et al.*, 1998). En la técnica *in vitro* de Theodorou *et al.*, (1994), al medir la producción periódica de gas en un solo frasco de fermentación, es una alternativa para reducir la necesidad de los estudios con gran número de muestras. Una de las técnicas que permite la predicción de la fermentación del alimento en los rumiantes es la producción de gas *in vitro*, el alimento es incubado con un amortiguador de pH en el líquido ruminal y el gas producido por la incubación *in vitro* de un sustrato está íntimamente relacionado con su digestibilidad y por tanto con su valor energético (Pedraza 2001; Sanginés *et al.*, 2001; Rymer *et al.*, 2005). Theodorou *et al.*, (1994) propusieron el empleo de botellas cerradas en vez de jeringuillas, y utilizar un medidor de presión para estimar la cantidad de gas producido. La mayor innovación del método de producción de gas es la medición de la producción de gases proveniente de la degradación de la muestra, en lugar de medir directamente dicha degradación.

4.6.1 Tamaño y preparación de la muestra

Los sustratos deben ser molidos a través de una criba de 1mm para garantizar una mejor homogeneidad. Se adiciona 0.5 ± 0.05 g de sustrato (alimento) previamente secado en estufa de aire forzado a 65 ° C por 48 o 72 h (Pedraza 2001; Rymer *et al.*, 2005).

4.6.2 Inóculo y solución amortiguadora

La relación ideal solución amortiguadora:líquido ruminal debe ser de 2:1 cuando se comparan muestras, pero no será así cuando se realicen estudios del inóculo; el amortiguador debe ser capaz de neutralizar los ácidos grasos volátiles producidos durante la fermentación con el fin de mantener constante el pH; también debe suministrar todos los nutrientes necesarios para una actividad microbiana óptima (Bueno *et al.*, 2005). Se adicionan 100 mL del inóculo ruminal por cada frasco bajo flujo continuo de CO₂. La cantidad de gas producido durante la fermentación es el resultado de los gases finales de la fermentación, el CO₂, CH₄ y el H₂ del

sustrato, así como del CO₂ liberado por el buffer. Se debe tomar el líquido ruminal antes de que el animal se alimente, ya que la actividad microbiana es más constante (Pedraza 2001; Rymer *et al.*, 2005).

4.6.3 Condiciones de incubación y tiempo de lectura

Los frascos se deben colocar (color ámbar) en un baño maría a 39 °C. Para forrajes el tiempo de lectura es generalmente de 3, 6, 12, 24, 48, 72 y 96 h, pero para concentrados es necesario tomar mediciones más frecuentemente en las primeras 24 h. Se extrae el excedente de CO₂ usando un manómetro, hasta igualar la presión del frasco a cero (Pedraza 2001; Rymer *et al.*, 2005).

5 LITERATURA CITADA

- Arce C., O. 2007. "Alternativas de suplementación en composta para la producción de *Agaricus bisporus* y su efecto en las actividades enzimáticas". UAM-Xochimilco. Tesis de Maestría.
- Ayala M., M., S. S. González M., C. Vázquez, G. Mendoza, M., M. Meneses M., y O. Loera C. 2007. Actividad enzimática de extractos líquidos del residuo de cosecha de *Agaricus bisporus* cultivados en fermentación sólida. XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Morelia, Michoacán.
- Ayala M., M., S. S. González M., C. Vázquez C., y G. Mendoza M., 2010. "Obtención de enzimas fibrolíticas de *Agaricus bisporus* por fermentación sólida de esquilmos agrícolas para la alimentación de rumiantes". UNAM. Tesis de Doctorado.
- Baldrian P., y Jirí, G. 2003. Lignocellulose degradation by *Pleurotus ostreatus* in the presence of cadmium. FEMS Microbiology Letters 220: 235-240.
- Bastida L., A., y J. Velásquez B. 2004. Obtención de enzimas y enriquecimiento proteico. Colegio de Postgraduados. 1-17 p.
- Bruni M., A., y Chilibroste P. 2001. Artículo Invitado: Simulación de la digestión ruminal por el método de la producción de gas. Arch. Latinoam. Prod. Anim 9(1):43-51.
- Bueno C., S., I., L. S. Cabral F., S. Gobbo P., Louvandini H., S. S. Vitti, M., y L. Abdalla A. 2005. Influence of inoculum source in a gas production method. Anim.Feed.Sci. and Tech 123-124: 95-105.
- Carrillo L. 2003. Rumen y biogás. Microbiología Agrícola. Capítulo 5. <http://www.unsa.edu.ar/matbib/micragri/micagricap5.pdf>. (20 de febrero de 2010)
- Chang Shu-Ting, y P. Miles G. 2004. Mushrooms cultivation, nutritional, value, medicinal effect, and environmental *impact*. 2 (e). Editorial CRC Press.
- Church C.D. 1993. El rumiante: Fisiología digestiva y nutrición. Ed. Acribia. España.
- Cira L.A., Huerta S., y Shirai K. 2002. Fermentación láctica de cabezas de camarón (*Penaeus sp*) en un reactor de fermentación sólida. Revista Mexicana de Ingeniería Química 1:45-48.
- García I., y C. Dorronsoro. 2005. Contaminación de los Suelos. Departamento de Edafología y Química Agrícola. Universidad de Granada. España. Temas del 10 al 19 <http://edafologia.ugr.es/conta/tema00/home.htm>. (20 de Mayo de 2010)
- Gea A., F., J., y J. Tello M. 1997. Micosis del cultivo del champiñón. Ediciones Mundi-Prensa, España.

- González E. 1991. Ethnobotany of the southern Tepehuan of Durango, México: 1 Edible mushrooms. *J. Ethnobiol* 11(2):165-173.
- Grodzinskaya A., A., D. Infante H., y N. Piven M. 2002. Cultivo de hongos comestibles utilizando desechos agrícolas e industriales. *Agronomía Trop* 52:4.
- Guzmán G., Mata G., Salmones D., Soto-Velazco C., y Guzmán-Dávalos L. 2002. El cultivo de los hongos comestibles. Ed. Instituto Politécnico Nacional. México.
- Harper 1988. *Bioquímica de Harper*. Ed. Manual Moderno. (e) 11.
- Kenji I., S. Bruce A., M. Barry J. 1994. Compositional Changes in Compost during Composting and Growth of *Agaricus bisporus*. *Applied and Environmental Microbiology* 60 (5):1538-1546.
- Márquez-Araque A.T., G. Mendoza M., S. González M., S. Buntinx D., y O. Loera C. 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.
- Martínez D., Quirarte M., Soto C., Salmones D., Guzmán G. 1984. Perspectivas sobre el cultivo de hongos comestibles en residuos agro-industriales en México. *Bol. Soc. Mex. Mic*19:207-219.
- Martínez-Carrera D., P. Morales, M. Sobal, M. Bonilla, y W. Martínez. 2007. México ante la globalización en el siglo XXI: el sistema de producción consumo de los hongos Comestibles. Capítulo 6.1. *In: El Cultivo de Setas Pleurotus spp. en México*. J. E. Sánchez, D. Martínez-Carrera, G. Mata & H. Leal (ed) ECOSUR-CONACYT, México, D.F. ISBN 978-970-9712-40-7. pp: 1-20.
- Medina L.R. 2004. Producción Mundial de Hongos Comestibles. *MICOTECA*. 1-6 p.
- McDonald. P. 1975. *Nutrición animal*. 2 (ed). Ed. Acribia. Zaragoza, España.
- McDowell L.R. 1997. Minerals for Grazing Ruminants in tropical Regions. Animal Science Center for Tropical Agriculture University of Florida. FL. EEUU. (e) 3.
- Moreno R., J., M. Pinos R., S. S. González, M., G. Álvarez, C. García, J., G. Mendoza M., R. Barcena. 2007. Efecto de enzimas fibrolíticas exógenas en la degradación ruminal *in vitro* de dietas para vacas lecheras. *Interciencia* 32(12):850-853.
- Moore D., y W Chiu S. 2002. *Tropical Mycology: Volume 1. Macromycetes*. Ed. CABI Publishing, New York. pp:167-182.

