



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GANADERÍA

**ACTIVIDAD DE ENZIMAS FIBROLITICAS y
FERMENTACION *IN VITRO* CON PAJA DE CEBADA Y
RAICILLA INOCULADAS CON *Pleurotus sapidus*.**

ALFONSO SOTO SÁNCHEZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2009

La presente tesis titulada: ACTIVIDAD DE ENZIMAS FIBROLITICAS y FERMENTACION *IN VITRO* CON PAJA DE CEBADA Y RAICILLA INOCULADAS CON *Pleurotus sapidus*. Realizada por el alumno: ALFONSO SOTO SÁNCHEZ, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS
RECURSOS GÉNETICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA

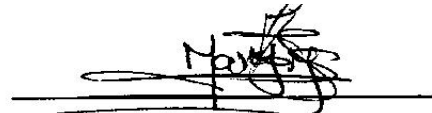
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



DR. EFRÉN RAMÍREZ BRIBRIESCA

ASESOR



DR. MARCOS MENESES MAYO

ASESOR



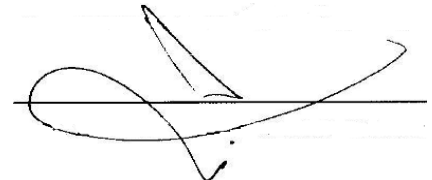
DR. OCTAVIO LOERA CORRAL

ASESOR



DR. RICARDO BÁRCENA GAMA

ASESOR



DR. LUIS A. MIRANDA ROMERO

Montecillo, Texcoco, estado de México, junio 2009.

ACTIVIDAD DE ENZIMAS FIBROLITICAS y FERMENTACION *IN VITRO* CON PAJA
DE CEBADA Y RAICILLA INOCULADAS CON *Pleurotus sapidus*.

ALFONSO SOTO SÁNCHEZ, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2009

El objetivo del presente trabajo fue conocer la acción enzimática del hongo basidiomiceto *Pleurotus sapidus* al actuar sobre los subproductos agroindustriales: Paja de cebada (PC), Raicilla (RC) y la Mezcla PC y RC 75:25 (M), además los cambios en su composición química que permitieran mejorar la digestibilidad de los subproductos usados en la alimentación de rumiantes. Se realizaron dos experimentos, el primero fue evaluar la actividad enzimática de lacasas, celulasas y xilanasas, a los 0, 8, 16 y 24 días de cultivo; las muestras obtenidas para cada tiempo se prensaron para obtener un extracto líquido (complejo enzimático) y posteriormente en el prensado residual se determinó la composición bromatológica de PC, RC y M en relación al valor inicial. Los resultados muestran que la actividad enzimática del hongo *Pleurotus sapidus* fue eficaz para la degradación de compuestos fibrosos y en especial del complejo lignina donde participa la enzima lacasa. En el segundo se evaluaron los cambios por efecto de *Pleurotus sapidus* a diferentes tiempos de fermentación en sustrato sólido (FSS); 0, 1, 8, 16 y 24 días, en la composición de nutrientes y fermentación ruminal *in vitro* (FRIV). La fermentación se determinó con la técnica de producción de gas para obtener el volumen máximo de gas (V; mL g⁻¹ MS), la tasa de fermentación (S; h⁻¹) y tiempo de retardo (L; h). En el tratamiento M resultó ser el mejor en la digestibilidad *in vitro* de la materia seca.

Palabras clave: Fermentación en sustrato sólido, digestibilidad, AGV, FDN, FDA, Lignina.

FIBROLITIC ENZYME ACTIVITY AND *IN VITRO* FERMENTATION OF BARLEY
STRAW AND ROOTS INOCULATED WITH *Pleurotus sapidus*.
ALFONSO SOTO SÁNCHEZ, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2009

The aim of this study was to know the effect of the enzymatic action of the basidiomycete fungus *Pleurotus sapidus* by acting on the agro-products of barley straw crops (BS), roots (BR) and a mixture BS and BR 75:25 (M) and changes in chemical composition caused to improve the digestibility of these products when used in feed for ruminants, for which two experiments were conducted in the first one The objective was to assess the enzymatic activity was evaluated on the 0, 8th, 16th and 24th days of crop, the samples were obtained for each time pressed to obtain a liquid extract (enzymatic complex) and in the residual pressing the bromatologyc composition of BS, BR and M The results demonstrate that the enzymatic activity of the *Pleurotus sapidus* fungus is especially effective for the degradation of fibrous compounds and specially, of the lignine complex where the laccase enzyme participates. In the second one evaluated The effect of *Pleurotus sapidus* was determined at different fermentation times in solid substrate (FSS; 0, 1, 8, 16 and 24 days), on the composition of nutrients and *in vitro* ruminal fermentation (IVRF). The fermentation was determined with the gas production technique measuring the maximum volume of gas at different times of IVRF, (V; mL g⁻¹ DM); fermentation rate (S; h⁻¹) and delay rate (L; h), and the M substrate improved the *in vitro* digestibility of dry matter. with a better use of the forage resources.

Keywords: fermentation in solid substrate, digestibility, VFA, NDF, ADF, Lignin.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por el don de la vida, la capacidad de sorpresa y el deseo de superación.

Al Programa de Mejoramiento del Profesorado (PROMEP) por la beca otorgada.

A las autoridades del CICB, Dr. Baruch Nolasco y Saldaña y Dr. Armando García Téllez por todo su apoyo.

Este proyecto de tesis fue apoyado por la beca para estudios de doctorado PROMEP N° 103.6/04/1143 financiado por el proyecto CONACYT 42782-Z y la línea 7 Inocuidad, Calidad de alimentos y bioseguridad así como la línea 11 Sistemas de Producción agrícola, pecuaria, forestal, acuícola y pesquera del Colegio de Postgraduados.

Al Colegio de Postgraduados, destacada Institución por darme la oportunidad de realizar el doctorado.

A todos mis profesores, por impartir conocimiento sin límite y ser mis guías.

Al Dr. Efrén Ramírez Bribiesca, por su disposición, comprensión y asesoría gracias por su amistad, apoyo y aceptarme como alumno.

Al Dr. Marcos Meneses Mayo, por sus atinados comentarios y valiosa asesoría.

Al Dr. Luís Alberto Miranda Romero, por su incondicional apoyo, capacidad, consejos y tiempo.

Al Dr. Octavio Loera Corral, mi agradecimiento por todo su apoyo, ejemplo y tiempo dedicado de la presente investigación.

Al Dr. Ricardo Bárcena Gama, por su ejemplo, conocimiento, consejos y apoyo en todo momento.

A mis compañeros de Doctorado: Javier Piloni y Pedro Zetina.

A los compañeros de época estudiando Maestría: Rocío (QEPD), Armando, Pedro, Abigail, Juan Carlos, Samuel, Laura, Vicente, Luis, Wendy, Yudisel, Guille, por todo el afecto y apoyo, que siempre me brindaron.

En especial a Benigno, Pau, Antonio Donato, Javier.

A Gabriel e Ibar, (estudiantes brillantes) Dra. Magdalena, Sr. Agustín, Sr. Anastasio Química Laura, Sr. Andrés.

A todos mis amigos del Colegio, secretarias y trabajadores, y al personal del laboratorio de microbiología pecuaria del departamento de zootecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, y de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa, sin mencionar nombres, por temor a omitir alguno.

DEDICATORIA

A mi esposa **HILDA** por tu ayuda, por confiar en mí, por el cariño y comprensión, por ser como eres y por sobre todo por el tiempo en que hemos caminado juntos.

A mi querida hija **ANDREA**, tu eres una persona especial.

A mis padres Severo Soto de la Barreda (QEPD) y Amanda Sánchez López, por darme la vida, por su ejemplo y enseñarme a respetar y buscar mi superación, por sus consejos y apoyo.

A mis hermanos José Luis, Ángel, Severo, Miriam y Miguel Ángel, por ser como son y por lo mucho que pueden aportar a los que la vida les da la oportunidad de conocer.

A familiares y amigos que siempre están aún en momentos buenos y adversos.

Jaime, Elba, Oscar G., Paty, Edgar, Paty, Oscar V., Angelines, Héctor.

A los que sin buscarlos son mis enemigos, que vean que su oposición y descrédito me motiva a seguir en la búsqueda de ser un mejor individuo.

Este estudio fue financiado por: Programa de Mejoramiento al Profesorado-SEP (PROMEP-México, Número 103.6/04/1143). Y por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACYT) con el financiamiento del proyecto número 42782-Z y la línea 7 Inocuidad, Calidad de alimentos y bioseguridad así como la línea 11 Sistemas de Producción agrícola, pecuaria, forestal, acuícola y pesquera del Colegio de Postgraduados.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN GENERAL	1
LITERATURA CITADA	7
1. ACTIVIDAD DE ENZIMAS FIBROLITICAS DE <i>Pleurotus sapidus</i> SOBRE PAJA DE CEBADA Y RAICILLA	
1.1 RESUMEN	11
1.1 ABSTRACT	12
1.2 INTRODUCCIÓN	13
1.3 MATERIALES Y MÉTODOS	15
1.4 RESULTADOS	19
1.5 DISCUSIÓN	27
1.6 CONCLUSIONES DEL PRIMER ARTÍCULO	33
1.7 AGRADECIMIENTOS	33
1.8 LITERATURA CITADA	34
2. FERMENTACION <i>IN VITRO</i> DE PAJA DE CEBADA Y RAICILLA TRATADAS CON <i>Pleurotus sapidus</i> DETERMINADA POR LA TÉCNICA DE PRODUCCION DE GAS	
2.1 RESUMEN	38
2.1 ABSTRACT	39
2.2 INTRODUCCIÓN	40
2.3 MATERIALES Y MÉTODOS	42
2.4 RESULTADOS	46
2.5 DISCUSIÓN	56
2.6 CONCLUSIONES DEL SEGUNDO ARTÍCULO	61
2.8 LITERATURA CITADA	62
3. DISCUSIÓN GENERAL	66
3.1 LITERATURA CITADA	70
4. CONCLUSIÓN GENERAL	72

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Composición de la paja de cebada, cambios en la celulosa, hemicelulosa y lignina. por el tiempo de incubación	25
Tabla 1.2. Composición de la raicilla, cambios en la celulosa, hemicelulosa y lignina. por el tiempo de incubación	25
Tabla 1.3. Composición de la mezcla de paja de cebada y raicilla, cambios en la celulosa, hemicelulosa y lignina por el tiempo de incubación	26
Tabla 2.1. Proporción de FDN, FDA y lignina, celulosa y hemicelulosa en paja de cebada (PC), raicilla (RC), y la mezcla de ambos (M) a distintos días de tratamiento con el cultivo de <i>Pleurotus sapidus</i> .	49
Tabla 2.2. Variables de producción de gas (V, S y L), digestibilidad ruminal <i>in vitro</i> , proporción de AGV, EM, masa microbiana y digestibilidad de la MO de sustratos fibrosos de muestras (0 y 24 d.) de FSS.	51
Tabla 2.3. Parámetros (V, L, S) de producción de gas, digestibilidad de la materia seca, proporción de ácidos grasos volátiles, EM, DMO y masa microbiana, durante la fermentación ruminal <i>in vitro</i> de paja de cebada (PC), raicilla (RC) y la mezcla de ambos (M) con diferentes días de tratamiento con <i>Pleurotus sapidus</i> .	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Cinética de la producción de celulasas por <i>P.sapidus</i> sobre paja de cebada (PC), raicilla (RC) y la mezcla (M) PC y RC (75:25)	23
Figura 1.2 Cinética de la producción de xilanasas por <i>P.sapidus</i> sobre paja de cebada (PC), raicilla (RC) y la mezcla (M) PC y RC (75:25)	23
Figura 1.3 Cinética de la producción de lacasas por <i>P.sapidus</i> sobre paja de cebada (PC), raicilla (RC) y la mezcla (M) PC y RC (75:25)	24
Figura 1.4 Cinética de la producción de proteína por <i>P.sapidus</i> sobre paja de cebada (PC), raicilla (RC) y la mezcla (M) PC y RC (75:25)	24
Figura 2.1 Producción fraccional de gas de muestras fermentadas (0 y 24 d) durante la fermentación ruminal <i>in vitro</i> de Paja de cebada (PC) Raicilla (RC) y Mezcla (M, 75:25) sin (1a) y con tratamiento (1b) con <i>P. sapidus</i>	50
Figura 2.2 Cinética de producción de gas durante la fermentación ruminal <i>In vitro</i> de (a) paja de cebada (PC) (b) raicilla (RC) y (c) una mezcla (75:25) de PC y RC tratadas con <i>P. sapidus</i> a diferentes tiempos de incubación.	55

INTRODUCCIÓN GENERAL

La ganadería en México presenta grandes contrastes, pues hay desde las explotaciones ganaderas muy tecnificadas con alta eficiencia productiva, hasta las que carecen de tecnología y de los más elementales medios y recursos en el medio rural. Los estados, principalmente los localizados en la zona del altiplano de México, enfrentan cotidianamente el problema de la disponibilidad de forrajes (INEGI, 2002), debido a varios factores, como el sobrepastoreo de la vegetación nativa, cambios climáticos por el calentamiento global, destacando tanto la sequía como el exceso de humedad y pérdida de áreas dedicadas al pastoreo debido a la urbanización, lo que ha obligado a la mayoría de los pequeños productores de las comunidades rurales a trasladar a sus animales a las afueras de los poblados, a orillas de caminos y terrenos de cultivo, en donde consumen el escaso forraje que en forma natural crece (Rzedowski, 2006).

En diferentes foros se ha mencionado que los rumiantes, debido a su alimentación a base de forrajes, son grandes emisores de metano (25% gas atmosférico) que incrementa el calentamiento global (Johnson y Johnson, 1995; Moss *et al.*, 2000; Beauchemin y Mc Ginn, 2005), además de ser poco eficientes en la conversión del alimento a producto, comparativamente con otras especies como el cerdo y las aves (Shimada, 2003), y que al ser alimentados con granos, éstos compiten con la alimentación humana, aún cuando actualmente se emplean para la producción de biocombustibles (etanol), motivo del incremento en los precios de los granos en general, y en particular del maíz (Raffin, 2008).

El bajo valor nutritivo y disponibilidad de los forrajes, causa problemas principalmente a productores de cabras y ovejas que representan el 68% de los ganaderos en pequeña escala a nivel nacional y en menor proporción a criadores de bovinos (SAGARPA, 2001). En época de lluvias el ganado encuentra suficiente alimento, y esto le permite alcanzar regular condición corporal; sin embargo, en época de seca los incrementos de peso logrados se pierden e incluso muchos animales mueren por desnutrición, tanto adultos como crías, ya que en esta época ocurren los partos, lo que representa una doble pérdida, en recursos y en ganado.

El crecimiento de las agroindustrias ha generado una enorme cantidad de desechos vegetales, lo que conlleva el riesgo de ser potencialmente contaminantes (Meneses, 2002), además de una gran cantidad de subproductos agrícola, como pajas y material vegetativo no aprovechables para consumo humano, las cuales son desechadas en tiraderos abiertos favoreciendo la proliferación de fauna nociva, o en rellenos sanitarios sin beneficio alguno, y afectando los mantos freáticos, o más grave, cuando son quemadas con el consecuente impacto negativo en la atmósfera.