- Morrison F. B. 1985. Alimentos y Alimentación del Ganado Tomo 1. Ed. Unión Tipográfica Editorial. México.
- Muller dos Santo M., Souza da Rosa A., Dal Boit S., Mitchell D.A., y Krieger N. 2004. Termal denaturation: is solid-state fermentation really a good technology for the production of ezymes?. Bioresource Technology 93:261-268.
- NRC 1985. Nutrient Requirements of Sheep. Sixth revised Edition. National Academy press. Washington, D.C.
- Pedraza O., R., M. 2001. Estimación del valor nutritivo de los alimentos para rumiantes con énfasis en las técnicas *in sacco* y de producción de gas *in vitro*. Artículo reseña. Rev. Prod. Anim 13(1):45-51.
- Pontón J. 2008. La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la Anidulafungina. Rev Iberoam Micol 25:78-82.
- Pulido R., D. Wood C., y D. Leaver J. 1998. Estudio de la cinética de la fermentación *in vitro* y del residuo no fermentado del forraje disponible en la pradera y del aparentemente consumido por vacas lecheras. Arch. med. vet 30(2):101-107.
- Relling A., E., y A. G. Mattioli. 2003. Fisiología digestiva y metabólica de los rumiantes. Esta obra corresponde a una actualización de los autores del libro "Fisiología Digestiva y Metabólica de los Rumiantes". Ed. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de la Plata. pp: 1-72.
- Rimko T., H., Hilde W., E. Nicole A., y Aries-Kronenburg, Gerben S., S. Peter J. 2003. Lignin degradation by *Agaricus bisporus* accounts for a 30% increase in bioavailable holocellulose during cultivation on compost. Journal Agricultural & Food Chemistry 51:2242-2245.
- Rinker D., L. 2007. Usos del sustrato degradado de los hongos. In: Sanchez, J.E., D.J. Royse and H.L. Leal, Cultivo, mercadotecnia e inocuidad alimenticia de *Agaricus bisporus*. (ed) ECOSUR, Tapachula, Chiapas, Mexico pp:135-150.
- Rosero N., R., y O. L. Posada O. 2007. Modelación de la cinética de degradación de alimentos para rumiantes. Rev Col Cienc Pec 20:174-182.
- Royse D. 2007. Consumo y producción de *Agaricus bisporus* en el mundo. Culivo, Mercadotecnia e Inocuidad Alimenticia de *Agaricus bisporus*. José E. Sánchez, Daniel J. Royse y Hermilo Leal Lara (eds). Colegio de la Frontera Sur. Tapachula, Chiapas. México. Noviembre 2007. pp:7 – 17.
- Rymer C., A. Huntington J., A. Williams B., y I. Givens D. 2005. In vitro cumulative gas production techniques: History, methodological considerations and challenges. Anim. Feed. Sci. and Tech 123–124:9–30.

- Sánchez V., E., D. J. Royse, Hernández G. 2004. Desarrollo de sustratos no composteados para la producción de *Agaricus bisporus*. Mushroom Biology and Mushroom Products. Ed. UAEM.
- Sanginés G., L., 2001. Potencial nutricional del follaje de *Buddleia skutchii* (hojas y pecíolos) en la alimentación de ovinos y análisis de las variables ruminales. Universidad de Colima. Tesis de doctorado. Colima, Colima. México.
- Sarikaya A. y R. Ladisch M. 1999. Solid-State fermentation of lignocellulosic plant residues from *Brassica napus* by *Pleurotus ostreatus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 82:1-15.
- Semple K.T., y R. Fermor T. 1997. Enhanced mineralization of [UL-14C]PCP in mushroom composts. *Research in Microbiology* 148:795-798.
- Stamets P. 2000. Growing gourmet and medicinal mushrooms. 3(ed). Ten Speed Press. China. pp: 79-422.
- Theodorou M., K., A. Williams B., S. Dhanoa M., D. B. McCallan A., y France J. 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.
- Trejo-Hernández M., R., López-Munguía A., y Quintero Ramírez R. 2001. Residual compost of *Agaricus bisporus* as a source of crude laccase for enzymic oxidation of phenolic compounds. *Proces Biochemistry* 36:635-639.
- Underwood J., E. 1981. The Mineral Nutrition of livestock. Ed. Commonwealth Agricultural Bureaux. 2(e).
- Wasser S., P., y L. Weiss A. 1999. Therapeutic effects of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. *Journal Critical reviews in immunology* 19(1): 65-96.
- Westerman P., W, y R. Bicudo J. 2005. Management considerations for organic waste use in agriculture. *Bioresource Technology* 96:215-221.
- Williams B., McMullan J., y McCahey S. 2001. An initial assessment of spent mushroom compost as a potential energy feedstock, *Bioresource Technology* 79(3):227-230.
- Yescas Y., R., R. Bárcena G., G. D. Mendoza M., S. S. González M., M. Cobos P., y M. E. Ortega C. 2004. Digestibilidad *in situ* de dietas con rastrojo de maíz o paja de avena con enzimas fibrolíticas. *Agrociencia* 38(1):23-31.

CAPITULO 1. CARACTERIZACIÓN BROMATOLÓGICA Y COMPOSICIÓN MINERAL DEL RESIDUO (COMPLETO Y PENSADO) DEL CULTIVO DE

A. bisporus

1.1 INTRODUCCIÓN

La producción del hongo comestible *A. bisporus* es hoy en día una de las industrias con gran potencial para abastecer el mercado alimentario por ser un producto con un alto valor nutritivo, sin embargo, también es generadora de residuos orgánicos que ocasionan problemas de contaminación ambiental. Williams *et al.*, (2001) indican que industrialmente se generan 5 kg de residuo por cada kg de champiñón producido; por lo que en países del noroeste de Europa la producción de *A. bisporus* no es permitida sin antes dar solución al problema de acumulación de residuos. Grodzinskaya *et al.*, (2002) y Rinker, (2007) han empleado el residuo del cultivo del champiñón, en la alimentación de ovejas, cabras y carpas *Cirrhina mirigala*, caracterizando a este tipo de residuos de alto contenido proteínico, sin embargo, es necesario un análisis bromatológico adecuado para obtener una eficiencia productiva con un balance de nutrientes para animales rumiantes (Pedraza, 2001) ya que el valor nutritivo de los alimentos depende de la biodisponibilidad de nutrientes y de su dinámica en los procesos de solubilización e hidrólisis en el tubo gastrointestinal. Por tanto, el objetivo de este capítulo fue analizar la composición bromatológica del residuo del cultivo de *A. bisporus*: completo y prensado para su uso como ingrediente en la elaboración de dietas para ovinos.

1.2 MATERIALES Y MÉTODOS

1.2.1 Obtención del residuo completo y prensado del cultivo de *A. bisporus*

Se obtuvieron bloques de 25 kg de peso fresco del residuo del cultivo de *A. bisporus* de 0d (composta sin sembrar), 30d (primer corte), 50d (segundo corte) y 60d (tercer corte). Los bloques fueron obtenidos de la empresa RIOJAL S.A. de C.V ubicado en Las Vigas, Veracruz, México. Los componentes del bloque composteado se presenta en el cuadro 1.1 y se siguió el siguiente procedimiento: los materiales se fermentaron 15d en silos bunker y posteriormente se esterilizó el material composteado; a este se inoculó semilla de *A. bisporus* (100-150 g/18 kg de sustrato), se incubó 12d a $24^{\circ}\text{C} \pm 1$; se colocó tierra de cobertura y carbonato de calcio a una temperatura de 24°C por 15d. A partir de este momento inicia la fase reproductiva del hongo incubando a 14°C con flujo continuo de bióxido de carbono

(CO₂) por 11d. Después de 26d se inicia la fase de fructificación y producción del champiñón (Fernández, 2001 y Royse, 2007). Al subproducto prensado se le retiró la capa de cobertura de la composta, el resto del material fue homogenizado, obteniendo una muestra para determinar MS; posteriormente se realizó un muestreo por cuarteo, tomando una muestra de aproximadamente 400 g al que se agregó 600 mL⁻¹ amortiguador de citratos (pH 5.3-50mM), se agitó manualmente 30 min, de donde se obtuvieron dos productos: un extracto líquido enzimático y el residuo prensado. El residuo completo, se obtuvo sólo retirando la tierra de cobertura de la composta y homogenizando.

Cuadro 1. 1. Componentes de composta (24-25 kg).

Componentes	Cantidad (kg)
Paja de cebada	9.4
Pollinaza	7
Urea	0.9
Yeso ¹	1.6
Tierra de cobertura	5-6
Carbonato de Calcio	0.15

¹ 50% de yeso crudo y 50% de yeso cocido

1.2.2 Caracterización bromatológica del residuo del cultivo de *A. bisporus*

Se analizó la composición bromatológica del residuo del cultivo de *A. bisporus* completo y prensado a diferentes días de cultivo (50, 60 y 90 d) obteniendo la muestra por cuarteo. Se determinó: Proteína total (6.25*N) (PT), materia seca (MS), materia orgánica (MO), cenizas (C) (AOAC, 1995), fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente ácido (FDA), (Van Soest, 1982) y determinación de minerales totales: calcio (Ca), fósforo (P), potasio (K), magnesio (Mg), nitrógeno (N), sodio (Na), manganeso (Mn), cobre (Cu) y zinc (Zn) (TMECC, 2002).

1.2.3 Análisis Estadístico

Se uso un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial 3 X 2, edad de cultivo por tipo de subproducto, con 3 repeticiones por tratamiento. Las variables fueron: PT, MS, MO, C, FDN, FDA y minerales (Ca, P, K, Mg, N, Na, Mn, Cu y Zn).

El Modelo estadístico es el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = Variable de respuesta

μ : media general

α_i : efecto del i -ésimo factor α (edad de cultivo)

β_j : efecto del j -ésimo factor β (subproducto)

$\alpha\beta_{ij}$: efecto de la interacción de la edad de cultivo con el tipo de subproducto

ε_{ijk} : error experimental

$i= 50, 60, 90$, $j=$ subproducto completo y subproducto prensado y $k= 1, 2, 3$

Los datos se analizaron con el procedimiento PROC GLM SAS 9.0. (2002) obteniéndose el análisis de varianza y comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.01$) (Steel y Torrie, 1992).

1.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.3.1 Caracterización del residuo del cultivo de *A. bisporus*

El cuadro 1.2 muestra los resultados de la caracterización bromatológica del residuo del cultivo de *A. bisporus* completo y prensado de 50, 60 y 90d de cultivo. El tratamiento de 60d presentó mayor PT (12.8 % ± 0.43) ($p \leq 0.01$). La cantidad elevada de PT puede deberse a la gran producción de enzimas celulasas, xilanasas y lacasas que produce *A. bisporus*. El micelio de *A. bisporus* produce en la composta un rango amplio de enzimas extracelulares capaces de degradar sustratos lignocelulósicos en sustancias solubles, la combinación de estas actividades enzimáticas son las responsables de degradar los polímeros que se encuentran en la composta, estas enzimas son predominantemente hidrolasas (Arce, 2007). La proteína es la fuente más abundante de nitrógeno disponible para el organismo en la composta, en forma de ligno-proteína y proteína microbiana. El nitrógeno es convertido a un complejo de humus-lignina y es transformado de amonio a proteína por las enzimas del champiñón. El N no puede ser asimilable por el micelio del hongo, tal vez por ello la gran cantidad de nitrógeno que presenta el subproducto (Moore y Chiu, 2002). Las Cenizas mostraron diferencias significativas ($p \leq 0.01$), al incrementarse los días de siembra en el residuo del cultivo de *A. bisporus*, tanto en el residuo completo y prensado. Ortega *et al.*, (2005) realizaron un experimento con residuos cañeros en la producción de hongos comestibles; emplearon un procedimiento sencillo de bioremediación con cepas del género *Pleurotus* y obtuvieron un sustrato residual con diferencias significativas en el contenido de cenizas, y explican que hay un intercambio mineral entre el sustrato y los cuerpos fructíferos, además de existir una mayor solubilidad de los mismos, por lo que hay una mayor actividad metabólica sobre los componentes de la pared celular. En el estadio inicial de crecimiento el hongo consume los componentes solubles y

posteriormente en la etapa del metabolismo secundario el hongo desarrolla un mecanismo enzimático capaz de degradar los componentes poliméricos del sustrato a compuestos de menor peso molecular. García (2005), menciona que la cantidad de cenizas alcanza un 4.4 % en las paredes del micelio vegetativo de *A. bisporus* debido a la presencia de cristales de oxalato. Otra posible explicación al alto contenido de minerales en el residuo del cultivo de *A. bisporus* es porque cuando se inicia el cultivo de este se realiza una aspersión de agua, por lo que los minerales solubles son inmediatamente asimilados por el hongo y otra parte de los minerales se drenan al fondo del bloque, por lo que habrá un mayor contenidos de estos. Además de que el hongo ya habrá alcanzado su mayor actividad enzimática por lo que no seguirá utilizando los minerales como fuente nutricional. La MS no fue diferente ($p \geq 0.01$), para todos los tratamientos. Royse *et al.*, (1982) y Gea, (1997) indican que si el proceso de composteo se ha realizado correctamente, al final se obtendrá una composta con las siguientes características: nitrógeno total de 2.05 ± 0.15 %, MO de 73 ± 3 % y cenizas 27 ± 3 % por lo anterior la composta resultante en este estudio mostró cantidades menores de MO, cantidades altas de cenizas y nitrógeno posterior a la acción de las enzimas del hongo *A. bisporus*.

Cuadro 1. 2. Análisis bromatológico de PT, MS, MO, Cenizas, FDN y FDA (% de MS) del residuo del cultivo de *A. bisporus* completo y prensado a diferentes días de siembra.

	días	PT	MS	MO	Cenizas	FDN	FDA
COMPLETO	50	11.8 ± 0.8^b	29.7 ± 2.3^a	63.2 ± 4.7^a	27.0 ± 1.4^c	50.88^b	39.54^{ab}
	60	12.8 ± 0.4^a	33.2 ± 1.5^a	60.7 ± 5.9^b	33.0 ± 1.1^b	53.38^b	34.76^b
	90	9.5 ± 0.6^c	32.7 ± 5.3^a	47.5 ± 3.2^c	48.9 ± 3.4^a	58.46^a	40.94^b
	EE	0.14	1.52	1.21	0.51	0.89	1.31
PRENSADO	50	10.3 ± 0.4^a	27.7 ± 2.1^a	70.62 ± 1.8^a	22.55 ± 1.7^c	54.35 ± 4.5^a	43.01 ± 4.8^b
	60	11.2 ± 0.6^a	31.79 ± 0.8^a	65.82 ± 1.1^b	31.61 ± 1.5^b	57.98 ± 2.5^b	38.09 ± 1.9^c
	90	8.6 ± 0.8^b	31.40 ± 9.4^a	47.39 ± 5.0^c	48.64 ± 5.2^a	60.45 ± 1.9^a	46.32 ± 5.9^a
	EE	0.20	2.14	1.05	0.51	1.06	1.51

abc= Literales diferentes en columnas indican diferencia significativa ($p \leq 0.01$); EE= Error Estándar.

La FDN del residuo completo incrementó de los 50 a los 60d (50.88 a 53.38% , respectivamente) y la FDA del residuo completo del día 60 disminuyó (34.76%) lo mismo ocurrió en el residuo prensado. La disminución de la fibra en el día 60 de cultivo en ambos residuos, indica que están actuando las enzimas de *A. bisporus* (celulasas, xilanasas y lacasas) sobre el sustrato (Jaworska *et al.*, 2008), ya que tienen la capacidad de degradar y utilizar los carbohidratos estructurales (celulosa y hemicelulosa) y compuestos polifenólicos (lignina)

(Rinker, 2002). Las enzimas exógenas que se producen en el sustrato trabajan en sinérgia con las enzimas producidas por los microorganismos del rumen, lo cual incrementa su potencial hidrolítico en el rumen, y se aprovechan más los alimentos fibrosos (Eun *et al.*, 2007).

Por otro lado, el residuo completo del cultivo de *A. bisporus* de 60d presentó mayor contenido de PT ($p \leq 0.01$) y menor contenido tanto de FDN y FDA (Cuadro 2) debido a la acción de las enzimas producidas por *A. bisporus*. Rinker, (2007) emplearon el subproducto del champiñón para alimentación de ovejas, cabras y carpas *Cirrhina mirigala* ya que es un subproducto que contiene altas cantidades de proteína y minerales (Grodzinskaya *et al.*, 2002). Por lo anterior el residuo completo del día 60 se utilizó como ingrediente para la formulación de dietas en ovinos, por tener mayor contenido de PT, disminuir los contenidos de fibra y tener altos contenidos de minerales que benefician la biodisponibilidad de nutrientes por los animales rumiantes.