Como alternativas de tratamiento biológico se ha incorporado en el ensilaje ciertas cantidades de estos subproductos; sin embargo, esta tecnología se ha apoyado poco y difundido por los gobiernos y organismos del sector agropecuario (Bouqué y Fiems, 1988; Hadjipanayiotou, 1993; FAO, 1999).

Es evidente la necesidad de buscar alternativas económicas y prácticas que permitan alimentar a ovinos, caprinos y bovinos reduciendo la competencia con el hombre por los granos, la conservación de forraje para su uso en la época de secas; lograr un mejor

aprovechamiento del abundante recurso disponible, como son forrajes, paja de cebada, avena, rastrojo de maíz, desechos agroindustriales etc., modificando su composición para hacerlos más degradables, mediante procedimientos biotecnológicos no agresivos con el medio ambiente. Al respecto la literatura científica reporta que como alternativas de tratamiento biológico se han incorporado al ensilaje, pajas y material vegetativo no aprovechables para otros fines y que resultan potencialmente aprovechables para alimentación animal (Bouqué y Fiems, 1988; Hadjipanayiotou, 1993; FAO, 1999).

Esto hace urgente el que se aprovechen al máximo este tipo de alimentos, por una parte mediante la conservación de forraje para la época de secas, y por la otra modificando su composición para hacerlo más aprovechable para los rumiantes. Gracias a la acción enzimática de microorganismos se ha modificado la composición de recursos forrajeros, por ejemplo degradando la lignina, se logra incrementar la digestibilidad del forraje al usarlo en alimentación de rumiantes (Gómez y Viniegra, 1981). Los hongos gracias a sus enzimas, por una parte liberan recursos atrapados y no disponibles para las bacterias ruminales y por otra son recursos que por su composición aportan nutrientes beneficiando al animal que los consuma al presentarse un posible efecto probiótico y prebiótico (Roberfroid, 2000).

La cebada, al aumentar la edad de la planta registra incremento en el contenido de lignina, también cambia su composición química (principalmente agua, algunos carbohidratos compuestos nitrogenados, Na y K) de acuerdo con las prácticas de cultivo, variedad y condición del suelo (Murray, 2006), por lo que el contenido de proteína cruda (PC) en general es bajo, menor al 7% y su concentración tiende a disminuir en la paja.

La paja de cebada es un recurso abundante y fácil de adquirir. Por costumbre en el altiplano Mexicano se colecta y almacena entre los meses de septiembre y noviembre. El material que no se recoge es quemado en el mismo terreno, con los efectos negativos ya comentados.

Existen antecedentes del uso de la raicilla como alimento para el ganado; éste es un subproducto de la industria y resulta del proceso de: hidratación, germinado y extracción de recursos para la elaboración de la cerveza; el residuo seco se dispone y usa sin tratamiento para aplicarlo a la dieta de no rumiantes y rumiantes (Fernández-Mayer y Pelta, 2007). Se utiliza en México y otros países, de manera directa a la dieta, sin tratamiento o en el mejor de los casos, adicionada con melaza para complemento de la ración de vacas lecheras. La raicilla en un inicio fue considerada un desecho en las plantas procesadoras de malta y se otorgaba sin costo a los interesados, solamente comprometiéndose a retirar este material con la oportunidad requerida para evitar su acumulación y deterioro. Al correr el tiempo y después de ser revalorada por su contenido de nutrientes, principalmente el contenido proteínico, su demanda aumentó y empezó a ser comercializada. La raicilla se reporta con las siguientes características, en promedio: 93.7 % de MS, 28.1 % de PC, 25.5 % de FDN 17.2 % de FDA, 1.32% de Lignina, 2.7 Mcal kg⁻¹ de MS. (NRC, 1989).

La raicilla presenta variación en su proporción nutrimental, de acuerdo a la composición del producto desechado por la industria y a las prácticas o métodos de eliminación del material de desecho, ya que en algunas plantas productoras de malta le es agregado el desecho del producto no calificado para someterlo al proceso (grano delgado, sin

capacidad de germinación, quebrado, etc.), se evaluará en este trabajo si estas características del sustrato afectan al crecimiento o desempeño del hongo *Pleurotus*.

Mediante la acción enzimática, el hongo *Pleurotus sapidus*. logra obtener recursos para su provecho, esta cualidad se ha aplicado en varios campos de biotransformación como son la industria alimenticia, química industrial, biorremediación y alimentación de especies domésticas. Bajo esta premisa varios investigadores (Karunanandaa *et al.*, 1995; Zadrazil *et al.*, 1996), sugieren un uso potencial de los sustratos después de ser sometidos a acción enzimática de hongos de pudrición blanca como *Pleurotus*, para alimentación de ganado. Sin embargo, a la fecha no hay reportes de investigación usando a la raicilla, ni la mezcla de esta con paja de cebada, no obstante, esta capacidad probada del hongo, se puede aprovechar por las bacterias ruminales en beneficio del rumiante, logrando un mayor y mejor aprovechamiento de los recursos existentes.

Se realizó la fermentación en sustrato sólido (FSS), evaluando los cambios provocados por la acción enzimática del hongo *P. sapidus* cepa adquirida en el laboratorio Prodicet, México para aumentar su aprovechamiento por los rumiantes.

Los trabajos de investigación de esta tesis se presentan en dos artículos:

1) Actividad de Enzimas Fibrolíticas de *Pleurotus sapidus* Sobre Paja de cebada y Raicilla. 2) Producción de gas derivado de la fermentación ruminal *in vitro* de la paja de cebada y raicilla tratadas con *Pleurotus sapidus*. Los objetivos del primer artículo son determinar por una parte el efecto de la acción de las enzimas del hongo *Pleurotus sapidus* sobre la paja de cebada, la raicilla, y una mezcla (75:25) de ambos

subproductos y posteriormente al ser proporcionados como alimento, permitan a las bacterias del rumen disponer de recursos a los que en forma normal, no tienen acceso. Además se evaluó el efecto del hongo *Pleurotus sapidus* sobre la composición química de la paja de cebada, raicilla y la mezcla, realizando el registro de la actividad enzimática de celulasas, xilanasas lacasas y la producción de proteína fúngica, Los objetivos del segundo artículo fueron el registro de los cambios por acción de *Pleurotus sapidus* a diferentes tiempos de FSS, en la composición de nutrientes y fermentación ruminal *in vitro* (FRIV) de los tres subproductos, con el fin de determinar el efecto que se produce sobre la digestibilidad.

Para lo cual, antes y después de someter a tratamiento a los subproductos mencionados se realizó el análisis bromatológico para cuantificar los cambios ocurridos por efecto de la acción enzimática de *Pleurotus sapidus* y por la modificación que por efecto de las bacterias ruminales ocurrieron en ellos.

LITERATURA CITADA

- Beauchemin, K. A., and McGinn, S.M. 2005. Methane emissions from feedlot cattle fed barley or corn diets. *J. Anim. Sci.* 83: 653-661.
- Bouqué, C.V., & Fiems, L.O. 1988. Vegetable by-products of agro-industrial origin. *Livest. Prod. Sci.* 19: 97-135.
- FAO. 1999 Uso del ensilaje en el trópico privilegiando opciones para pequeños campesinos. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/005/x8486S/x8486S00.pdf> [en línea] [consultado 2 de diciembre 2008].
- Fernandez-Mayer, A., y Pelta, H. 2007. La sequía: ¿ Otra amenaza en los planteos ganaderos? E.E.A, INTA Bordenave. www.Producción-animal.com.ar [en línea] [consulta 3 de diciembre 2008].
- Gómez G., Viniegra G. 1981. Orientation of sugar fermentation inoculated with heterogeneous microbiol population from cow-dung. *Advances in Biotech.* 2: 627-632.
- Hadjipanayiotou, M. 1993. Voluntary intake of citrus pulp-poultry litter silage by growing female Friesian calves, lambs and Damascus kids. *Agric. Res. Inst., Nicosia Techn. Bull.*, No.155.
- INEGI 2002. Instituto Nacional de Geografía e informática Superficie- tipo de uso y vegetación -2002- entidad federativa Principales usos del suelo y tipos de vegetación

por entidad federativa.[en línea] <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos> [fecha de consulta 31 de marzo de 2009].

Johnson, K. A. and D. E. Johnson. 1995. Methane emissions in cattle. *J. Anim. Sci.* 73: 2483-2492.

Karunanandaa, K., Varga, G.A., Akin, D.E., Rigsby, L.L., Royse, D.J. 1995. Botanical fractions of rice straw colonized by white-rot fungi: changes in chemical composition and structure. *Anim. Feed Sci. Technol.* 55: 179-199.

Meneses M. M. 2002. Evaluación nutritiva y fermentativa del ensilado de dos subproductos agroindustriales, Brócoli (*Brassica oleracea*, L. Var. Itálica) y Alcachofa (*Cynara scolymus*, L) para su empleo en la alimentación animal. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia, España. Departamento de Producción animal.

Moss, A. R., J. P. Jouany, y C. J. Newbold. 2000. Methane production by ruminants: Its contribution to global warming. *Ann. Zootech.* 43: 231-253.

Murray, W.N. 2006. Introducción a la botánica. Pearson Education, S.A., Madrid, ISBN 10: 84-7829-073-7; 13: 978-84-7829-073-4. pág. 242-265.

NRC 1989. Nutrient requirements of dairy cattle.Sixth Revised Edition National Academy Press. Washintong, D.C.

Raffin del R. A. 2008. Causas y efectos de los llamados biocombustibles, alarma en el sector ganadero [en línea] disponible en www.ecoportel.net/content/view/full/75854

Roberfroid, M.B., 2000. Prebiotics and Probiotics: Are They Functional Foods?. Am. J. Clin. Nut. 71: 1682S-1687S.

Rzedowski, J. 2006. Vegetación de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. 504 p.

SAGARPA., 2001. 1^{er}. ENCUENTRO DE PRESIDENTES MUNICIPALES “El Municipio y el Desarrollo Rural. Subsecretaria de desarrollo Rural, Dirección General de Programas Regionales y Organización Rural, Instituto Nacional de Capacitación del sector Agropecuario, A.C. Mexico D.F., 27 y 28 de noviembre de 2001, Equipo del INCA Rural. p 70.

Shimada, M.A., 2003. Nutrición animal Libro Trillas., México, ISBN 968-24-6563-X p. 16, 64.

Zadrazil F., D.N. Karma, O.S. Isikhuemhen, F. Schuchardt, G. Flachowsky. 1996. Bioconversion of Lignocellulose into Ruminant Feed with White Rot Fungi – Review of Work Done at the FAL, Braunschweig. J. Appl. Anim. Res. 10: 105-124.

**ACTIVIDAD DE ENZIMAS FIBROLÍTICAS DE *Pleurotus sapidus* SOBRE PAJA
DE CEBADA Y RAICILLA**

**FIBROLITIC ENZYME ACTIVITY OF *Pleurotus sapidus* ON BARLEY STRAW
AND BARLEY ROOTLESS**

1. ACTIVIDAD DE ENZIMAS FIBROLÍTICAS DE *Pleurotus sapidus* SOBRE PAJA DE CEBADA Y RAICILLA¹

El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad enzimática de lacasas, celulasas y xilanasas, así como la composición bromatológica del cultivo sólido de paja de cebada (PC), raicilla (RC) y una mezcla (M) de PC y RC con el hongo *Pleurotus sapidus*. La actividad enzimática se evaluó a los 0, 8, 16 y 24 días de cultivo, las muestras obtenidas de cada tiempo se prensaron para obtener un extracto líquido (complejo enzimático) en el cual se evaluó la actividad enzimática así como la proteína soluble secretada por el hongo. En el prensado residual se determinó la composición bromatológica. La actividad de las enzimas y concentración de proteína soluble se incrementó ($P > 0.001$) entre 8 y 16 días de cultivo para todos los tratamientos. La actividad de celulasas ($3.2 \text{ UI g}^{-1}\text{MS}$) fue mayor ($P < 0.001$) en la mezcla (M) para PC y RC (2.5 y $2.3 \text{ UI g}^{-1}\text{MS}$, respectivamente). La actividad de xilanasas mostró diferencias ($P < 0.001$) entre tratamientos desde el inicio del cultivo. La actividad lacasa fue mayor en los tratamientos PC y M; en este último la actividad alcanzó $47.06 \text{ UI g}^{-1} \text{MS}$ el día 24. La RC tuvo un menor contenido de FDN y FDA lo cual permitió que el hongo disminuyera ($P < 0.001$) el contenido de lignina de 11.7 a $6.9 \text{ (g Kg}^{-1}\text{)}$ e incrementara el contenido de nitrógeno en 1.8 g Kg^{-1} después de 24 días de cultivo. La M mostró diferencias ($P < 0.01$) en el contenido de lignina entre días, disminuyendo $2.4 \text{ (g Kg}^{-1}\text{)}$ contra el valor inicial. Se muestra que la actividad del hongo *P. sapidus* es eficaz para la degradación de compuestos fibrosos y en especial del complejo lignina donde participa la enzima lacasa, este tipo de pre-tratamientos puede mejorar la digestibilidad.

¹ Enviado a: Folia Microbiologica, recibida en May 25, 2009

FIBROLITIC ENZYME ACTIVITY OF *Pleurotus sapidus* ON BARLEY STRAW AND BARLEY ROOTLESS

The objective of this study was to identify and evaluate the enzymatic activity of laccases, cellulases and xylanases, as well as the bromatologic composition of barley straw crop (BS), barley rootless (BR) and a mixture of 75% of BS and 25% of BR (M) with the *Pleurotus sapidus* fungus. The enzymatic activity was evaluated on the 0, 8th, 16th and 24th days of crop, the samples obtained for each time were pressed to obtain a liquid extract (enzymatic complex) in which the enzymatic activity and the soluble protein segregated by the fungus were evaluated; and in the residual pressing the bromatologic composition was determined. The activity of enzymes and soluble protein concentration was increased ($P > 0.001$) between 8 and 16 days of crop for all the treatments. After 24 days, the cellulases activity ($3.2 \text{ UI g}^{-1}\text{MS}$) was greater ($P < 0.001$) in the mixture (M) than in the BS and BR (2.5 and $2.3 \text{ UI g}^{-1}\text{MS}$, respectively). The activity of xylanases showed differences ($P < 0.001$) between treatments from the beginning of the crop, having its maximum activity on the 16th day. The activity of laccases was greater in the BS and M treatment. In this last treatment, the activity reached the $47.06 \text{ UI g}^{-1}\text{MS}$ on the 24th day. The barley rootless had a minor content of NDF and FDA which allowed that the fungus diminished ($P < 0.001$) of the content of lignine from $11,68$ to $6,91 \text{ (g Kg}^{-1}\text{)}$ and increased the nitrogen content in 1.81 g Kg^{-1} after 24 days of crop. The mixture (M) showed ($P < 0.001$) differences in the content of lignine between days of crop, falling $2,43 \text{ (g Kg}^{-1}\text{)}$ in relation to the initial value. The results demonstrate that the *Pleurotus sapidus* fungus is especially effective for the degradation of fibrous compounds and specially, of the lignine complex where the laccase enzyme participates, reason why this type of pre-treatments can improve the digestibility.

1.2 INTRODUCCION

La raicilla es un subproducto de la producción de cerveza, que se obtiene de la germinación del grano de cebada y durante el proceso se hidroliza el almidón a azúcares para obtener la malta cervecera. El contenido promedio de materia seca es de 87 % y el de proteína total es de 25.5%. En México la producción de la malta cervecera se obtiene del grano de cebada. En el año 2007 la producción de este grano alcanzó las 400,000 toneladas (SAGARPA, 2007) lo que generó 217,600 toneladas de paja. Ambos subproductos, raicilla y paja de cebada son utilizados en la alimentación de animales de uso pecuario. La raicilla se utiliza en la alimentación de rumiantes y no rumiantes, como una fuente de proteína; mientras que la paja de cebada solo se utiliza como fuente de fibra y complemento alimenticio para la subsistencia de rumiantes.

Para mejorar la calidad nutritiva de la paja se ha sometido a procesos físicos, químicos y mecánicos. El proceso de picado es muy difundido pero no es aplicado comúnmente por la falta de cultura y de equipo; el uso de amoníaco aplicado directamente a la paja llegó a difundirse ampliamente por la Secretaría de Agricultura y Ganadería; sin embargo los altos costos y la falta de subsidio lo hacen poco rentable. Actualmente se busca el uso de tecnologías limpias, por lo que se han incorporado biotecnologías que involucran el uso de hongos de la pudrición blanca como método biológico para mejorar la calidad nutricional de los subproductos (Avila, 2004; Luna-Rodriguez *et al*2007). El hongo *Pleurotus* tiene la capacidad de degradar la lignina, complejo que limita la digestibilidad de los carbohidratos estructurales contenidos en las pajas. Diversas publicaciones, entre otros

(Rodríguez *et al* 2002; Pollizelli *et al*,2005; Elisashvili *et al*, 2008) indican que el mecanismo enzimático por parte del *Pleurotus* tiene efectividad para degradar moléculas complejas como la lignina, y otros compuestos estructurales, dado que posee un sistema multienzimático que se lo permite. El sistema ligninolítico se caracteriza por la producción de las enzimas: lacasa, manganeso peroxidasa, y veratril alcohol oxidasas; sin embargo, en *Pleurotus* no se ha encontrado lignina peroxidasa (Rodríguez *et al.*, 2002; Membrillo *et al.*, 2008).

En las investigaciones publicadas que hacen referencia al uso de las pajas tratadas con hongos, no hay estudios donde evalúen la actividad enzimática de hongos de la pudrición blanca cultivados en mezclas de sustratos de la industria maltera. El objetivo de esta investigación fue evaluar la producción de enzimas fúngicas exógenas (celulasas, xilanasas y lacasas) del *Pleurotus sapidus* cultivado en paja de cebada, raicilla y mezcla de paja con raicilla.

1.3. MATERIALES Y MÉTODOS

Se obtuvieron muestras de paja de cebada de un solo predio, localizado en el Municipio de Calpulalpan, en el Estado de Tlaxcala, México y raicilla de la industria cervecera de la empresa denominada Cebadas y Maltas S.A. de C.V. En ambos casos, las muestras fueron de un mismo lote y se mantuvieron en bolsas de plástico selladas, libres de otros materiales como polvo, humedad y roedores, a una temperatura controlada de 26°C. Se realizó un pretratamiento que consistió en hidratado y pasteurización de las muestras antes de emplear el cultivo sólido. El estudio se realizó durante los meses de septiembre a noviembre de 2006 en el Colegio de Postgraduados, en colaboración con el laboratorio de Enzimología y Biología Molecular de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

Lotificación de tratamientos. La paja molida se mezcló con la raicilla, por medio de una mezcladora mecánica horizontal de paletas con capacidad para 500 kg. localizada en la planta de producción de alimentos del Colegio de Postgraduados en Montecillo, Estado de México, quedando distribuidos los siguientes tratamientos: Paja de cebada (PC), raicilla (RC) y la mezcla (M) de 75% BS y 25% BR. Todos los tratamientos se envasaron en bolsas de plástico (90 x 120 cm), se identificaron y se realizó la siembra del hongo *Pleurotus sapidus* (cepa adquirida en el laboratorio Prodicet, México). El micelio, después de ocho días de haber invadido totalmente al grano de sorgo entero, se aplicó en una proporción de 5% p/p con el sustrato.

Siembra y proceso de cultivo sólido. Se depositaron 5 kg de cada sustrato (PC, RC y M) en bolsas porosas y se hidrataron en un recipiente metálico de 200 L de capacidad hasta alcanzar el peso de 8.75 a 9.00 kg (sin escurrimiento) con agua corriente, posteriormente fue pasteurizada a 80°C por una hora y se dejó drenar el agua por espacio de 1 h. Los sustratos pasteurizados se extendieron sobre una mesa y se dejaron enfriar hasta una temperatura de 25°C registrada por medio de un termómetro. La humedad final de los sustratos fue de 70 a 80%. Se depositaron 475 g de sustrato en bolsas de plástico (40 x 60 cm) y se inocularon con 25 g de sorgo más micelio de *Pleurotus sapidus*. En la misma bolsa se repitió el procedimiento de inoculación tres veces hasta completar 2 kg por bolsa. Las bolsas fueron cerradas herméticamente. Se inocularon cuatro bolsas (repeticiones) por tratamiento y por tiempo de incubación (cuatro) para un total de 48 bolsas procediendo a la FSS.

Las bolsas con sustrato inoculado se incubaron a 25°C, humedad relativa de 80% y luminosidad no mayor de 20%, en una cámara oscura con temperatura controlada. El cultivo se detuvo a los 0, 8, 16 y 24 días de incubación, para proceder al análisis bromatológico y/o enzimático.

Análisis bromatológico: Se tomaron muestras representativas de sustratos de cada bolsa en los diferentes tiempos de cultivo sólido. Las muestras se secaron a 70°C por 24 h y se molieron en un micro molino de martillos, con una criba de 1 mm. Las muestras se identificaron y almacenaron hasta la realización de los análisis de MS, MO (AOAC, 2007) Proteína total (método de Kjeldhal), FDA, FDN, Lignina (ANKON, 2000) y, por diferencia, se calculó la proporción: $FDN - FDA = \text{celulosa}$ y $FDA - \text{lignina} - \text{cenizas} = \text{hemicelulosa}$.

Actividad enzimática.

Para la cuantificación de actividad enzimática, se tomaron 100 g de muestra fermentada de cada bolsa y se mezclaron con 600 ml de solución Buffer de citratos (pH 5.3; 50 mM) por 15 minutos y, posteriormente, se prensó manualmente para obtener el extracto enzimático. El extracto se centrifugó por 30 min a 59,988.0 g a 4°C.

La actividad de celulasas y xilanasas se midió usando la metodología propuesta por Loera y Córdova (2003) mediante la cuantificación de azúcares reductores por el método de ácido dinitrosalicílico (DNS; Miller, 1959). Como sustratos para medir la actividad de celulasas se usó carboximetilcelulosa (CMC, Sigma) al 0.5% en solución amortiguadora de citratos (50 mM y pH 5.3). La actividad de xilanasas se determinó usando como sustrato de referencia xilán de avena (Sigma X-0627). La concentración de azúcares reductores se determinó por absorbancia a longitud de onda de 540 nm en un espectrofotómetro (DU 640 Beckman).

La actividad enzimática de celulasas y xilanasas se reportó en Unidades Internacionales (UI), definiendo la UI como la cantidad de enzima que libera un μmol de azúcar reductor (glucosa o xilosa) por minuto. Para cada fermentación, la actividad se expresó en UI por gramos de MS ($\text{UI g}^{-1}\text{MS}$) de sustrato fermentado.

La actividad de lacasas se midió diluyendo 0.1 mL de extracto enzimático en (0.8 mL de solución amortiguadora de citratos 50 mM y pH 5.3), esta mezcla se incubó en baño maría por un minuto a 40 °C; posteriormente, se adicionó el sustrato de referencia 2, 2' Azino-bis ácido 3-etilbenzen-tiazolino-6-sulfónico (ABTS: 0.1 M y coeficiente de

extracción molar de 36.000) y se registró la absorbancia a una longitud de onda de 420 nm en el tiempo 0 y cada 30 segundos hasta los 10 minutos. La unidad de actividad (UI) se definió como la cantidad de enzima que produce un μmol de sustrato oxidado por minuto bajo las condiciones de la reacción. La concentración de proteína se determinó con el método de Bradford (1976). La actividad se reportó en $\text{mg g}^{-1} \text{MS}$

Análisis estadístico. Se usó un modelo en bloques completamente al azar. Con cuatro repeticiones (Steel y Torrie, 1986). Los tratamientos fueron (PC, RC y M) y el tiempo (bloques: 0, 8, 16 y 24 días) Los datos se analizaron con el procedimiento MIXED del programa estadístico SAS (2002). Se realizó comparación de medias con la prueba de Tukey (Steel y Torrie, 1986) y contrastes de tipo lineal y cuadrático (SAS, 2002).

1.4 RESULTADOS

Análisis bromatológico

En las tablas 1.1, 1.2 y 1.3 se muestran la composición bromatológica PC, RC y M, respectivamente, respecto al tiempo de cultivo en medio sólido. El contenido de MS fue igual ($P > 0.05$) entre tratamientos y tiempo. La materia orgánica (MO) tuvo un efecto lineal con el tiempo ($P < 0.0001$), en los tres tratamientos, y la disminución del contenido de MO en PC, RC y M fue diferente entre 0 y 24 días de incubación, en 2.0 %, 0.6 % y 4.2 %, respectivamente; esta respuesta se debe a la utilización de la materia disponible por el hongo para su crecimiento.

En el contenido de proteína se observó diferencias entre tratamientos ($P < 0.0001$), efecto lineal para PC y efecto cuadrático para RC y M ($P < 0.0001$). Durante el tiempo de cultivo, la proteína incrementó linealmente en 0.94 puntos porcentuales en PC. En los tratamientos RC y M la máxima concentración de proteína fue a los 16 días con incrementos de 1.9 y 1.3 puntos porcentuales. Esta respuesta se debe a la actividad que tiene el hongo para transformar los recursos existentes, principalmente fibra, polímeros de carbohidratos estructurales y lignina. El hongo produce sus recursos y el excedente puede resultar disponible para los microorganismos ruminales mencionan (Krause *et al.*, 2003), algunos polímeros presentes en los forrajes son de difícil transformación por las bacterias ruminales y son rápidamente hidrolizados y transformados por la acción enzimática del hongo, sintetizando recursos como son ácidos grasos, así como proteína y aminoácidos, que ocupa

para su crecimiento y posteriormente son usados por las bacterias ruminales, estas células microbianas son el mayor recurso de proteínas y aminoácidos para ser absorbidos en el intestino delgado de los rumiantes.

La FDA disminuyó ($P < 0.0001$) en el último tiempo de incubación (a 24 d), en 3.2, 0.97 y 1.9 puntos porcentuales para los tratamientos de PC, RC y M, respectivamente. La FDN presentó diferencias significativas entre los tres tratamientos ($P < 0.0001$) principalmente la disminución en el contenido de la fibra a través del tiempo, con tendencia y efecto lineal ($P < 0.05$) de 2.3, 2.73 y 2.9 puntos porcentuales entre los días 0–24 para los tratamientos PC, RC y M, respectivamente. El contenido de hemicelulosa presentó diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.0001$); sin embargo, no hubo una diferencia lineal o cuadrática con el avance del tiempo. Esta respuesta parece depender más de la característica propia del sustrato. La lignina, es el sustrato de mayor interés que es utilizado por el hongo, En todos los tratamientos se presentó diferencias significativas entre los tiempos ($P < 0.001$) y hubo disminución en el contenido de lignina de 2.6, 4.7 y 2.4 puntos porcentuales, hasta los 24 días de incubación para los tratamientos de PC, RC y M, respectivamente, Hill *et al.* (2001) reportan cambios en el contenido de lignina al aplicar *Streptomyces achromogenes* ISP 5028 sobre ensilado de ryegrass perene, los autores encontraron un efecto del hongo en forma limitada. Por otra parte se obtuvieron resultados diferentes a los publicados por Karunanandaa y Varga, (1996); también se encontraron diferencias con Beauchemin *et al.* (1995), quienes reportan una actividad del hongo *Cyathus stercoreus* sobre la paja de arroz, en un periodo de 30 días, al disminuir 17 puntos porcentuales el contenido de materia seca, pero con *P. sapidus* no se presenta cambio.

Actividad enzimática

Celulasas: A 8 y 24 d de incubación la actividad de celulasas en M fue mayor ($P < .001$, $1.19 \text{ UI g}^{-1} \text{ MS}$) respecto a PC (0.83 ; $\text{UI g}^{-1} \text{ MS}$; Fig. 1.1), contrario a lo esperado, ya que por naturaleza el sustrato para el cual los hongos basidiomicetos presentan una mayor afinidad son los materiales ligninocelulosos como la paja de cebada. Estos hongos degradan preferentemente la lignina y luego los carbohidratos existentes como lo reportan Krause *et al.* (2003) y Rezende *et al.* (2005). Es necesario destacar la diferencia en cuanto a la producción de enzimas celulasas cuando se mezclan los dos sustratos, logrando una sinergia que repercute sobre la composición química del sustrato; sin embargo, esperamos una mejora en la digestibilidad como lo reportan (Karunanandaa *et al.* 1995).

Xilanasas: la actividad xilanasa fue similar ($P > 0.001$) entre PC ($20.05 \text{ UI g}^{-1} \text{ MS}$) y M ($19.72 \text{ UI g}^{-1} \text{ MS}$) pero ambas actividades fueron superiores ($P < 0.001$) a los de RC. La actividad se sostiene en ambos sustratos hasta el día 16 de FSS. (Fig. 1.2). La producción enzimática de xilanasas en los tratamientos PC y M, da un cambio en la composición química de los sustratos, este dato fue similar a lo que reportan Polizeli *et al.* (2005) quienes consideran que por la acción enzimática del hongo se modifica el sustrato, resultando en un mejor uso de la energía y con menor efecto en la digestibilidad de la MS.

Lacasas: La actividad de lacasas por *P. sapidus* fue marginal para los tres sustratos en los días 0 y 8 de FSS, lo que es atribuido a que el hongo se encuentra en una fase de aprovechamiento de recursos de fácil asimilación (Krause *et al.* 2003), una vez que se agotan estos es que se inicia la producción de enzimas lacasas (Fig. 1.3), lo cual sucede al día 16 de FSS sin que sea diferente en los tres sustratos. Los sustratos PC y M mantuvieron

su producción al día 24 (45.74 y 43.21 UI g⁻¹ MS, respectivamente), a diferencia del sustrato RC en el que a partir del día 16 de FSS se declinó la producción de lacasa. Karunanandaa *et al.* (1995) reportan la importancia en la producción de enzima lacasa, esta asegura una liberación de recursos como celulosa y hemicelulosa atrapados en esta compleja molécula, que beneficia la digestibilidad de la MS.

Producción de proteína por el hongo

El contenido de proteína microbiana fue similar ($P > 0.001$) entre PC y M (0.385 y 0.338 mg g⁻¹MS) al día 16 de FSS, momento en que curre la máxima producción, valores similares fueron obtenidos por Sainos *et al.* (2006) en paja de cebada y grano entero con *P. ostreatus*. En RC se obtuvo el máximo nivel al día 8 de FSS con 0.262 (mg g⁻¹MS); sin embargo, su rendimiento es menor al alcanzado por los otros dos sustratos. Aunado a la máxima actividad de lacasas se logra un buen desempeño en la actividad de xilanasas para el día 16 de FSS. Por otra parte la actividad de la celulasa continúa incrementando en el día 24 de FSS (Fig. 1.4), aspecto que se considera conveniente parar la actividad del hongo a partir del día 16 de fermentación.