1.3.2 Contenido de minerales totales en el residuo del cultivo de *A. bisporus* de 60d de cultivo

Se evaluó el contenido de minerales totales en el residuo del cultivo de *A. bisporus* de 60d por presentar mayor cantidad de cenizas. Los resultados se muestran en el cuadro 1.3. El Ca en el residuo completo y prensado fue 2.75 y 3.03 % respectivamente, sin mostrar diferencias ($p \geq 0.01$). Los contenidos de Mg, Na, K, P y N fueron mayores ($p \leq 0.01$) para el residuo completo (0.27, 0.45, 3.28, 0.48 y 2.29%, respectivamente). Algunos investigadores han mostrado que algunas especies de hongos comestibles acumulan elementos como Cu, Mn y Zn (Serafín *et al.*, 2007) aunque en la presente investigación no se determinaron todos los elementos traza, solo los más importantes en la nutrición de rumiantes (Ca, Mg, Na, K, P, N, Cu, Mn y Zn) estos se encuentran en concentraciones altas si lo comparamos con una paja convencional (NRC, 1985). El exceso de Ca se debe a componentes como el yeso y carbonato de calcio que se agregan a la composta. El exceso de Cu, a la adición de pollinaza, la cual es rica en cobre (Pacheco *et al.*, 2003). Rinker (2007) menciona que sustratos frescos degradados por hongos tienen un pH neutro o ligeramente alcalino, por el exceso de sales debido a las altas concentraciones de K, Ca, SO_4 , Cl y Na y en algunos casos NO_3 y P, de lo anterior es importante destacar que altas concentraciones de minerales en el residuo del cultivo del champiñón limita la inclusión de este residuo en la formulación de dietas para ovinos, por lo

que hay que tener cuidado en el balance de minerales principalmente la relación calcio-fósforo, Mn y Cu (McDowell, 1997).

Los resultados de los microminerales (cuadro 1.3) muestran la misma tendencia que los macrominerales, obteniéndose diferencias significativas ($p \leq 0.01$) en el residuo del cultivo de *A. bisporus* completo (Cu 52.83, Mn 631.50 y Zn 199.33 ppm) y menores en el residuo prensado. Serafín *et al.*, (2007) determinaron Cu (18.4 ± 2.7) y Mn (21.5 ± 0.8) en el cuerpo fructífero del champiñón, sin embargo, en este estudio los porcentajes de estos minerales son mayores en el residuo que la proporción encontrada en el cuerpo fructífero por los autores antes citados.

Cuadro 1. 3. Porcentaje de macrominerales y microminerales en el residuo del cultivo de *A. bisporus* completo y prensado en el día 60 de siembra.

MINERAL	COMPLETO	PRENSADO	EE
Macrominerales (%)			
Ca	2.75 ^a	3.03 ^a	0.18
Mg	0.27 ^a	0.17 ^b	0.008
Na	0.45 ^b	0.97 ^a	0.03
K	3.28 ^a	1.51 ^b	0.19
P	0.48 ^a	0.44 ^b	0.01
N	2.29 ^a	1.71 ^b	0.02
Microminerales (ppm)			
Cu	52.83 ^a	46 ^a	1.35
Mn	631.50 ^a	346.83 ^a	10.83
Zn	199.33 ^a	129 ^a	4.41

abc= Literales diferentes en fila indican diferencia significativa ($p \leq 0.01$); EE= Error Estándar.

1.4 CONCLUSIONES

Los resultados bromatológicos del presente estudio muestran que el residuo completo y prensado del cultivo de *A. bisporus* pueden ser utilizados como ingrediente para la formulación de dietas para ovinos, por el contenido aceptable de proteína, así como, por los altos contenidos en minerales. Aunado a ello, la disminución de las fracciones de fibra por la acción de enzimas fibrolíticas propias del hongo, por lo que este tipo de residuo es atractivo para emplearse como ingrediente dentro de una dieta integral para animales rumiantes.

1.5 LITERATURA CITADA

- AOAC 1995. Official Methods of Analysis. 16th Ed. Off. Agric. Chem., Washington, D.C., U.S.A.
- Arce C.O. 2007. "Alternativas de suplementación en composta para la producción de *Agaricus bisporus* y su efecto en las actividades enzimáticas". UAM. Tesis de Maestría.
- García M.C. 2005. El micoparasitismo de *Verticillium fungicola* sobre los carpóforos de *Agaricus bisporus*: la verticiliosis o "mole seca" del champiñón. Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia Dialnet 43:571-586.
- Eun J., S, A. Beauchemin K., y Schulze H. 2007. Use of an *in vitro* fermentation bioassay to evaluate improvements in degradation of alfalfa hay due to exogenous feed enzymes. Anim Feed Sci. and Technol 135(3-4):315-328.
- Fernández M., F. 2005. Manual práctico de producción comercial de champiñón. Apuntes recopilación de datos y experiencias adquiridas en el cultivo comercial de champiñones. pp: 4-122.
- Gea A., F., J., y J. Tello M. 1997. Micosis del cultivo del champiñón. Ediciones Mundi-Prensa, España.
- Grodzinskaya A., A., D. Infante H., y N. Piven M. 2002. Cultivo de hongos comestibles utilizando desechos agrícolas e industriales. Agronomía Trop 52:4.
- Jaworska G., Bernas E., Cichon Z., y Possinger P. 2008. Establishing the optimal period of storage for frozen *Agaricus bisporus*, depending on the preliminary processing applied. International Journal of refrigeration 31:1042-1050.
- Martínez-Carrera D., P. Morales, M. Sobal, M. Bonilla, y W. Martínez. 2007. México ante la globalización en el siglo XXI: el sistema de producción consumo de los hongos Comestibles. Capítulo 6.1. In: *El Cultivo de Setas Pleurotus spp. en México*. J. E. Sánchez, D. Martínez-Carrera, G. Mata & H. Leal (ed) ECOSUR-CONACYT, México, D.F. ISBN 978-970-9712-40-7. pp: 1-20.
- McDowell L., R. 1997. Minerals for grazing ruminants in tropical regions. Animal Science Center for Tropical Agriculture, University of Florida. FL. EEUU. (e) 3.
- Moore D., y W Chiu S. 2002. Tropical Mycology: Volume 1. Macromycetes. (ed). CABI Publishing, New York. pp:167-182.
- NRC 1985. Nutrient Requirements of Sheep. Sixth revised Edition. National Academy press. Washington, D.C.

- NRC 2007. Nutrient Requirements of Small Ruminants, sheep, goats, cervids, and new world camelids. National Academy Press. Washington, D.C.
- Ortega A., C., G., G. Bueno G., y Betancourt D. 2005. Biotransformación de residuos lignocelulósicos con hongos *Pleurotus*. Revista CENIC Ciencias Biológicas 36.
- Pacheco A., J., A., J. L. Rosciano G., W. A. Villegas C., M. Alcocer V., y A. F. Castellanos R. 2003. Cuantificación del contenido de cobre y otros minerales en pollinazas producidas en el estado de Yucatán. Téc Pecu Méx 41:197-207.
- Pedraza O., R., M. 2001. Estimación del valor nutritivo de los alimentos para rumiantes con énfasis en las técnicas *in sacco* y de producción de gas *in vitro*. Artículo reseña. Rev. Prod. Anim 13(1):45-51.
- Rinker D., L. 2007. Usos del sustrato degradado de los hongos. In: Sanchez, J.E., D.J. Royse and H.L. Leal, Cultivo, mercadotecnia e inocuidad alimenticia de *Agaricus bisporus*. (ed) ECOSUR, Tapachula, Chiapas, Mexico pp:135-150.
- Royse D., J., L. Schisler C. y P. Wuest J. 1982. Spawning to casing in commercial mushroom production. Penn State Handbook for commercial mushroom growers. Paul J. Wuest & Glenn D. Bengtson (eds). pp:43-48.
- Royse D., J., E. Sanchez J., B. Robert B., y J. Davidson. 2007. Resupplementing and re-casing mushroom (*Agaricus bisporus*) compost for a second crop. World Journal Microbiology & Biotechnology en línea <http://www.springerlinf.com/content/> (05 de marzo de 2010).
- SAS 2002. SAS Institute Inc. Cary, North Carolina, USA. Versión 9.0.
- Serafín M., A., H., Wrobel K., J. F. Gutierrez C., y Wrobel K. 2007. The protective effect of selenium inorganic forms against cadmium and silver toxicity in mycelia of *Pleurotus ostreatus*. Mycological research 111:626-632.
- Steel R., G., D., y H. Torrie J. 1992. Bioestadística. Principios y Procedimientos. Editorial McGraw Hill. México.
- TMECC 2002. Test Methods for the Examination of composting and compost.
- 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. J. Dairy Sci. 74:3583-3597
- Williams B., McMullan J., y McCahey S. 2001. An initial assessment of spent mushroom compost as a potential energy feedstock, Bioresource Technology 79(3):227-230.

CAPITULO 2. DIGESTIBILIDAD Y FERMENTACIÓN RUMINAL *IN VITRO* DE DIETAS PARA OVINOS ELABORADAS CON RESIDUO DEL CULTIVO DE *Agaricus bisporus*

2.1 INTRODUCCIÓN

En las empresas champiñoneras se generan excedentes de residuos del cultivo de *A. bisporus*, Williams *et al.*, (2001) indican que industrialmente se generan por cada kilogramo de champiñón producido cerca de 5 kg de residuos, estos son obsequiados a los agricultores y horticultores para que los incorporen a sus terrenos de cultivo (por su alta humificación y alto contenido en materia orgánica), sin embargo, debido a su alto contenido de minerales el uso directo de estos es limitado. Diversos autores han empleado el residuo del cultivo de *A. bisporus* en la alimentación animal por su alto contenido proteínico (Grodzinskaya *et al.*, 2002 y Rinker, 2007) el presente estudio valora la adición de un residuo del cultivo de *A. bisporus* como ingrediente en dietas para ovinos, debido a su alto contenido en proteína y su predigestión de la fibra llevada a cabo por enzimas producidas por el hongo *A. bisporus*. Para evaluar su incorporación en la producción ganadera es necesario conocer las características de fermentación ruminal de los alimentos, mismo que pueden ser estudiados por métodos *in vivo*, *in situ* e *in vitro* (Posada *et al.*, 2006). La digestibilidad *in vitro* e *in situ* estiman la desaparición de la materia seca (MS) y materia orgánica (MO) de los alimentos (Rosero y Posada, 2007), pero se considera que la determinación de la desaparición del sustrato mediante la medición de la producción acumulada de gas es un método más sensible y tiene la ventaja de que el producto final que se mide (gas) es resultado directo del metabolismo microbiano (Bruni y Chilbroste, 2001). La aplicación de este método en el presente trabajo tiene como objetivo determinar la digestibilidad verdadera mediante la producción de gas de los diferentes porcentajes del residuo del cultivo de *A. bisporus* en una dieta para ovinos y poder concluir qué porcentaje de este residuo se puede incluir en la dieta.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Preparación de las muestras

Se formularon nueve dietas para ovinos de engorda (Cuadro 2.1) de acuerdo a las tablas de requerimientos del NRC (2007). Se utilizó el residuo completo del cultivo de *A. bisporus* de

60d por obtener la mejor composición bromatológica (Cuadro 1.2). Los ingredientes se secaron a 60 °C durante 72 h en una estufa de aire forzado y se molieron (1 mm).

2.2.2 Cinética de producción de gas *in vitro*

En frascos color ámbar de 120 mL, se depositaron 0.5 g de muestra deshidratada y molida, siguiendo la técnica de Menke y Steingass (1988). A cada frasco se le agregó 90 mL de inóculo ruminal (Anexo I), bajo flujo continuo de CO₂, cerrados herméticamente y se les extrajo el exceso de CO₂, con una aguja hipodérmica. Los frascos se incubaron a 39 °C en baño maría. La presión de gas se midió a 0, 1, 2, 3, 6, 9, 12, 17, 23, 29, 35, 44, 56, 68, 80 y 96h de incubación, utilizando para ello un manómetro (1 kg cm⁻²) de acuerdo a la técnica de Theodorou *et al.*, 1994. Los valores de presión de gas (kg cm⁻²) se transformaron a volumen de gas (mL g⁻¹ MS), una vez obtenido el volumen de gas acumulado se calcularon las variables de cinética de fermentación: volumen máximo de gas producido (Vmáx, mLMS g⁻¹) tasa de producción de gas (S, h) y tiempo de retardo o fase Lag (L, h) empleando el siguiente modelo matemático:

$$\text{VolAcum} = \text{Vmáx}/(1+\exp(2-4*S*(t-L)))$$

Donde:

VolAcum: Volumen acumulado para cada tiempo (t) de medición

S: Tasa de producción de gas (h)

L: Fase Lag (h) (SLCofield y Pell, 1995)

2.2.3 Determinación de las variables estimadas mediante modelos matemáticos: biomasa microbiana (BM mg), energía metabolizable (EM MJ/KgMS), digestibilidad de la materia orgánica (DMO %)

Las variables BM, EM y DMO derivadas de la fermentación del sustrato se determinaron con las ecuaciones siguientes:

$$\text{BM (mg)} = \text{MS verdaderamente digerida} - (\text{gas producido} * \text{factor de estequiometría})$$

$$\text{EM (MJ / Kg MS)} = 2.20 + 0.136 \text{ Gp} + 0.057 \text{ P}, \text{ R}^2 = 0.94$$

$$\text{DMO (\%)} = 14.88 + 0.889 \text{ Gp} + 0.45 \text{ P} + 0.0651 \text{ XA}, \text{ R}^2 = 0.92$$

Donde P es proteína en %; XA, es cenizas en % y Gp es la producción neta de gas en mL proveniente de la muestra seca (0.2 g) después de 24 h de incubación y posterior a la corrección de la variación diaria en la actividad del líquido ruminal (Makkar, 2004).

2.2.4 Determinación de ácidos grasos volátiles (AGV) y nitrógeno amoniacal (NA)

Se determinó la proporción molar de AGV y NA en muestra líquidas de las dietas (0, 6, 12 y 40%) con residuo del cultivo de *A. bisporus* de 60d de siembra.

Se hicieron dos repeticiones de cada uno y se extrajo 1.5 mL de muestra a las 12 y 24 h de incubación, se mezcló con 0.5 mL de ácido metafosfórico para determinar AGV y NA (Carro *et al.*, 1999). Las muestras se mantuvieron en refrigeración hasta ser procesadas, se centrifugaron y se tomó 1 µL para la lectura en el cromatógrafo de gas (HP6890 con inyector automático). Para la determinación del NA se agregó 1 mL de fenol a las muestras mediante la técnica de Wheatherburn 1967.

2.2.5 Análisis estadístico

Se uso un diseño experimental completamente al azar con bloques generalizados. Las variables medidas en la producción de gas *in vitro* fueron: V_{máx}, mL g⁻¹, S, h⁻¹ y L, h; así como la DV *in vitro*. El modelo estadístico fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + (\tau\beta)_{ij} + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

Y_{ij}: Producción de gas

μ: Media general

τ_i: Efecto de la inclusión del residuo (0, 3, 6, 9, 12, 15, 20, 30, y 40 %)

β_j: Efecto de tiempo (0, 1, 2, 3, 6, 9, 12, 17, 23, 29, 35, 44, 56, 68, 80 y 96 h)

(τβ)_{ij}: efecto de la interacción tratamiento*tiempo

ε_{ij}: error experimental

Para las variables BM, EM y DMO se utilizó el mismo diseño experimental antes mencionado.

Las variables: AGV, NA, se analizaron con un diseño experimental completamente al azar.

Los datos se analizaron con el procedimiento PROC GLM SAS 9.0. (2002) obteniéndose el análisis de varianza y comparación de medias de Tukey (p ≤ 0.01) (Steel y Torrie, 1992).

Cuadro 2. 1 Dietas experimentales y su composición bromatológica.