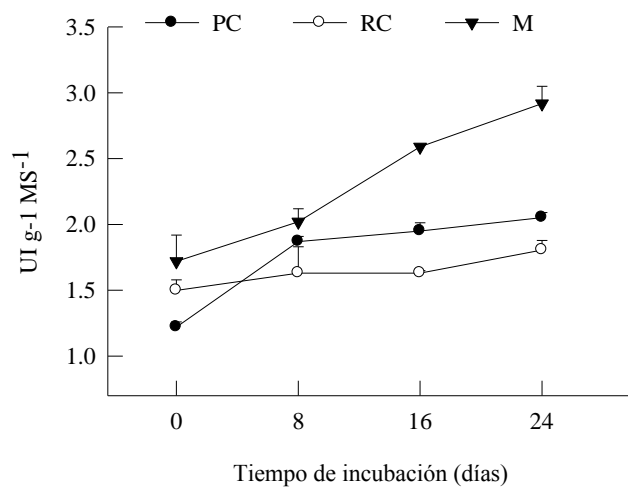


Fig 1.1 Cinética de producción de celulasas por *P. sapidus* sobre Paja de cebada (PC), Raicilla (RC) y la Mezcla (M) PC y RC (75:25)

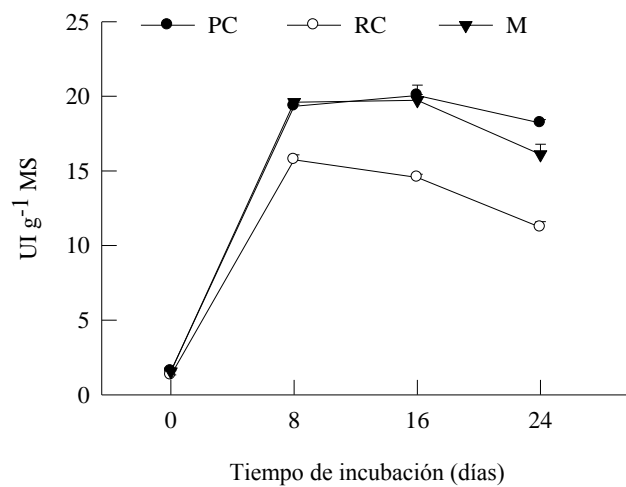


Fig. 1.2 Cinética de producción de xilanasas por *P. sapidus* sobre Paja de cebada (PC), Raicilla (RC) y la Mezcla (M) PC y RC (75:25)

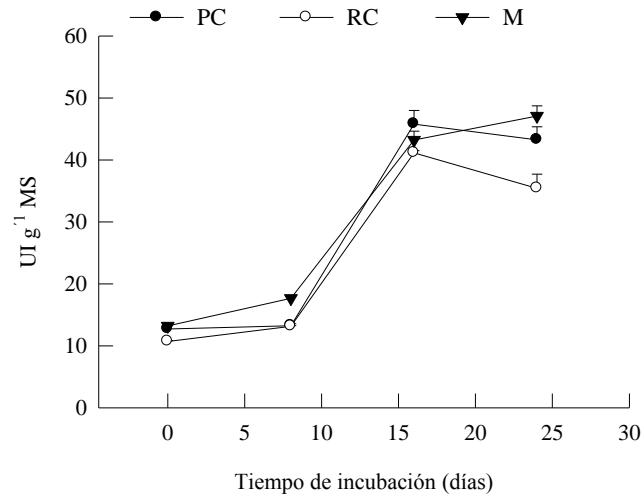


Fig. 1.3 Cinética de producción de lacasas por *P. sapidus* sobre Paja de cebada (PC), Raicilla (RC) y la Mezcla (M) PC y RC (75:25)

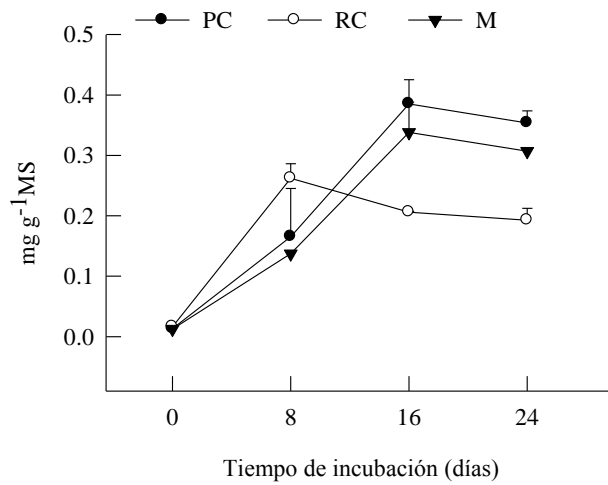


Fig 1.4 Cinética de producción de proteína por *P. sapidus* sobre Paja de cebada (PC), Raicilla (RC) y la Mezcla (M) PC y RC (75:25)

Tabla 1.1. Composición de la paja de cebada, cambios en la celulosa, hemicelulosa y lignina, por el tiempo de incubación

Análisis (%)	Tiempo (días)				EE
	0	8	16	24	
MS	94.55 ^a	94.17 ^a	93.90 ^a	94.17 ^a	0.45
MO	87.99 ^c	86.75 ^c	86.48 ^b	85.96 ^a	1.24
N* ^{6.25}	4.12 ^c	4.50 ^b	4.58 ^b	5.06 ^a	0.13
FDA	50.46 ^c	50.76 ^b	47.43 ^b	47.24 ^a	0.81
FDN	84.65 ^c	83.24 ^b	81.59 ^{ab}	82.35 ^{ab}	0.48
Celulosa	39.50 ^c	39.88 ^b	39.15 ^b	38.85 ^a	0.86
Hemicelulosa	34.19 ^b	32.48 ^a	34.15 ^b	35.11 ^c	1.05
Lignina	10.96 ^b	10.88 ^b	8.28 ^a	8.38 ^a	0.25

Letras diferentes en las filas indican diferencia significativa (P<0.0001). EE: Error estándar de los mínimos cuadrados de las medias

Tabla 1.2. Composición de la raicilla, cambios en la celulosa, hemicelulosa y lignina, por el tiempo de incubación

Análisis (%)	Tiempo (días)				EE
	0	8	16	24	
MS	94.51 ^a	94.11 ^a	94.08 ^a	93.93 ^a	0.45
MO	84.67 ^c	81.89 ^b	86.45 ^c	77.77 ^a	1.24
N* ^{6.25}	16.37 ^c	17.54 ^b	18.32 ^a	18.18 ^b	0.13
FDA	38.37 ^c	37.80 ^b	37.68 ^b	37.40 ^a	0.81
FDN	77.99 ^c	77.22 ^b	77.63 ^b	75.26 ^a	0.48
Celulosa	26.69 ^a	28.07 ^b	30.74 ^c	30.49 ^c	0.86
Hemicelulosa	39.62 ^b	39.40 ^b	39.94 ^b	37.85 ^a	1.05
Lignina	11.68 ^c	9.74 ^b	6.94 ^a	6.91 ^a	0.25

Letras diferentes en las filas indican diferencia significativa (P<0.0001). EE: Error estándar de los mínimos cuadrados de las medias

Tabla 1.3. Composición de la mezcla de paja de cebada y raicilla, cambios en la celulosa, hemicelulosa y lignina. por el tiempo de incubación

Análisis (%)	Tiempo (días)				EE
	0	8	16	24	
MS	95.02 ^a	93.89 ^a	93.75 ^a	93.73 ^a	0.45
MO	88.51 ^b	86.22 ^b	84.55 ^a	84.34 ^a	1.24
N* ^{6.25}	5.30 ^b	5.23 ^b	6.83 ^a	5.76 ^b	0.13
FDA	45.70 ^c	45.70 ^b	43.85 ^b	43.82 ^a	0.81
FDN	82.21 ^c	80.92 ^b	80.63 ^b	79.31 ^a	0.48
Celulosa	36.02 ^a	38.20 ^b	36.56 ^a	36.56 ^a	0.86
Hemicelulosa	36.51 ^b	35.22 ^a	36.74 ^b	35.49 ^a	1.05
Lignina	9.68 ^b	7.50 ^a	7.29 ^a	7.25 ^a	0.25

Letras diferentes en las filas indican diferencia significativa ($P < 0.0001$). EE: Error estándar de los mínimos cuadrados de las medias

1.5 DISCUSIÓN

El principal efecto observado fue la modificación en la proporción de lignina, en los tres sustratos, registrando disminución en los niveles porcentuales notando el mayor cambio en los sustratos PC y RC en el día 16 de FSS y para M se observa a los 8 días de FSS.

Por efecto de la acción enzimática de *P. sapidus* se registraron modificaciones en los componentes, que al comparar con los valores registrados en las tablas 1.1, 1.2 y 1.3 nos permite apreciar esas diferencias. El contenido de MS y FDN en el sustrato PC fueron 3.5 y 12.1 puntos porcentuales mayores y para la lignina 2.79 puntos porcentuales menor. La proteína total (N*6.25) fue el único ingrediente similar (4.12 %) al reportado por la NRC, (1996). Los valores de RC fueron mayores (MS 1.51, FDN en 32 y lignina en 5.2 puntos porcentuales) al reportado por la NRC, (1996). Sin embargo, parte de las diferencias en el sustrato RC se atribuyen a las variaciones del propio producto, por lo que la raicilla se ha clasificado de acuerdo al tipo de pellet. (pellet tipo A), compuesto por raicillas de cebada y medio grano, y los tipos B y C, compuestos por grano de baja calidad, material extraño y polvo. Se reporta que el pellet tipo A, tiene un nivel proteínico que varía de 20 a 26% (Fernández-Mayer y Pelta, 2005). La RC que obtuvimos para el experimento registro de inicio un valor de proteína 16.37% en todo el lote, valor que se modificó con un ligero incremento durante los diferentes días de acción enzimática del hongo.

En referencia al sustrato PC, Ortega *et al.* (1986) determinó el valor nutritivo y la digestibilidad de la paja de cebada tratada a los 45 y 60 d con el crecimiento de hongo *Pleurotus ostreatus*. y reporta que el porcentaje de proteína se mantuvo constante con 2.7%.

En los resultados del presente trabajo, y por la acción del *P. sapidus*, se presentó un valor superior ya que registra 6.8% de PC al día 16 de FSS, y con *P. sapidus* a 24 días de FSS presenta un mayor contenido de cenizas (1.7%) comparada con el registro de la paja incubada con el hongo *P. ostreatus* por 60 días.

El porcentaje de hemicelulosa a 45 días de cultivo, según Ortega *et al.* (1986), muestra 16.7% al inicio del cultivo y a los 60 días llega a 32.2%. En el estudio con *P. sapidus* se registra por efecto de la acción enzimática al día 0 de FSS se registró 34.2% y 35.1% al día 24 de incubación. Respecto a celulosa Ortega *et al.* (1986) reporta 17.4% a los 45 d. de FSS y 32.4%, para 60 d. de FSS en contraste con lo que se registró por la acción de *P. sapidus* al día 0 (39.5%) y 24 (38.8%) de incubación. El mismo autor registró un ligero aumento en el contenido de lignina en la paja por efecto de las enzimas de *P. ostreatus*, a los 45 y 60 d. de FSS, alcanzando valores de 8.3 y 9.1% respectivamente. Con *P. sapidus*, al inicio de la FSS se registró un 10.9% de lignina y disminuyó a 8.4% al día 24 de incubación. La digestibilidad *in vitro* de la MS de la paja a 45 y 60 días fue de 52.6 y 53.1% respectivamente.

Por la acción enzimática de *P. sapidus* se registró un incremento considerable (4.2%) superior en PC y con relación al contenido de cenizas el valor registrado nos permite correlacionarlo con las modificaciones en la proporción de lignina principalmente y con los cambios en hemicelulosa.

Es ampliamente conocida la capacidad de los hongos basidiomicetos de actuar sobre la fibra y de manera destacada sobre la lignina, sin embargo, al comparar diferentes especies

de un mismo hongo (*P. sapidus* VS *P. ostreatus*), se encuentran diferencias al actuar sobre un mismo sustrato, en este caso Paja de cebada.

Luna-Rodríguez *et al.* (2007) usando a *P. ostreatus* reportan una disminución en el contenido de FDN de 75.2%, al inicio de la FSS a 72.7 % al final del período de 30 d de fermentación al compararlo con el estudio usando *P. sapidus*, registramos 84.6% para el día 0 y de 82.3% para el día 24 de fermentación valores más altos para *P. sapidus*. es menos eficiente que *P. ostreatus* ya que los valores de FDN reportados para este son menores. En cuanto a la FDA con *P. ostreatus* inicia el día 0 con 51.80% y termina el día 30 de FS con 56.73 %, los resultados de ambos tiempos menores para *P. sapidus* ya que en el inicio se registra 50.46% y 47.24% al día 24 de incubación FDA determina el contenido en el sustrato de celulosa, lignina y silicio, este resultado indica que *P. sapidus* es más eficiente en degradar la fracción FDA en comparación con lo reportado en el trabajo de Luna-Rodríguez *et al.* (2007) usando a *P. ostreatus* . En cuanto a la lignina se inicia con 21.1% y termina el día 30 con 17.4% (con una reducción de 3.7%), comparando estos resultados con lo registrado en nuestro trabajo, se inicia con valor de 10.9 % y para el día 24 de 8.4% (reducción de 2.5%) mostrando mejor desempeño con el uso de *P. sapidus*. En cuanto a proteína reportan en el trabajo usando a *P. ostreatus* niveles al inicio de la FSS, de 3.1% y al día 30 de FSS de 3.9% que difiere en cuanto a lo reportado con el uso de *P. sapidus* en 1.1% al día 24 de fermentación resultando menos eficiente con el uso de *P. sapidus*, por último, los resultados son iguales para ambos trabajos en cuanto a MS y MO.

Podemos encontrar que si bien se registran diferencias en los resultados, es posible comentar que ambas especies *P. sapidus* y *P. ostreatus* son eficientes al actuar sobre la Paja de cebada modificando su composición y reduciendo el contenido de lignina.

El mayor efecto de actividad enzimática se obtiene por la mezcla de PC con RC; por lo que se logra cambiar la composición del sustrato. Esto es importante para considerar su uso en la alimentación de rumiantes. La acción de las enzimas fibrolíticas logra incrementar la digestibilidad de la fibra (tablas 1.1,1.2 y 1.3). En un trabajo de Beauchemin, (1995) se reporta que al modificar los niveles de enzimas celulasas y xilanasas usando paja de alfalfa, paja de timothy y ensilaje de cebada se incrementa la digestibilidad de 30 a 36% para los dos primeros sustratos, y no se encontró respuesta para el ensilado de cebada considerando que la respuesta depende del tipo de forraje usado, nuestros valores son similares con los obtenidos por Beauchemin, (1995) al comparar las pajas.