Ingrediente (%)	Residuo (d)		Inclusión del residuo del cultivo <i>A. bisporus</i> (%)								
	0	60	0	3	6	9	12	15	20	30	40
Desperdicio de pan	-	-	10	7	5	4	3	3	3	3	1
Maíz	-	-	59	59	60	60	59	58	58	47	44
Paja de avena	-	-	13	14	13	11	10	9	5	5	2
Pasta de Soya	-	-	14	13	12	12	12	11	10	9	8
Aceite	-	-	3	3	3	3	3	3	3	5	4
Urea	-	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Residuo de 60d*	-	-	-	3	6	9	12	15	20	30	40
COMPOSICIÓN BROMATOLÓGICA¹											
MS (%)	94.36	97.32	91.09	91.36	90.98	91.47	90.88	91.60	90.22	89.35	90.63
MO (%)	61.16	62.53	87.33	85.98	85.77	85.47	83.43	83.75	81.29	77.55	75.86
P 6.25*N (%)	12.3	12.8	16.63	15.46	15.55	15.65	16.15	16.58	15.17	14.41	15.54
EM (Mcal/kg) ²	-	-	2.83	2.72	2.64	2.58	2.50	2.43	2.33	2.15	1.84
FDN (%)	61.5	53.38	20.59	22.35	21.65	21.28	23.53	22.45	27.17	27.37	30.23
FDA (%)	60.7	34.76	13.15	11.30	12.15	15.17	16.66	15.46	14.33	20.13	21.4
MINERALES											
Ca (%)	2.1	2.75	0.16	0.35	0.53	0.72	0.91	1.10	1.41	2.06	2.69
P (%)	0.39	0.48	0.29	0.30	0.31	0.33	0.35	0.36	0.39	0.43	0.48
K (%)	2.1	3.28	1.01	1.07	1.09	1.11	1.15	1.17	1.17	1.35	1.47
Mg (%)	0.165	0.27	0.17	0.18	0.19	0.20	0.21	0.22	0.24	0.28	0.32
S (%)	-	-	0.19	0.19	0.18	0.18	0.17	0.16	0.15	0.13	0.11
Co (ppm)	-	-	0.35	0.31	0.28	0.27	0.25	0.25	0.25	0.23	0.18
Cu (ppm)	34.7	52.83	10.86	12.62	14.38	16.31	18.25	20.09	23.21	29.90	36.24

0 = composta sin inoculación de *Agaricus bisporus*, *60 = residuo completo del cultivo de *A. bisporus* tras 60 días de siembra, ¹Análisis realizados en el Laboratorio de Nutrición Animal en el Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo; ²Calculado de Datos del NRC (1985).

2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1 Digestibilidad verdadera (DV) y producción de gas *in vitro* de la MS

En el capítulo 1 de la presente investigación se realizó el análisis bromatológico del residuo del cultivo de *A. bisporus* del día 60 de siembra, presentando mayor PT y disminución en la FDN y FDA, por lo que fue utilizado como ingrediente para la formulación de dietas de ovinos para la producción de gas *in vitro*.

El Cuadro 2.2 de este capítulo muestra los resultados de las variables de DV y producción de gas *in vitro*. En los tratamientos 0, 3, 6 y 9% se observó el mayor Vmax mLg⁻¹MS (274.47, 273.35, 267.78 y 256.5 mLg⁻¹MS, respectivamente), siendo significativamente superiores ($p \leq 0.01$) con respecto a los tratamientos 20, 30 y 40%, en los cuales se observó una tendencia decreciente del volumen de gas, debido probablemente al aumento del residuo del cultivo de *A. bisporus* del día 60. Sin embargo, este es el primer estudio en el que se evalúa el

comportamiento del residuo del cultivo de *A. bisporus* en la producción de gas *in vitro* y la DV. Cuando los porcentajes de inclusión del residuo fueron del 15 al 40 %, la producción de gas se redujo ($p \leq 0.01$) al igual que la DV ($p \leq 0.01$). Sin embargo, el tratamiento 0% no presentó diferencias ($p \geq 0.01$), con respecto a 3, 6, 9 y 12% en la producción de gas ni en la DV, lo que sugiere que es posible adicionar hasta el 12% del residuo del cultivo de *A. bisporus* del día 60 en dietas para ovinos, ya que al aumentar a 15% se ve disminuida la fermentación, así, como la producción de gas.

Una posible explicación a la disminución de la DV podría deberse al alto contenido mineral del residuo del cultivo de *A. bisporus* del día 60, no obstante que los minerales realizan una o varias funciones catalíticas en la célula (McDonall, 1993), y en el rumiante, los minerales que entran al tubo digestivo tienen efecto sobre el metabolismo de los microorganismos directa o indirectamente. También actúan directamente como cofactores enzimáticos, elementos precursores de síntesis, o cambiando el pH y la osmolaridad del medio e indirectamente modifican la fisiología del hospedero; por ejemplo, alterando el tiempo de permanencia de la digesta o la velocidad de absorción de los metabolitos (Ramírez-Pérez y Meschy 2005); por ello un exceso de algunos de ellos en el líquido ruminal como el calcio, produce una depresión en la degradación de la fibra, asimismo, la absorción de Mg disminuye cuando las dietas son altas en potasio, ya que el epitelio del rumen responde adaptándose a la osmolaridad del contenido ruminal por un incremento en la tasa de absorción de sodio (Leonhard-Marek *et al.*, 2004).

Rosero y Posadas (2007) mencionan que las tasas de producción de gas para carbohidratos estructurales en la fibra pueden llegar hasta 0.02 h^{-1} , los tratamientos 0, 3, 6, 9 y 12 % mostraron valores de 0.0451, 0.0446, 0.0451, 0.0408, 0.041 h^{-1} , respectivamente. Estos comenzaron su fermentación de 0.7 a 1 h^{-1} después de la incubación y dichos tratamientos estaban constituidos principalmente por carbohidratos de fácil digestión, contradiciendo lo encontrado por el autor antes mencionado. Colombatto *et al.* (2003) mencionó que la adición de enzimas afecta la tasa inicial de producción de gas alterando las tasas de fermentación; y sabiendo que el residuo del cultivo de *A. bisporus* puede contener enzimas resultado del metabolismo del hongo *A. bisporus* puede ser una posible explicación del porque comenzaron la fermentación tardíamente los tratamientos.

Se obtuvo una alta correlación entre DV y $V_{m\acute{a}x}$ $mLg^{-1}MS$ ($R^2 = 0.8684$) lo cual resulta en la producción de 0.1369 $mLg^{-1}MS$ de gas por cada unidad de sustrato que se fermenta. Pell y Schofield, (1993) mostraron que hay una correlación lineal entre la fibra digerida y el volumen de gas generado ($r= 0.97$).

Cuadro 2. 2. Variables de la cinética de producción de gas y digestibilidad ruminal *in vitro* de los tratamientos con diferentes proporciones del residuo completo del cultivo de *A. bisporus* del día 60 de siembra.

Parámetros cinética producción de gas				
SUSTRATO	$V_{m\acute{a}x}$ $mL g^{-1}MS$	$S(h^{-1})$	L(h)	DV %
0 %	274.47 ^a	0.0451 ^a	1.1421 ^a	78.55 ^{ab}
3 %	273.35 ^a	0.0446 ^a	1.178 ^a	82.48 ^a
6 %	267.78 ^a	0.0451 ^a	1.1873 ^a	77.87 ^{ab}
9 %	256.5 ^{ab}	0.0408 ^b	0.7347 ^{ab}	78.63 ^{ab}
12 %	241.63 ^b	0.041 ^b	0.7733 ^{ab}	75.13 ^{bc}
15 %	242.02 ^b	0.041 ^b	0.4496 ^{bc}	78.11 ^{ab}
20 %	217.43 ^c	0.0413 ^b	0.6947 ^{abc}	76.73 ^{abc}
30 %	192.05 ^d	0.0388 ^b	0.3184 ^{bc}	74.02 ^{bcd}
40 %	168.83 ^e	0.0396 ^b	0.1062 ^c	67.67 ^{de}

$V_{m\acute{a}x}$ $mL g^{-1} MS$ = volumen máximo, $S(h^{-1})$ = tasa de producción de gas, L(h)= Tiempo de retardo o fase LAG, DV %= Digestibilidad verdadera; abc=Literales diferentes en columna indican diferencia significativa ($p \leq 0.01$)

2.3.2 Variables estimadas de la fermentación ruminal *in vitro*

2.3.2.1 Biomasa microbiana (BM, mg) y eficiencia microbiana

No se presentaron diferencias ($p \geq 0.01$) entre los tratamientos en la BM (Cuadro 2.3). Lo que indica que el porcentaje del residuo del cultivo de *A. bisporus* del día 60 de siembra no tiene ningún efecto significativo en el incremento de la BM, tal vez debido a que el residuo no tiene las características propicias para el crecimiento de microorganismos ruminales, debido a la carencia de fuentes de carbono; sin embargo, la producción de BM se vió pareja debido a que el residuo del cultivo de *A. bisporus* del día 60 presenta una buena proporción de PT, así como de minerales necesarios para la producción de BM (Chacón, 2004).

No se presentó diferencia en eficiencia microbiana ($p \geq 0.01$) entre los tratamientos 0, 3, 6, 9 y 12% , mostrando valores de 0.34, 0.35, 0.34, 0.35 y 0.35%, respectivamente, mientras que con los tratamientos 15, 20, 30 y 40 % los valores fueron de 0.36, 0.36, 0.36, 0.37%, mostrando diferencias significativas ($p \leq 0.01$). Este efecto puede atribuirse a la mayor degradación de las paredes celulares del sustrato, lo que a su vez permite una mayor adherencia de los

microorganismos, incrementando la eficiencia de estos en el proceso de fermentación (Blas y García 1993).

2.3.2.2 Energía metabolizable (EM, MJ/KgMS) y Digestibilidad de la materia orgánica (DMO %)

Al analizar la variable EM (Cuadro 2.3), se observó una tendencia en su disminución conforme se fue incrementando el residuo del cultivo de *A. bisporus* del día 60, resultando los tratamientos 30 y 40 % los que menor EM presentaron al final del estudio (1.68 y 1.59 Mcal/KgMS, respectivamente), siendo significativamente menores al resto de los tratamientos ($p \leq 0.01$). Este resultado pudo deberse a que el hongo *A. bisporus* ya empleó la energía procedente de los materiales que conforman la composta para el crecimiento del micelio, originando una disminución de esta energía al momento de incluirlo como ingrediente en las dietas. Otra explicación podría ser el procedimiento de pasteurización que lleva la composta, ya que el método comúnmente utilizado para este proceso, es sumergir el sustrato en agua a 80°C durante 30-45 minutos, sin embargo, con temperaturas superiores se corre el riesgo de modificar la composición química del material, limitando el aprovechamiento de las fuentes de carbono por el micelio del hongo. Además, los azúcares disueltos en el medio se hacen accesibles a otros microorganismos contaminantes, que los pueden consumir con mayor facilidad y rapidez (Blas y García 1993), por lo que la insuficiencia de energía observada en este estudio podría ser una limitante en la introducción del residuo en porcentajes mayores al 12%.

De manera interesante, en el comportamiento de la variable DMO (Cuadro 2.3) se observó una tendencia idéntica a la de la EM, apreciándose una disminución de DMO conforme se fue incrementando el residuo del cultivo de *A. bisporus* en las dietas.

Cuadro 2. 3. Variables estimadas de la fermentación ruminal *in vitro* de dietas con diferentes proporciones del residuo completo del cultivo de *A. bisporus* del día 60 de siembra.

VARIABLES ESTIMADAS				
SUSTRATO	BIOMASA MICROBIANA (mg)	EFICIENCIA MICROBIANA	EM (Mcal/KgMS)	DMO (%)
0 %	268.26 ^{ab}	0.34 ^b	2.19 ^a	61.89 ^a
3 %	287.33 ^a	0.35 ^{ab}	2.16 ^a	61.07 ^a
6 %	263.86 ^{ab}	0.34 ^b	2.13 ^{ab}	60.34 ^{ab}
9 %	277.88 ^{ab}	0.35 ^{ab}	2.04 ^{bc}	57.78 ^{bc}
12 %	262.89 ^{ab}	0.35 ^{ab}	1.97 ^c	56.06 ^c
15 %	280.00 ^{ab}	0.36 ^a	1.98 ^c	56.47 ^c
20 %	276.57 ^{ab}	0.36 ^a	1.84 ^d	52.61 ^d
30 %	268.25 ^{ab}	0.36 ^a	1.68 ^e	48.34 ^e
40 %	252.72 ^b	0.37 ^a	1.59 ^e	46.05 ^e

EM=Energía metabolizable, DMO=Digestibilidad de la materia orgánica, abc=Literales diferentes en columna indican diferencia significativa ($p \leq 0.01$).

2.3.2.3 Relación de los ácidos grasos volátiles (AGV) y la producción de metano (CH₄) calculados de la digestibilidad y producción de gas *in vitro* de la MS del residuo completo del cultivo de *A. bisporus* de 60d.de siembra

La producción de metano está asociada a la producción de acetato y propionato. En general la división del alimento digerido entre la biomasa microbiana y la producción de AGV, así como la tasa de acetato y propionato, muestran efecto proporcional en la producción de metano (CH₄) (Blümmel *et al.*, 2005). Cuando se incrementa la producción de propionato se produce menor cantidad de metano (Balbuena, 2003). Esto no se presenta en este estudio, en el que a las 12 h el ácido propiónico para el residuo del cultivo de *A. bisporus* del 0 y 60 d es menor que a las 24 h ($p \leq 0.01$) observándose una disminución de CH₄ a las 12 h mientras que a las 24 h el metano se incrementa ($p \leq 0.01$), excepto en el tratamiento 0 % ($p \leq 0.01$). En cuanto se va incrementando el residuo del día 60 el propiónico disminuye y el metano aumenta a las 12h, mientras que a las 24 h también se disminuye el propiónico, así, como el metano. La cantidad de propiónico, butírico y CH₄ aumentó conforme transcurrió el tiempo de fermentación ($p \leq 0.01$), contrario en el ácido acético siendo mayores a las 12 h ($p \leq 0.01$) ya que hay una relación directamente proporcional entre acético y propiónico (Cuadros 2.4 y 2.5). Los días 0 y 60 fueron iguales ($P > 0.01$) en el contenido de ácido acético, siendo los

valores más altos (73.56 y 75.07 mmol/L, respectivamente), habiendo diferencia ($p \leq 0.01$) con el tratamiento con 0, 6, 12 y 40 % del residuo del día 60 ($p \geq 0.01$), a excepción del tratamiento con el 6 % el cual es diferente a todos los tratamientos ($p \leq 0.01$), mostrando el valor más bajo de ácido acético a las 12 h, mientras que a las 24 h el residuo del cultivo del champiñón del día 60, mostró el valor más bajo de ácido acético ($p \geq 0.01$). Los tratamientos con 6 % y 12 % ($p \geq 0.01$) presentan los valores más altos de ácido acético. Los valores de ácido propiónico observados en el tratamiento con 6 % (20.72 mmol/L), fueron significativamente superiores ($p \leq 0.01$) a los tratamientos con 0 % (18.22 mmol/L), al residuo del día 0 de siembra (15.91 mmol/L) y 60 de siembra (15.99 mmol/L), sin observarse diferencias con respecto a los otros tratamientos experimentales.

Cuadro 2. 4. Variables ruminales obtenidas de la digestibilidad y producción de gas *in vitro* a las 12 h de fermentación.

TRAT	ACÉTICO mmol/L	PROPIÓNICO mmol/L	BUTÍRICO mmol/L	CH ₄
0	73.56 ^a	15.91 ^c	10.54 ^d	4.45 ^{cd}
60	75.07 ^a	15.99 ^c	8.95 ^d	3.89 ^d
0 %	64.83 ^b	18.22 ^{bc}	16.96 ^c	8.12 ^a
6 %	57.73 ^c	20.72 ^a	21.56 ^a	6.73 ^{ab}
12 %	64.39 ^b	18.94 ^{ab}	16.68 ^c	8.04 ^a
40 %	62.07 ^b	18.50 ^{ab}	19.44 ^b	5.68 ^{bc}

abc= Literales diferentes en columna indican diferencia significativa ($p \leq 0.01$).

Cuadro 2. 5. Variables ruminales obtenidas de la digestibilidad y producción de gas *in vitro* a las 24 h de fermentación.