La acción de *P. sapidus* registró los mejores valores en la producción de xilanasas durante el tiempo de 16-24 d, mientras los resultados de Xiong *et al.* (2005) usando a *Trichoderma reesei* así como Luna-Rodríguez *et al.* (2007) con *P. ostreatus* reportan una actividad más temprana de xilanasas a los 4 y 12 d, respectivamente. Para el fin del trabajo y tratando de aprovechar los recursos existentes, resulta mejor contar con una acción temprana sobre el sustrato y en este sentido *P. sapidus* no es tan eficiente como los anteriores. Sin embargo, las diferencias en los tiempos de respuestas se atribuyen al desempeño del hongo sobre las características del sustrato y a procesos de fermentación.

Elisashvili *et al.* (2008) evaluaron la FSS contra la fermentación sumergida (SmF) usando a *Pleurotus spp* y a *Lentinus spp* en varias condiciones que permiten expresar la

producción de las enzimas, endoglucanasa (CMCasa), xilanasa, fenol peroxidada (FPA) y lacasa variando los resultados por el tipo de hongo, el medio y las condiciones de crecimiento. Vikinesway *et al.* (2006) reportan a 10 d en FSS niveles de lacasas de 30.6 U/g nivel a temperatura de 25 °C y con agua corriente, similar al que alcanzado en el presente estudio con *P. sapidus*; Elisashvilli *et al.* (2008), también reportan niveles máximos de lacasas en cultivo de FSS después de 10 d. de fermentación con 20 U por frasco⁻¹ para *P. tuberregium* **IBB 624**. En el trabajo de Locci *et al.* (2008) usando como sustrato a la paja de salvado en cultivo con *P. ostreatus* en FSS durante 62 d reportan una buena colonización del hongo lo que permite detectar cambios en la composición química del sustrato, atribuibles a las hemicelulasas; una diferencia de este estudio reportan bajos niveles de lignina en el sustrato, por lo que no encontraron evidencia de actividad de esta enzima.

P. sapidus sembrado en PC presentó la mejor producción de celulasas en el día 24 de incubación. Ávila, (2004) y Luna-Rodríguez *et al.* (2007) observaron la máxima producción enzimática entre 12 a 20 d de FSS, nuevamente la diferencias de respuesta en el tiempo fueron características del hongo y medios de cultivo. La mayor respuesta de lacasas en el experimento usando a *P. sapidus* fue en el día 16 de incubación, siendo muy similares el sustrato PC y M; sin embargo, Luna-Rodríguez *et al.* (2007) reportan mayor respuesta en el día 12 en cuanto que Ávila, (2004) reporta una máxima actividad para el día 8, usando como sustrato el rastrojo de maíz. Por otra parte, Guillen-Navarro *et al.* (1998) reportan una producción de lacasas y manganeso peroxidasa de 307 y 0.41 UI/ litro respectivamente. Mientras que Hongman *et al.* (2004) empleando un medio deprimido en carbono y usando a *P. ostreatus* reportan que al día 14 de FSS se da la mayor actividad con 130 U/ml. Siendo

semejante en cuanto a tiempo a la respuesta usando a *P.sapidus*. Esta información nos permite considerar los tiempos adecuados para detener la actividad del hongo y estar en mejor condición de aprovechar al máximo los recursos ahora disponibles.

El mayor contenido de proteína por la acción de *P. sapidus* en el sustrato PC se registró el día 16 de cultivo sólido con 0.385 mg g⁻¹ MS; para RC el máximo valor el día 8 de incubación con 0.262 mg g⁻¹MS; y por último el nivel máximo se registró en M el día 16 de incubación con 0.338 mg g⁻¹ MS. Estos valores difieren con los obtenidos por Luna-Rodríguez *et al.* (2007) y Ávila, (2004), ya que registraron valores de 12.0 mg g⁻¹ de sustrato sólido para el día 24 de FSS y de 64.0 mg g⁻¹ de sustrato sólido para el día 8 de FSS, respectivamente, lo que coloca a *P. sapidus* en una posición intermedia; sin embargo, representa mejoras con respecto al sustrato sin tratar.

Se observa que la mayor respuesta en cuanto a la actividad enzimática se da tanto para celulasas, lacasas y xilanasas, así como para los niveles de PC tanto para el sustrato PC como para M. Similares resultados fueron reportados por Sainos *et al.* (2006) usando a *P. ostreatus* sobre paja de cebada y uno basado en grano de cebada, combinando ambos en diferentes proporciones, indicando que el sustrato que obtiene los más altos niveles es el que contiene 50% de cada sustrato, debido a que la paja de cebada incrementa la actividad metabólica y el grano de cebada es una importante reserva de nutrientes. En el presente estudio, la raicilla aporta nutrientes al medio, logrando en el sustrato M niveles de actividad xilanasas y lacasa similares a los del sustrato PC y siendo superior M a PC en los niveles de producción de celulasas.

1.6 CONCLUSIONES PRIMER ARTÍCULO

El hongo *Pleurotus sapidus* demostró tener una buena capacidad para producir enzimas celulasas, xilanasas y particularmente lacasas, lo que permite afirmar que su uso con la intención de reducir la proporción de lignina sobre los sustratos PC, RC y M.

La combinación de PC con RC (75:25) M si bien no logra un sinergismo que manifieste valores superiores al mejor de ellos, sí resulta en un valor intermedio entre cada uno de los dos componentes por separado, permitiendo considerar a M al ser inoculada con un hongo basidiomiceto como es el *Pleurotus sapidus*, resulta en una buena alternativa para modificar su composición bromatológica a favor de un mejor y potencial aprovechamiento en la alimentación de rumiantes.

1.7 AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACYT) por el financiamiento con el proyecto 42782-Z y por la beca PROMEP N° 103.6/04/1143 para estudios de doctorado del estudiante Alfonso Soto Sánchez. y la línea 7 Inocuidad, Calidad de alimentos y bioseguridad

1.8 LITERATURA CITADA

- A.O.A.C., 2007. Official methods of análisis. Of AOAC international. 18th Ed. Off. Agric. Chem., Washington, D.C. U.S.A.
- ANKON 2000. [en línea] Disponible: http://www.ankom.com/09_procedures/ADF%20method%20A2000pdf [fecha de consulta [noviembre16 de 2007]].
- Ávila, M. H., 2004. Enzimas fibrolíticas de *Pleurotus ostreatus* y su actividad en rastrojo de maíz. Tesis de Maestría en ciencias. Especialidad Ganadería. Colegio de Posgraduados, Montecillo, México.
- Beauchemin, K.A., Rode, L.M. and Sewalt, V.J.H., 1995. Fibrolytic enzymes increase fiber digestibility and growth rate of steers fed dry forages. Canadian J. Anim. Sci. 75: 641-644.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive methods for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-252.
- Fernández-Mayer, A. y Pelta, H., 2005. Revista Desafío 21 La sequía; la salida del invierno y el manejo ganadero 11 N° 26 sept. 2005 [en línea] disponible: <http://www.inta.gov.ar/bordenave/info/galerias/desafio/desafio.htm> [fecha de consulta: noviembre 21 de 2007].
- Elisashvili, V., Penninckx, M., Kachlishvili, E., Tsiklauri N. Metreveli, E., Kharziani, T., Kvesitadze, G., 2008. *Lentinus edodes* and *Pleurotus* species ligninocellulolytic enzymes activity in submerged and solid-state fermentation of lignocellulosic wastes of different composition. Bioresource technol. 99: 457-462.
- Guillen-Navarro, K. G., F. J. Márquez-Rocha y J. E. Sánchez-Vázquez., 1998. Producción de biomasa y enzimas ligninolíticas por *Pleurotus ostreatus* en cultivo sumergido. Rev. Iberoam. Micol. 15: 302-306.
- Hill, J., Xiao, G. Q., and Ball, A.S., 2001. Effect of inoculation of herbage prior to ensiling with *Streptomyces achromogebe* ISP 5028 on chemical composition of silage. Anim. Feed Sci. Technol. 89: 83-96.
- Hongman, H., Z. Jiti, W. Jing, D.Cuihong and Y. Bin., 2004. Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. Process Biochem. 39: 2425-2419.
- Karunanandaa, K., Varga, G.A., Akin, D.E., Rigsby, L.L., Royse, D.J., 1995. Botanical fractions of rice straw colonized by white-rot fungi: changes in chemical composition and structure. Anim. Feed Sci. Technol. 55: 179-199.

- Karunanandaa, K., Varga, G.A., 1996. Colonization of rice straw by white-rot fungi (*Cyathus stercoreus*): Effect on ruminal fermentation pattern, nitrogen metabolism, and fiber utilization during continuous culture. *Anim. Feed Sci. Technol.* 61: 1-16.
- Krause. D.O., Denman. S.E., Mackie. R.I., Morrison. M., Rae. A.L., Attwood. G.T. and McSweeney. C.S., 2003. Opportunities to improve fiber digestion in the rumen: microbiology, ecology, and genomics. *Microbiol. Reviews* 27: 663-693.
- Locci, E., Laconi, S., Pompei, R., Scano, P., Lai, A., Marincola, F.E., 2008. Wheat bran biodegradation by *Pleurotus ostreatus*: A solid-state Carbon-13 NMR study. *Bioresource Technol.* 99: 4279-4284.
- Loeral, O., Córdova, J., 2003. Improvement of xylanase production by a parasexual Cross between *Aspergillus niger* strains. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 46: 177-181.
- Luna-Rodríguez, L., Meneses-Mayo, M., Mendoza-Martínez, G., Montalvo-Paquini, C., y Loera-Corral, O., 2007. Producción de enzimas fibrolíticas por fermentación sólida en rastrojo de cebada empleando *Pleurotus ostreatus*. *Archivos de Zootecnia* (En revisión).
- Meneses M. M. 2002. Evaluación nutritiva y fermentativa del ensilado de dos subproductos agroindustriales, Brócoli (*Brassica oleracea*, L. Var. Itálica) y Alcachofa (*Cynara scolymus*, L) para su empleo en la alimentación animal. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia, España. Departamento de Producción animal
- Membrillo, I., Sáncho, C., Meneses, M., Favela, E., Loera, O., 2008. Effect of substrate particle size and additional nitrogen source on production of lignocellulolytic enzymes by *Pleurotus ostreatus* strains. *Bioresource Technol.* 99: 7842-7847.
- Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31: 426-48.
- NRC., 1996. Nutrient requirements of sheep. National Academy Press. Washington, D.C. 99 pp.
- Ortega C.M.E., Can A.B., Herrera P.F., Pérez-Gil R.F., 1986. Efecto de la inoculación del hongo *Pleurotus ostreatus* en la composición química y digestibilidad de la paja de cebada. *Arch. Latinoam. Nutr.* 36: 345-50.
- Pollizeli, M.L.T.M., Rizzatti, A.C.S., Monti, R., Terenzi, H.F., Jorge, J.A. Amorim D.S., 2005. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 67: 577-591.
- Rezende, M.I., Barbosa, A.M., Vasconcelos, A.D., Haddad, R. And Dekker R.H., 2005. Growth and production of laccases by the ligninolytic fungi, *Pleurotus ostreatus* and *Botryosphaeria rhodina*, cultured on basal medium containing the herbicide, Scepter® (imazaquin). *J. Basic microbiol*, 45: 460-469.

- Rodriguez, S., Fernandez, M., Bermudez, R.C., Morris, H., 2002. Purificación de la enzima lacasa a partir del cultivo de *Pleurotus ostreatus* en medios residuales. Revista Cubana de Química Vol XIV, N° 3: pag. 83-90.
- Sainos, E., Díaz-Godínez, G., Loera, O., Montiel-González, A.M., Sánchez, C., 2006. Growth of *Pleurotus ostreatus* on wheat straw and wheat-grain-based media: biochemical aspects and preparation of mushroom inoculum. Applied Microbiol. Biotechnol. 72: 812-815.
- S.A.S. 2002. User's guide statistics. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- SAGARPA. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, 2007. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera SIAP [en línea] Disponible: <http://www.siap.gob.mx/> [fecha de consulta: enero 03, 2008].
- Steel, R.G D. and Torrie, H.J., 1986. Bioestadística. Principios y Procedimientos. (2nd Ed.). McGraw-Hill Book Co., México. pp. 620.
- Vikineswary, S., Noorlidah, A., Renuvathani, m., Sekaran, M., Pandey, A., Jones, E.B.G 2006. Productivity of laccase in solid substrate fermentation of selected agro-residues by *Pycnoporus sanguineus* Bioresourse. Technol. 97: 171-177.
- Xiong, H., von Weymarn, N., Turunen, O., leisola, M., Pastinen, O., 2005. Xilanase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30 grown on L-arabinose-rich plant hydrolysates. Bioresourse. Technol. 96: 753-759.

**PRODUCCIÓN DE GAS DERIVADO DE LA FERMENTACIÓN
RUMINAL *in vitro* DE LA PAJA DE CEBADA Y RAICILLA
TRATADAS CON *Pleurotus sapidus***

**GAS PRODUCTION DERIVATED FROM *in vitro* RUMINAL
FERMENTATION OF BARLEY STRAW AND ROOTLET
INOCULATED WITH *Pleurotus sapidus***

2. Producción de gas derivado de la fermentación ruminal *in vitro* de la paja de cebada y raicilla tratadas con *Pleurotus sapidus*.²

Se evaluaron los cambios por *Pleurotus sapidus* a los tiempos de fermentación; 0, 1, 8, 16 y 24 días, en la composición y fermentación ruminal *in vitro* de: paja de cebada (PC), raicilla (RC) y la mezcla (M) 75:25 de PC y RC, respectivamente. La fermentación se determinó con la técnica de producción de gas para obtener: volumen máximo de gas (V), la tasa de fermentación (S) y tiempo de retardo (L) con el modelo $V_0 = V / (1 - e^{-4 \cdot 2S(t-L)})$. Midiendo la digestibilidad *in vitro* y AGV. Al tiempo 0 de FSS, el contenido de FDN, FDA y celulosa fue menor ($P < 0.001$) para la RC y mayor para PC y la M mientras que la proporción de lignina y hemicelulosa fue mayor para RC respecto a PC y M. Con interacción ($P < 0.01$) entre el tiempo de FSS y sustrato. La lignina disminuyó ($P < 0.01$) con el tiempo de FSS solo para PC. El contenido de FDA, celulosa y hemicelulosa difirió ($P < 0.01$) entre sustratos pero el tiempo de FSS no la modificó ($P > 0.01$). Los sustratos tratados, produjeron menos gas que los no tratados. La RC produjo el V mayor ($P < 0.001$) los otros parámetros (S y L) sin diferencia ($P > 0.001$). La digestibilidad fue diferente ($P < 0.001$) entre los sustratos y se observó una relación directa entre ésta y V. El ácido propiónico en los sustratos tratados, incrementó a 16 días de FSS y, decreció a 24 días ($P < 0.01$). El ácido acético disminuyó ($P < 0.01$) por efecto del tiempo su mínimo entre 8 y 16 días. El hongo *Pleurotus sapidus* induce cambios en la composición química de la PC, RC y M que reducen su fermentación *in vitro* y modifican la producción de Propionato y acetato y, en particular, la M mejoró la DIVMS por lo que se consideró que sería mejor aprovechado así que la PC y RC solos, como un recurso forrajero.

² Enviado a Animal feed science and Technology, Elsevier, N° de registro ANIFEE-09-2294

GAS PRODUCTION OF *In Vitro* RUMINAL FERMENTATION FROM BARLEY STRAW AND ROOTLET INOCULATED WITH *Pleurotus sapidus*.