TRAT	ACÉTICO mmol/L	PROPIÓNICO mmol/L	BUTÍRICO mmol/L	CH ₄
0	63.39 ^b	19.09 ^a	17.53 ^b	10.99 ^a
60	57.54 ^d	19.32 ^a	23.14 ^a	9.12 ^b
0 %	64.76 ^b	18.30 ^b	16.95 ^b	10.95 ^a
6 %	73.96 ^a	17.73 ^b	8.31 ^c	5.20 ^d
12 %	75.79 ^a	15.62 ^c	8.60 ^c	5.11 ^d
40 %	60.90 ^c	17.94 ^b	21.17 ^a	7.58 ^c

abc= Literales diferentes en columna indican diferencia significativa ($p \leq 0.01$).

2.4 CONCLUSIONES

El análisis de los resultados del presente estudio muestra que la inclusión de más del 12 % del residuo del cultivo de *A. bisporus* en las dietas experimentales reduce la producción de gas, así como, la DV. En las variables estimadas BM y eficiencia microbiana no se vió cambio al incrementarse el porcentaje del residuo del cultivo de *A. bisporus*, la EM, así como la DMO se disminuyeron conforme se aumentó el residuo por lo que se debe tener cuidado al incorporar el residuo en las dietas de los ovinos, ya que la energía es uno de los puntos clave en la formulación de dietas.

2.5 LITERATURA CITADA

- Balbuena O. 2003. Manipulación de la Función Ruminal para Incrementar la Producción Animal. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Estación experimental Colonia Benítez, Argentina. www.inta.gov.ar/benitez/info/documentos/alimen/pdf/60_ruminal.pdf (07 de marzo de 2010).
- Blas B., C., y P. García R. 1993. Tamaño de partícula de los forrajes en la alimentación de vacas lecheras y conejos. Bases fisiológicas y recomendaciones. IX Curso de Especialización FEDNA. Barcelona, 8 y 9 de noviembre. pp. 1-17.
- Blümmel M., I. Givens D., y R. Moss A. 2005. Comparison of methane produced by straw fed sheep in open-circuit respiration with methane predicted by fermentation characteristics measured by an *in vitro* gas procedure. *Anim. Feed. Sci. and Tech* 123–124:379–390
- Bruni M.A., Chilibroste, P., 2001. Artículo Invitado: Simulación de la digestión ruminal por el método de la producción de gas. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* 9:1, 43-51.
- Carro M., D., López S., Valdés C. y Ranilla M. 1999. Efecto de la suplementación nitrogenada sobre la fermentación ruminal *in vitro* de forrajes deficientes en nitrógeno. *Arch. Zootec* 48:295-306.
- Chacón V., A. 2004. Perspectivas actuales de la proteína unicelular (scp) en la agricultura y la industria. *Agronomía Mesoamericana* 15(1):93-106.
- Colombatto D., L. Mould F., K. Bhat M. y Owen E. 2003. Use de fibrolytic enzymes to improve the nutritive value of ruminant diets. A biochemical and *in vitro* rumen degradation assessment. *Anim Feed Sci Technol* 107:201-209.
- Grodzinskaya, A., D. Infante H., y N. Piven M. 2002. Cultivo de hongos comestibles utilizando desechos agrícolas e industriales *Agron. Trop.* 52:4.
- Leonhard-Marek F., S. S. Brinkmann I., Breves G., y Martens H. 2005. Basolateral Mg^{2+}/Na^{+} exchange regulates apical nonselective cation channel in sheep rumen epithelium via cytosolic Mg^{2+} . *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 288:630–645.
- Makkar H., P., S. 2004. Recent advances in the *in vitro* gas method for evaluation of nutritional quality of feed resources. *Animal Production and Health Section Joint FAO/IAEA Division.*
- McDonald. 1975. *Nutrición animal.* Ed. Acribia. Zaragoza, España
- Menke K., H., y Steingass H. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Anim. Res. Dev* 28:7–55.

- NRC 1985. Nutrient Requirements of Sheep. Sixth revised Edition. National Academy press. Washington, D.C.
- Posada L., S., Noguera R., y Bolívar D. 2006. Relación entre presión y volumen para la implementación de la técnica *in vitro* de producción de gases en Medellín, Colombia. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias 19(4):407-414.
- Ramírez P., A., y Meschy F. 2005. Requerimiento de fósforo de los microorganismos del rumen: una revisión. Interciencia 30(11):663-670.
- Rinker D., L. 2007. Usos del sustrato degradado de los hongos. In: Sanchez, J.E., D.J. Royse and H.L. Leal, Cultivo, mercadotecnia e inocuidad alimenticia de *Agaricus bisporus*. (ed) ECOSUR, Tapachula, Chiapas, Mexico pp:135-150.
- Rosero N., R., y S. L. Posada O. 2007. Modelación de la cinética de degradación de alimentos para rumiantes. Rev Col Cienc Pec 20:174-182.
- SAS 2002. SAS Institute Inc. Cary, North Carolina, USA. Versión 9.0.
- Schofield P., E. Pitt R., y N. Pell A. 1994. Kinetics of fiber digestion from *in vitro* gas production. J. Anim. Sci 72:2980-2991.
- Steel R., G., D., y H. Torrie J. 1992. Bioestadística. Principios y Procedimientos. Editorial McGraw Hill. México.
- Theodorou M., K., A. Williams B., S. Dhanoa M., B. McAllan A., y France J. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. Anim. Feed. Sci. and Tech 48:185-197.
- Weatherburn M., W. 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. Anal. Chem 39:971-974.
- Williams B., McMullan J., y McCahey S. 2001. An initial assessment of spent mushroom compost as a potential energy feedstock, Bioresource Technology 79(3):227-230.

CONCLUSIONES GENERALES

- Al analizar la composición bromatológica del residuo del cultivo de *A. bisporus* completo y prensado a los 50, 60 y 90 d posteriores a la siembra se concluye que el residuo completo del día 60 tuvo mejor composición, y tomándose en cuenta que en este día es en donde se produce la mayor cantidad de residuos en las empresas champiñoneras, se decidió utilizar este residuo como ingrediente para la formulación de dietas experimentales para ovinos y realizar la producción de gas *in vitro*.
- El contenido aceptable de proteína, así como, los altos contenidos en minerales y la disminución de las fracciones de fibra, por la acción del hongo *A. bisporus*, especialmente por su producción enzimática fibrolítica, hacen del residuo del cultivo de *A. bisporus* un atractivo como ingrediente en una dieta integral para rumiantes cubriendo sus requerimientos nutricionales.
- Al evaluar el efecto de los diferentes porcentajes del residuo del cultivo de *A. bisporus* como ingrediente en una dieta para ovinos sobre la digestibilidad verdadera y la producción de gas *in vitro* se puede concluir que cuando el residuo se incrementa a más del 12 % en la dieta se ve una disminución de los parámetros antes mencionados.
- Las variables BM y eficiencia microbiana no se vieron afectadas con el incremento del residuo del cultivo de *A. bisporus*, sin embargo, la EM y la DMO se disminuyeron al incrementar el residuo del cultivo de *A. bisporus* en las dietas.

ANEXOS

ANEXO I

I.I. Obtención del inóculo ruminal. De una vaca fistulada con dieta a base de alfalfa, se obtuvo líquido ruminal, se colocó en termos de plástico en baño maría a 39 °C, bajo flujo continuo de CO₂ con el fin de crear una atmósfera anaerobia. El líquido ruminal se licuó durante 10 s, se filtró a través de 8 capas de gasa y se agregó a la solución mineral reducida a razón de 9:1, respectivamente.

I.II. Preparación de la Solución Mineral Reducida (SMR). La SMR se preparó con 50 mL de carbonato de sodio; 75 mL de solución mineral I: (6 g L⁻¹ de fosfato de potasio dibásico); 75 mL de solución mineral II: (6 g de fosfato de potasio monobásico, 6 g de sulfato de amonio, 12 g de cloruro de sodio, 2.45 g de sulfato de magnesio y 1 g de cloruro) y dos gotas de rezarsurina en 1000 mL de agua destilada. Se colocó la SMR en baño maría bajo flujo continuo de CO₂, se adicionó 50 mL de solución reductora constituida por 2 mL de hidróxido de sodio (1 N), 0.5 g de sulfuro de sodio; 0.5 de cisteína y una gota de rezarsurina.