The effect of *Pleurotus sapidus* was determined at different fermentation times in FSS; 0, 1, 8, 16 and 24 days, on the composition of nutrients and *in vitro* ruminal fermentation (IVRF) of substrates: barley straw (BS), rootlet (BR) and the mixture (M) 75:25 of BS and BR, respectively. The fermentation was determined with the gas production technique measuring the: maximum volume of gas produced (V); fermentation rate (S) and delay rate (L). with the model $V_0 = V / (1 - e^{-4.2S(t-L)})$. In the two control substrates the content of NDF, ADF and cellulose was lower ($P < 0.001$) for BR with respect to BS and M at the end of the FSS. The proportion of lignin and hemicellulose was higher. The BS for the NDF content presented interaction ($P < 0.01$) between the treatment time and the substrate. The lignin decreased ($P < 0.01$) due to the effect of time and substrate only for BS by 22.87%. The content of ADF, cellulose and hemicellulose was different ($P > 0.01$). The substrates with *P. sapidus* produced a lower amount of gas than that of the control substrates. Only the V parameter of fermentation kinetic showed differences ($P < 0.001$). The digestibility was different ($P < 0.001$) among the three substrates, and a direct relationship was observed between V and the *in vitro* digestibility of dry matter (IVDDM). The proportion of propionic acid in the three treated substrates increased quadratically from 1 to 16 days of treatment and decreased ($P < 0.01$). The only variable that was affected by the time was the proportion of acetic acid, which decreased ($P < 0.01$), reaching its minimum between 8 and 16 days. It is considered that due to the effect of *Pleurotus sapidus*, changes were registered in the substrates BS, BR and M, reducing their fermentation *in vitro* and modifies the production of propionate and acetate, and in particular, the M substrate improved the IVDDM with a better use of the forage resources.

Palabras clave: Fermentación en sustrato sólido, digestibilidad, AGV, FDN, FDA, Lignina

2.2 INTRODUCCIÓN

La producción de cebada en México es de 373,523.46 ha para grano y 10,360.53 ha para forraje (SAGARPA, 2007), el 80% de grano producido se utiliza por la industria cervecera y el 20% para la alimentación animal (Rodríguez-García, 2006). Anualmente se producen 126,808.37 ton de paja de cebada (SAGARPA, 2003) de las cuales se destinan para la industria cervecera 880,000 ton de grano (SAGARPA, 2003), e importa de EUA y Canadá 107,930 y 28,518 ton, respectivamente, para la elaboración de cerveza, lo que se traduce en 1,016,448 ton anuales del desecho raicilla (Schwentelius *et al.* 2004). El subproducto, de esta industria, se usa actualmente en la alimentación de rumiantes, sin tratamiento alguno. Por décadas se ha investigado la forma de aumentar la digestibilidad de la paja de cebada por rumiantes, entre los métodos investigados se cuentan a los tratamientos físicos (fríos como molido o machacamiento y calientes, con vapor de agua), químicos (hidróxido de sodio, amoníaco/urea, aldehídos) y enzimáticos biológicos (Dehghanbanadaky *et al.* 2007). De estos últimos, se ha empleado a los hongos de pudrición blanca por su capacidad de crecer sobre sustratos vegetales ligninocelulósicos (Zadrazil *et al.* 1996). Los hongos de la especie *Pleurotus sp*, han sido ampliamente investigados ya que su acción enzimática en los subproductos agrícolas, aumenta la digestibilidad por los rumiantes (Platt *et al.* 1984; Rajarathnam y Bano, 1989; Zhang *et al.*, 2002; Salmenes *et al.*, 2005) por lo que se considera que pueden ser usado como recurso en la alimentación de rumiantes (Breene, 1990; Yildiz *et al.*, 2002). Se conoce de la capacidad diferenciada entre cepas de *Pleurotus* las cuales cuentan con enzimas específicas para actuar sobre el mismo sustrato,

con capacidad celulolítica o ligninolítica. (Peláez-Acero *et al.* 2008) indican que el hongo *P. sapidus* mejoró la calidad nutritiva y digestibilidad ruminal *in vitro* de caña de azúcar.

La técnica de producción de gas está siendo usada en múltiples investigaciones para determinar la cinética de fermentación ruminal *in vitro* de alimentos (Blümmel y Ørskov, 1993; Getachew *et al.*, 1998; Davies *et al.*, 2000; Lowman *et al.*, 2002): misma que el buró editorial de ciencia y tecnología en alimentación animal (EBAFS&T) por sus siglas en inglés, reconoce el importante papel que esta técnica tiene en el estudio e investigación para la valoración de los alimentos, debido a su confiabilidad, bajo costo, y poder evaluar varios alimentos al mismo tiempo. Esta técnica es más sensible para determinar la utilización microbiana de los nutrientes en tiempos cortos, así como para determinar efectos tóxicos sobre la actividad microbiana (Czerkawski y Breckenridge, 1969; Nagadi *et al.*, 1999); además, es factible estimar algunas variables como energía metabolizable (EM) y digestibilidad de la materia orgánica (DMO) del alimento, así como biomasa microbiana, entre otros, utilizando la cantidad de gas producido a las 24 h de fermentación y aplicando los modelos desarrollados por Makkar, (2003). La presente investigación tuvo como objetivo determinar el efecto en la fermentación ruminal *in vitro* en los sustratos PC, RC y M tratados con *P. sapidus* en fermentación en sustrato sólido (FSS).

2.3 MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención y preparación de muestras

Se obtuvo paja de cebada (PC) y raicilla (RC) del municipio de Calpulalpan, Tlaxcala, México. La paja de cebada fue cosechada en el mes de octubre de 2007 y empacada inmediatamente; la raicilla fue donada por la planta procesadora de malta Cebadas y Maltas, S.A. de C.V. La paja de cebada se molió y fraccionó a un tamaño de partícula de 1cm y la raicilla se utilizó como sale de la planta procesadora con un promedio de tamaño de partícula de 0.4 cm, La PC, RC y MZ se almacenaron en bolsas de plástico (90 x 120 cm), se identificaron y mantuvieron protegidas de polvo, humedad y roedores hasta el momento de la siembra del hongo. La siembra se hizo siguiendo la técnica establecida para la producción del hongo comestible seta. Los sustratos se hidrataron a 80% de humedad y se inocularon con 5% (p/p) de *Pleurotus sapidus* (semilla de trigo invadida de micelio al 100% aplicado a los sustratos en capas alternas hasta completar 2 kg en total, y se incubaron en un cuarto con temperatura (25°C) y humedad (80%) controlada, durante 24 días. Durante este tiempo se extrajeron bolsas previamente definidas conteniendo sustrato sólido fermentado por *Pleurotus sapidus* a los 0, 1, 8, 16 y 24 días de fermentación sólida (FSS). Una muestra de cada sustrato sin tratamiento con *Pleurotus sapidus* se usó como testigo.

Análisis químico de muestras de PC, RC y M tratadas con P. sapidus

Se tomó una muestra de cada tiempo de FSS, se analizó el contenido MS y MO, (AOAC, 2007), y FDN, FDA y lignina (Van Soest *et al.* 1991), y por diferencia, se estimó la proporción de celulosa y hemicelulosa. Los análisis se realizaron en el Laboratorio de Nutrición Animal del Colegio de Postgraduados, México.

Determinación de la producción de gas in vitro

La determinación de la fermentación ruminal *in vitro* de las muestras de la FSS, para cada tiempo y sustrato, fue realizada de acuerdo a la técnica de la cinética de producción de gas propuesta por Menke y Straigas, (1988). En frascos de vidrio color ámbar de 125 mL de capacidad, se colocaron 0.5 g de muestra seca de cada tratamiento y, se adicionó 90 mL de inóculo ruminal manteniendo en el recipiente un flujo de continuo de CO₂ e inmediatamente se cerraron herméticamente con un tapón de goma y aro metálico. El inóculo ruminal consistió en: Líquido ruminal fresco y solución mineral reducida en una proporción de 1:9, respectivamente. La solución mineral reducida contenía, por litro de agua destilada, 300 mg de carbonato de sodio, 450 mg de fosfato de potasio dibásico, 450 mg de fosfato de potasio monobásico, 450 mg de sulfato de amonio, 900 mg de cloruro de sodio, 184 mg de sulfato de magnesio, 75 mg de cloruro de calcio y dos gotas de rezarsurina (1% p/v) como indicador de oxido-reducción. El líquido ruminal se obtuvo de dos bovinos fistulados en rumen alimentados a base de paja de avena a libre acceso y 2 kg d⁻¹ de concentrado (16 % PC), el líquido ruminal se filtró a través de cuatro capas de gasa y depositado de inmediato en un termo para transportarlo al laboratorio, posteriormente se procedió a su mezcla con la solución reductora.

Los frascos se cerraron inmediatamente y se les extrajo el exceso de CO₂ igualando la presión a cero y se colocaron en un baño maría a 39 °C. A partir de este momento, se midió la presión de gas generada por la fermentación ruminal de los sustratos a tiempos definidos durante 48 h de incubación. La presión fue transformada a volumen de gas (mL g⁻¹ MS) Los datos de volumen de gas a los distintos tiempos de fermentación se utilizaron para calcular las variables de la cinética de fermentación o producción de gas: volumen máximo de gas producido (V; mL g⁻¹ MS), tasa de fermentación (S; h⁻¹) y tiempo de retardo (L; h) mediante el procedimiento NLIN de SAS (2002) y usando el modelo $V_0 = V / (1 - e^{-4.2S(t-L)})$ descrito por (Schofield y Pell, 1995)., donde: V₀ = es el volumen de gas al tiempo 0, V= Es el máximo volumen al t = ∞, S= es la constante, llamada valor específico (S = máximo valor/volumen máximo).

A las 48 h se extrajeron 4 mL de contenido líquido de los frascos y se depositaron en tubos con tapa conteniendo 1 mL de ácido metafosfórico, se refrigeró y posteriormente se centrifugaron; se tomaron 2 ml de cada una de estas muestras para determinar el contenido de ácidos grasos volátiles (AGV) mediante un cromatógrafo de gases (marca Hewlett Pakard, modelo HP3398A series GC Chemstation), con automuestreador y conductor de ionización de flama, como gas acarreador se utilizó nitrógeno con flujo de aire de 400 mL min⁻¹ e hidrogeno 35 mL min⁻¹ con temperatura de inyector y detector de 210 °C, de horno inicial a 95 °C y final 155 °C dando un tiempo de corrida de 7 minutos.

Al término de la incubación (48 h) se filtró el residuo de los frascos a través de papel filtro Watman #54, previamente pesado, y posteriormente se secaron a 60 °C por 48 h para determinar la desaparición *in vitro* de la MS (DIVMS).

Diseño experimental

Se usó un modelo completamente al azar y en bloques generalizado (Steel y Torrie, 1986), el arreglo de tratamientos fue factorial (3x5) donde los factores fueron: sustrato (PC, RC y M) y el tiempo de fermentación en sustrato sólido (FSS; 1, 8, 16 y 24 h), con cuatro repeticiones por tratamiento. Las variables analizadas fueron, para el efecto de tratamiento con *P. sapidus*, contenido de FDN, FDA y lignina, y se estimó la concentración de celulosa y hemicelulosa, y para la cinética de producción de gas, volumen máximo de gas (V; mL g⁻¹), tasa de producción de gas (S; h⁻¹) y tiempo de retardo (L; h); así como desaparición de la materia seca *in vitro* (DIVMS), ácidos grasos volátiles (AGV), y se determinó la biomasa microbiana (BMB, mg), digestibilidad de la materia orgánica (DMO), energía metabolizable (EM; Mj). Los resultados fueron analizados con el procedimiento GLM y la prueba de comparación de medias múltiple de Tukey con el paquete estadístico SAS (2002). El volumen de gas a fracciones de tiempo fue analizado gráficamente y solo se analizó estadísticamente el volumen fraccional de gas a 6 y 22 h de fermentación, ya que fueron los momentos en que se evidenciaron las diferencias, por la acción bacteriana sobre el sustrato.

2.4. RESULTADOS

Contenido de FDN, FDA, celulosa, hemicelulosa y lignina en sustratos tratados con P. sapidus.

En los sustratos testigos (PC, RC y M) el contenido de FDN, FDA y celulosa fue menor en 2.04, 6.9 y 20.1 % respectivamente ($P < 0.001$) (Tabla 2.1) para la RC en comparación a la PC y la M, y el de lignina y hemicelulosa fue mayor en 12.6 % y 13.4 % ($P < 0.01$). La mezcla MZ no modificó ($P > 0.05$) su composición respecto a PC. El contenido de FDN fue de 75.4, 73.9 y 70.2 % para PC, M y RC, respectivamente, para la FDA fue 49.3, 49.3 y 41.4 % para M, PC y RC, respectivamente, y el de lignina fue de 3.2, 3.7 y 3.2 % para PC, RC y M, respectivamente.

Hubo interacción ($P < 0.01$) entre el tiempo de tratamiento con *P. sapidus* (FSS) y el sustrato para el contenido de FDN (Tabla 2.1). Esta interacción mostró que solo el contenido de FDN de la RC disminuyó con el tiempo FSS, pero no en la PC y M. La proporción de lignina disminuyó ($P < 0.01$) por efecto del tiempo FSS y sustrato para PC, RC y M, por lo que se observó una tendencia ($P = 0.0336$) en la disminución del contenido de lignina, por efecto del tiempo FSS. El contenido de FDA, celulosa y hemicelulosa ($P < 0.01$) entre sustratos, pero no en el tiempo ($P > 0.01$; Cuadro 2.1). En este sentido la PC tuvo mayor proporción de FDA y celulosa en comparación de la RC, pero ésta tuvo mayor contenido de hemicelulosa.

Producción de gas durante la fermentación ruminal in vitro de sustratos tratados con P. sapidus.

El análisis gráfico de la producción fraccional de gas (Fig. 2.1 a y b) mostraron dos picos de máxima producción que se presentaron a las 6 y 22 h de incubación. La figura 2.1 a muestra el perfil de producción fraccional de gas de los sustratos testigos. La fermentación ruminal de la PC a las 6 h de incubación produjo menor (13.55 mL g^{-1} ; $P < 0.01$) volumen de gas que la RC (25.52 mL g^{-1}). A este mismo tiempo, la producción de gas con la M fue menor (16.35 mL g^{-1} ; $P < 0.05$). A las 22 h de incubación no hubo diferencia ($P > 0.05$) en la producción fraccional de gas para ningún sustrato PC, RC y M (22.3 , 29.3 y 23.8 mL g^{-1} , respectivamente; (Figura 2.1 a). El perfil de producción fraccional de gas de los sustratos a 1, 8, 16 y 24 días FSS fue similar, por lo que se presenta, solo el perfil de los sustratos a los 24 días de FSS con fines de comparación (Figura 2.1 b). Los sustratos sometidos al tratamiento con *P. sapidus*, produjeron una cantidad de gas menor ($P < 0.01$) que la de los sustratos testigos a 6 y 22 h de incubación (Figura 2.1a y b). A las seis horas de incubación la RC-tratada produjo más gas (12.8 mL g^{-1} ; $P < 0.01$) que la PC-tratada (7.4 mL g^{-1}) pero fue similar ($P > 0.05$) a la producida con la M-tratada y, ésta última produjo más gas ($P < 0.05$) que la PC-tratada, a diferencia que cuando no fueron tratadas (Figura 2.1 b y a). A las 22 h de incubación se mostró un margen de producción de gas, entre tratamientos, mucho más estrecho y una mayor ($P < 0.05$) producción de gas con RC (22.8 mL g^{-1}) que con PC (19.8 mL g^{-1}).

Los parámetros (V, S y L) de la cinética de producción de gas, DIVMS, DMO, proporción de AGV, EM y masa microbiana, para los sustratos testigos se muestran en la Tabla 2.2. La RC produjo el V mayor ($P < 0.001$) (219.7 mL g^{-1}) en comparación a M (196.4 mL g^{-1}) y la PC (185.35 mL g^{-1}). Los otros parámetros (S y L) no mostraron diferencia ($P > 0.05$), pero es de considerar que el tiempo de retardo para RC (1.98 h) es numéricamente menor al de la PC (5.56 h) y M (4.25 h). En contraste con V, la digestibilidad fue diferente ($P < 0.001$) entre los tres sustratos (RC, M y PC; 21.7 %; 19.9 % y 11.5 %, respectivamente), observándose una relación directa entre V y DIVMS.

Tabla 2.1. Proporción de FDN, FDA y lignina, celulosa y hemicelulosa en paja de cebada (PC), raicilla (RC), y la mezcla de ambos (M) a distintos días de tratamiento con el cultivo de *Pleurotus sapidus*.

Nutriente	Días de cultivo sobre PC				Días de cultivo sobre RC				Días de cultivo sobre M				Efecto de		
	1	8	16	24	1	8	16	24	1	8	16	24	Sust	FSS	Int.
	-----%-----												----- P -----		
FDN	79.14 ^{ab}	79.05 ^{ab}	79.59 ^a	79.76 ^a	76.82 ^{bc}	75.11 ^{cde}	73.15 ^e	75.94 ^{cd}	75.23 ^{cde}	74.50 ^{cde}	73.68 ^{de}	75.00 ^{cde}	<0.0001	<.0001	<.0001
FDA	51.91 ^{ab}	53.69 ^a	53.65 ^a	53.77 ^a	44.03 ^{bc}	42.41 ^c	43.25 ^c	42.72 ^c	50.60 ^{abc}	48.73 ^{abc}	49.11 ^{abc}	49.68 ^{abc}	<0.0001	0.5055	0.8706
LIGNINA	4.11 ^a	3.84 ^{ab}	3.24 ^b	3.17 ^b	3.84 ^{ab}	3.51 ^{ab}	3.38 ^{ab}	3.30 ^{ab}	3.26 ^b	3.22 ^b	3.22 ^b	3.19 ^b	0.0018	0.0006	0.0336
Celulosa	47.80 ^{ab}	49.85 ^a	50.40 ^a	50.60 ^a	40.19 ^{bc}	38.89 ^c	39.87 ^{bc}	39.42 ^{bc}	47.33 ^{abc}	45.50 ^{abc}	45.88 ^{abc}	46.48 ^{abc}	<0.0001	0.9645	0.9545
Hemicelulosa	27.24 ^a	25.36 ^a	25.94 ^a	25.99 ^a	32.79 ^a	32.70 ^a	29.89 ^a	33.21 ^a	24.62 ^a	25.77 ^a	24.57 ^a	25.32 ^a	<0.0001	0.5399	0.9674

^{a,b,c}Medias con distinta literal en las misma fila son diferentes (P<0.001).

FDN= Fibra detergente neutro; FDA= Fibra detergente ácido

M= 75% de paja de cebada y 25% de raicilla.

Sust = sustrato, FSS = tiempo de de fermentación en sustrato sólido, inte = interacción sust * FSS

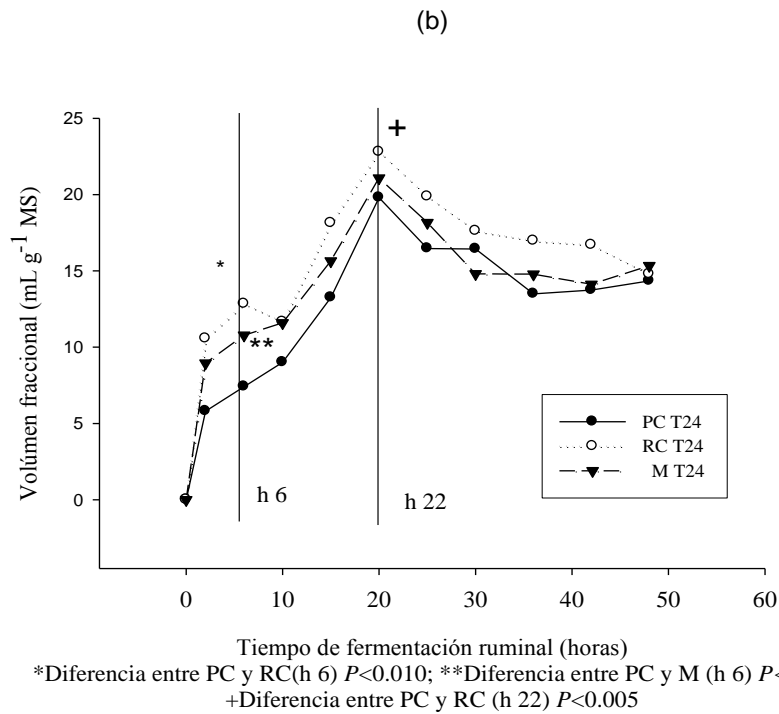
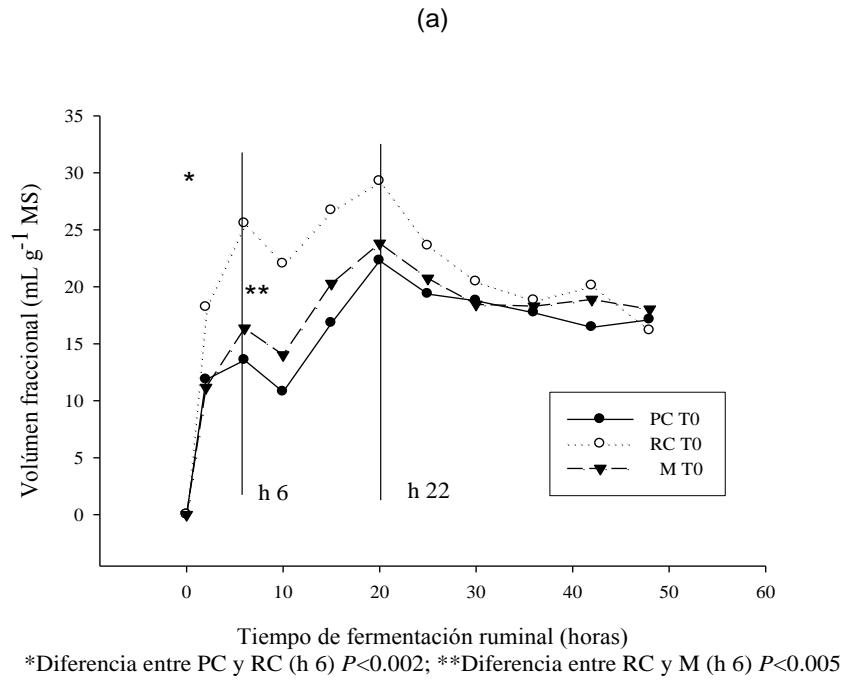


Fig 2.1 Producción fraccional de gas de muestras fermentadas (0 y 24 d) durante la fermentación ruminal *in vitro* de Paja de cebada (PC), Raicilla (RC) y Mezcla (M, 75:25) sin (1a) y con tratamiento (1b) con *P. sapidus*

Tabla 2.2 Variables de producción de gas (V, S y L), digestibilidad ruminal *in vitro*, proporción de AGV, EM, masa microbiana y digestibilidad de la MO de sustratos fibrosos de muestras (0 y 24 d.)de FSS.

Variable	Sustrato			Probabilidad	EE
	Paja de cebada (PC)	Raicilla (RC)	Mezcla (M)		
V (mL g ⁻¹)	186.35 ^b	219.67 ^a	196.42 ^b	0.0001	11.96
L (h)	5.56 ^a	1.98 ^a	4.25 ^a	0.0001	1.10
S (h ⁻¹)	0.029 ^a	0.030 ^a	0.032 ^a	0.005	.001
DIVMS. (%)	11.54 ^c	21.75 ^a	19.93 ^b	0.0001	.82
Acético (%)	76.98 ^a	74.62 ^b	75.46 ^{ab}	0.0001	.32
Propiónico (%)	13.30 ^b	15.27 ^a	14.78 ^a	0.0001	.27
Butírico (%)	9.71 ^a	10.10 ^a	9.74 ^a	0.0001	.22
EM MJ	10.26 ^a	9.17 ^c	9.87 ^b	0.0001	.13
DMO	35.07	48.60	39.39	0.0001	.02
M. Mic. Mg g ⁻¹ .	236.19 ^c	239.88 ^a	237.16 ^b	0.0001	5.80

^{a,b,c}Medias con distinta literal en las misma fila son diferentes (P<0.001).

V= Volumen máximo de gas; S= tasa de producción de gas; L= fase de retardo; DIVMS= digestibilidad *in vitro* de la materia seca a 48 h de incubación; EM = Energía metabolizable MJ; M. Mic.= Masa Microbiana Mg g⁻¹.

Mezcla: 75% de Paja de cebada y 25% de Raicilla.

La proporción de ácido acético fue mayor (P<0.01) con PC (77 %) respecto a RC (74.6 %), pero no diferente con M (75.4%), y no hubo diferencia entre RC y M. La proporción de ácido propiónico fue menor (13.3 %; P<0.01) en PC que en RC (15.3 %) y M (14.8 %). No hubo diferencias (P>0.01) entre tratamientos en la concentración de ácido butírico.

Las variables (V, S y L) de la cinética de producción de gas, la DIVMS, proporción de AGV, DMO, EM y masa microbiana para los sustratos tratados con *P. sapidus*, se muestran en la Tabla 2.3. Hubo interacción (P<0.01) para las variables DIVMS, ácido propiónico y DMO. Respecto a la DIVMS, ésta se incrementó en 26.8% para PC, 30.1% para RC y en 19.5% para M con los sustratos-fermentados en comparación a los que no

recibieron tratamiento con *P. sapidus* (Tablas 2.2 y 2.3), aún con un día de tratamiento. La interacción mostró un efecto cuadrático para la PC y RC, fermentadas, alcanzando su máximo entre 8 y 16 días de tratamiento, por el contrario la DIVMS de la M disminuyó ($P<0.01$) alcanzando un mínimo a los 16 días de tratamiento (Tabla 2.3). Este comportamiento se repitió para la variable DMO y solo con la RC-fermentada, por que con la PC-fermentada la tendencia fue contraria a la de la PC testigo. La proporción de ácido propiónico en los tres sustratos tratados presentó efectos cuadráticos de 1 a 16 días de tratamiento y posteriormente disminuyó a los 24 días, siendo sólo diferente ($P<0.01$) para la RC-fermentada (Tabla 2.3).

Se presentó efecto de sustrato para las variables V, L, ácido acético y EM (Tabla 2.3). El volumen máximo de producción de gas (V) fue mayor ($P<0.01$) para los sustratos testigos (sin tratamiento) en comparación a los fermentados (Tablas 2.2 y 2.3). De igual forma, al comparar los sustratos fermentados, V fue mayor ($P<0.01$) en la RC ($180.8 \text{ mL g}^{-1} \text{ MS}$) en comparación a la PC ($150.09 \text{ mL g}^{-1} \text{ MS}$), la M produjo una V intermedia ($177.4 \text{ mL g}^{-1} \text{ MS}$). En contraste, L, ácido acético y EM fueron mayores ($P<0.01$) para PC (7.59 h, 68.7 % y 10.44 MJ) que para RC (4.70 h, 66.6 % y 9.41 MJ). M tuvo valores intermedios (5.60 h, 69.6 % y 9.92 MJ). La única variable que fue afectada por el tiempo de la FSS fue la proporción de ácido acético, ésta mostró un efecto ($P<0.01$) cuadrático alcanzando su mínimo entre los 8 y 16 días de FSS para luego incrementar nuevamente (Tabla 2.3)

En la Figura 2.2 se presentan los perfiles de producción acumulada de gas para cada sustrato; PC, RC y M (Figura 2.2 a, b y c. respectivamente) considerando los parámetros (V, L, S) obtenidos para cada uno de ellos. En cada gráfico se incluye el sustrato testigo (sin

tratamiento) correspondiente. Se muestra que el perfil de producción acumulada en los tres sustratos es diferente. El tratamiento de la PC con *P. sapidus* se degrada constantemente (V) en relación a los tiempos de FSS, el intervalo entre el valor mayor de V y el menor es de aproximadamente (80 mL g⁻¹; Figura 2.2 a). En contraste, existe una notoria disminución de V entre RC y la RC-tratada en los tiempos de FSS, con un intervalo de 70 mL g⁻¹ (Figura 2.2 b). La técnica de producción de gas *in vitro* se ha comparado junto a otras como digestibilidad *in vitro* y la digestibilidad aparente *in vitro* y resultan ser de las mejores en predecir la digestibilidad de la materia orgánica, a mayor producción de gas, mayor digestibilidad.

Tabla 2.3 Parámetros (V, L S) de producción de gas, digestibilidad de la materia seca, proporción de ácidos grasos volátiles, EM, DMO y masa microbiana. Durante la fermentación ruminal *in vitro* de paja de cebada (PC), raicilla (RC) y la mezcla de ambos (M) con diferentes días de tratamiento con *Pleurotus sapidus*.

Variable	Tiempo (d) de cultivo sobre PC				Tiempo (d) de cultivo sobre RC				Tiempo (d) de cultivo sobre M				Factor (p)		
	1	8	16	24	1	8	16	24	1	8	16	24	Sust	TFS	Int.
V (mL g ⁻¹)	165.4 ^{ab}	152.63 ^{ab}	153.53 ^{ab}	128.83 ^b	169.28 ^{ab}	185.42 ^a	190.12 ^a	178.33 ^a	190.36 ^a	177.57 ^a	177.31 ^a	164.43 ^{ab}	<0.0001	0.0551	0.2068
L (h)	7.47 ^{abc}	7.81 ^{ab}	7.04 ^{abc}	8.07 ^a	5.75 ^{bcd}	3.38 ^e	4.27 ^{de}	5.42 ^{cde}	5.80 ^{bcd}	5.48 ^{cde}	5.56 ^{cd}	5.56 ^{cd}	<0.0001	0.4357	0.6797
S (h ⁻¹)	0.032 ^{ab}	0.031 ^{ab}	0.032 ^{ab}	0.031 ^{ab}	0.031 ^{ab}	0.032 ^{ab}	0.032 ^{ab}	0.03 ^b	0.033 ^a	0.032 ^{ab}	0.032 ^{ab}	0.031 ^{ab}	0.2917	0.0187	0.3711
DIVMS. (%)	12.59 ^f	15.78 ^{cde}	13.49 ^{ef}	12.2 ^f	20.68 ^b	31.06 ^a	31.11 ^a	21.18 ^b	18.33 ^{bc}	16.55 ^{cd}	14.76 ^{def}	14.86 ^{def}	<0.0001	<0.001	<0.001
Acético (%)	68.31 ^a	67.91 ^a	68.49 ^a	70.2 ^a	68.03 ^a	65.02 ^b	63.44 ^b	70.09 ^a	69.75 ^a	69.14 ^a	68.91 ^a	70.53 ^a	0.0033	0.0054	0.2993
Propiónico (%)	18.95 ^{cd}	19.36 ^c	19.05 ^{cd}	18.78 ^{cd}	20.62 ^b	22.65 ^a	23.19 ^a	18.06 ^d	19.00 ^{cd}	19.55 ^{bc}	19.54 ^{bc}	18.48 ^{cd}	<0.0001	<0.001	0.0003
Butírico (%)	12.73 ^{ab}	12.72 ^{ab}	12.44 ^{ab}	11.01 ^b	11.33 ^{ab}	12.32 ^{ab}	13.35 ^a	11.84 ^{ab}	11.24 ^b	11.30 ^b	11.54 ^{ab}	10.98 ^b	0.1117	0.2545	0.6791
EM MJ	10.25 ^{ab}	10.42 ^a	10.53 ^a	10.56 ^a	9.53 ^{de}	9.35 ^{ef}	9.32 ^f	9.45 ^d	10.04 ^{bc}	9.85 ^{cd}	9.84 ^d	9.96 ^{bc}	<0.0001	0.3197	0.6397
DMO	33.13 ^h	31.36 ^j	32.44 ⁱ	29.13 ^k	40.09 ^c	45.13 ^a	45.10 ^a	41.50 ^b	38.75 ^d	36.65 ^f	37.26 ^e	34.90 ^g	<0.0001	<0.001	<0.001
M. MIC. Mg g ⁻¹	238.93 ^a	247.76 ^a	235.16 ^a	241.13 ^a	264.44 ^a	243.79 ^a	250.98 ^a	232.00 ^a	233.26 ^a	238.73 ^a	240.86 ^a	248.53 ^a	0.1329	0.5427	0.0097

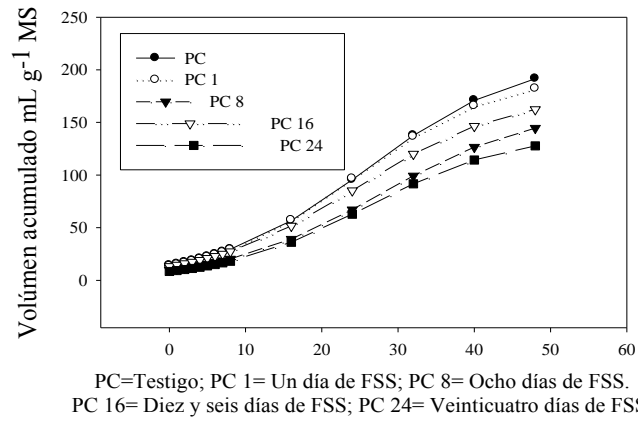
^{a,b,c}Medias con distinta literal en las misma fila son diferentes (P<0.001).

V= Volumen máximo de gas; S= tasa de producción de gas; L= fase de retardo o fase lac.; Dig= digestibilidad de la materia seca (48 h)

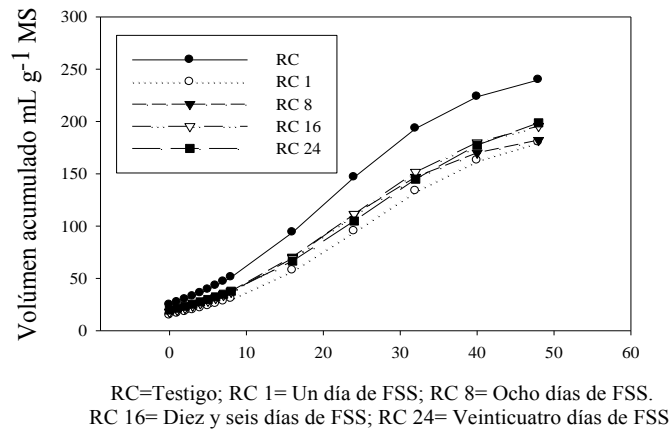
EM = Energía metabolizable MJ; M. Mic.= Masa Microbiana Mg g⁻¹.

Mezcla: consiste de 75% de Paja de cebada y 25% de Raicilla.

(a)



(b)



(c)

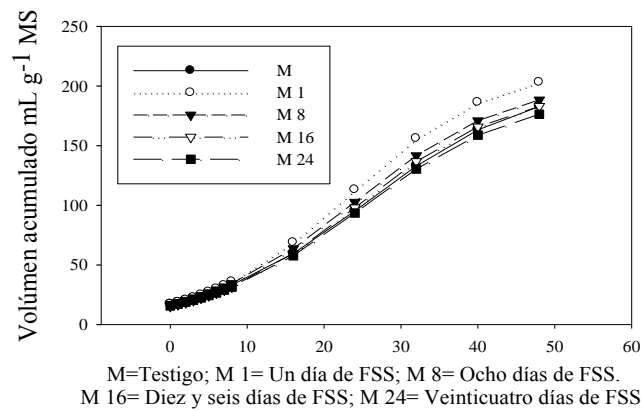


Fig. 2.2 Cinética de producción de gas durante la fermentación ruminal *In vitro* de (a) paja de cebada (PC), (b) raicilla (RC) y (c) una mezcla (75:25) de PC y RC tratadas con *P. sapidus* a diferentes tiempos de incubación

2.5. DISCUSIÓN

La paja de cebada y raicilla contienen una alta proporción de FDN y FDA, éste último componente se correlaciona negativamente con la digestibilidad ruminal (NRC, 2001), la misma respuesta también fue observada en el presente estudio (Tabla 2.1). La raicilla contiene cinco unidades porcentuales menos de FDA que la paja de cebada, lo que determinó que su digestibilidad y la extensión de fermentación, estimada como volumen máximo de gas V (Tabla 2.2), fuera mayor que la de la paja. Como consecuencia de una mayor proporción de FDN en la PC, ésta tiene una menor cantidad de contenido celular en comparación a la raicilla a seis horas de fermentación (Figura 2.1) y un mayor tiempo de retardo L; (Tabla 2.2). A pesar de que la adición de 25% de raicilla a la paja de cebada (M), mejoró su digestibilidad ésta fue insuficiente para reflejarse en el volumen fraccional, V, L y S, lo cual se atribuyó a que por una parte el contenido de proteína de la RC es superior al que contiene PC y como se sabe la proteína y lípidos producen menor cantidad de gases (Posada y Noguera, 2006). La RC por su mayor contenido de almidón y por el menor tamaño de partícula (Tafaj *et al.* 2005) en comparación con PC permite una mejor acción microbiana que se refleja en una mayor digestión y menor fermentación. La RC induce una mayor proporción de ácido propiónico (Getachew *et al.*, 1998; Mäntysaari *et al.*, 2007). Generalmente, el sustrato determina la mayor o menor producción del tipo de los AGV (Fernández-Meyer, 1998). El sustrato PC registró un mayor nivel de EM lo cual puede deberse al efecto directo de proveer almidón que podría tener efectos asociativos adversos, la digestibilidad de la fibra (celulosa, hemicelulosa) podría

disminuir, como también la población bacteriana celulolítica. Los resultados son variables y dependen del tiempo de adaptación al sustrato (Sveinbjörnsson *et al.* 2006).

Los sustratos tratados con *P. sapidus* disminuyeron el contenido de FDN en la raicilla con una tendencia cuadrática, alcanzando su mínimo a los 16 días. De igual forma *P. sapidus* disminuyó la proporción de lignina en PC y RC (Tabla 2.1) aunque en esta última no fue significativa. Esta reducción fue insuficiente (Eun *et al.* 2006) como para mejorar su fermentación y digestibilidad de la PC, pero sí la mejoró 9.4 % en la RC, con tendencia a aumentar la producción de gas (V; Tabla 2.3), Lo anterior puede deberse a las enzimas que produce el hongo (Rodríguez *et al.* 2008) modifican la FDN y la hace más accesible al ataque microbiano Peláez-Acero *et al.* (2008) usando *P. sapidus* en caña de azúcar encontraron valores de V entre 294.73 y 155.69 mL g⁻¹, de L entre 0.31 y 3.64 h y de S entre 0.0248 y 0.0364 h⁻¹. En la presente investigación V varió entre 219.67 y 128.83 mL g⁻¹ MS, L fluctuó entre 1.98 y 9.07 h y S entre 0.029 y 0.032, siendo los valores similares en el presente trabajo.

El tratamiento de la paja de trigo con los hongos *Trametes versicolor*, *Bjerkandera adusta* y *Fomes fomentarius* incrementó la degradación de la FDN con la técnica *in vitro* de producción de gas (Rodríguez *et al.* 2008), lo cual fue indicativo de que la estructura de la pared celular se modificó y esto redujo la fase de retardo de la fracción asociada a la pared celular. Por el contrario, en nuestro estudio el tratamiento con *P. sapidus* redujo la producción de gas en los tres sustratos en comparación a los sustratos sin tratar; sin embargo, la tasa de fermentación se incrementó 9.3 % para PC, 6.2 % para RC y 3.03 % para M.

Okano *et al.* (2006) usando a *P. eryngii* en bagazo de caña de azúcar reportan que la proporción de la materia seca y lignina residual del sustrato decrece y como consecuencia su

digestibilidad *in vitro* (DIVMO), y la producción de gas *in vitro* a las 48 horas aumentan. En la presente investigación, los resultados son similares a los reportados por Okano *et al.* (2006). Getachew *et al.* (2004) evaluaron la producción de gas *in vitro* de doce recursos alimenticios encontrando que los granos secos de destilería producen 201.3 mL g⁻¹ MS de gas a 48 horas de fermentación. En esta investigación la M sin tratamiento con *P. sapidus* produjo 196.4 mL de gas solo superando a M con 24 días de tratamiento con el hongo la producción de gas se disminuyó a 164.4 mL g⁻¹ MS. Lo que significa una reducción en la digestibilidad tras ese tiempo de acción de *P. sapidus*.

Con relación a la producción de ácidos grasos volátiles, Getachew *et al.* (2004) obtuvieron 14.8 mM l⁻¹ de acético, 10.2 mM l⁻¹ de propiónico y 2.1 mM l⁻¹ de butírico, pero en este estudio el ácido acético en M tuvo valores de 16.40 mM l⁻¹ sin *P. sapidus* y a los 24 días de fermentación con el hongo se registró 16.18 mM l⁻¹. El ácido propiónico registró 4.76 sin *P. sapidus* y 4.55 mM l⁻¹ con *P. sapidus*, y para ácido butírico 2.81 sin *P. sapidus* y 2.63 mM l⁻¹ con *P. sapidus*, encontrando la mayor diferencia en la producción de ácido propiónico comparado con el trabajo de Getachew *et al.* (2004). Los valores registrados son positivos, hay que recordar que los AGV's representan la fuente principal de energía para los rumiantes y son usados eficientemente.

Eun *et al.* (2006) utilizó enzimas xilanasas y celulasas en paja de arroz en dos presentaciones, una sin y otra con amoníaco, y ellos encuentran efectos mínimos pero positivos en cuanto a producción de gas y degradabilidad de la paja de arroz sin tratar. Estos resultados fueron diferentes con lo reportado por Wang *et al.* (2004), quienes atribuyen la diferencia a los sustratos, ya que ellos usaron paja de arroz y Wang *et al.* (2004) uso paja de

trigo por la diferencia de especificidad de las enzimas usadas. De hecho mencionan que la paja de arroz difiere considerablemente de otras pajas de cereales como son la de cebada, trigo y avena con una alta relación hoja:tallo (60:40); ambas fracciones con similar digestibilidad. También concluyen que los cambios en la proporción molar de los ácidos grasos volátiles indican que la fermentación produce los cambios de la paja de arroz después del tratamiento con enzimas exógenos.

El tratamiento con *P. sapidus* disminuyó la proporción de ácido acético e incrementó el del ácido propiónico, en comparación al sustrato no tratado (Tabla 2.3), con lo cual la relación acético-propiónico fue mejor. Karunanandaa y Varga, (1996) reportan disminución en el ácido acético e incremento en el ácido propiónico, por efecto de la acción de enzimas exógenas lo cual, según estos autores, tiene impacto en la degradación del alimento y en los productos finales de la fermentación ruminal que resulta en un mejoramiento de la eficiencia de utilización de los nutrientes. Cuando las enzimas fibrolíticas y amilasas de *Trichoderma viride* (xilanasas), *Aspergillus niger* y *Trichoderma viride* (Giraldo *et al.*, 2008) actúan sobre una mezcla de paja de pasto y alimento concentrado en las proporciones de 0.7:0.3, 0.5:0.5 y 0.3:0.7 incrementaron la digestibilidad verdadera de la MS, la producción de ácidos acético, propiónico, ácidos grasos volátiles totales y gas, tras ocho horas de fermentación ruminal *in vitro*, pero a 24 horas de incubación los efectos desaparecieron, aunque la degradación del sustrato continuó siendo mayor.

Okano *et al.* (2005) evaluaron el efecto de cinco hongos de pudrición blanca (*P. ostreatus*, *P. holiota nameko*, *Dichomitus squalens*, *Lentinula edodes* y *Ceriporiopsis subvermispora*) en la digestibilidad cedro rojo (*Cryptomeria japonica*) a 4, 8, 12 y 20 semanas

de tratamiento. La digestibilidad de la MO (DIVMO) del árbol de cedro incrementó con el crecimiento de *Ceriporiopsis subvermispota* y *Lentinula edodes* por 20 semanas, pero la DIVMO fue menor con *P. ostreatus*, *P. nameko*, o *D.squalens*. La producción de gas *in vitro* (PGIV) con *P. ostreatus*, *P. nameko*, o *D. squalens* fue de 37 mL g⁻¹ MO en comparación a 17 mL g⁻¹ MO cuando no fue inoculado con estos hongos, pero el incremento fue 107 mL g⁻¹ MO cuando se aplicó *C. subvermispota* por 20 semanas. Estos resultados muestran que la especie de hongo y el tipo de sustrato determina los cambios en la estructura y composición del sustrato, lo cual puede ser benéfico o negativo para su utilización a nivel de consumo por el rumiante.

En el presente estudio, la mezcla evaluada de paja de cebada y raicilla con *P. sapidus* presentó modificaciones en su composición química, no obstante en el proceso de preparación de los sustratos, previo a la siembra del hongo, fue necesario someter a calentamiento con agua y reducir la carga microbiana que pudiera competir con el hongo. Como consecuencia se pierden algunos azúcares solubles principalmente, algunas pectinas y se alcaliniza el sustrato; sin embargo, esta reducción no afecta el desempeño del hongo sobre el sustrato (Castañeda de León y Leal-Lara, 2007), al contrario, al disminuir el contenido de azúcares solubles se reduce el riesgo de contaminación con otros hongos. En comparación con los experimentos referenciados, en el trabajo de Okano *et al.* (2006), mencionan que la caña de azúcar fue esterilizada e inoculada, mientras que los granos de destilería se usaron tal como salen de la planta de procesamiento (Giraldo *et al.*, 2008 ; Rodríguez *et al.*, 2008). En referencia a los resultados del presente estudio con *P. sapidus*, se observó diferencia en el comportamiento entre el tratamiento previo y los diferentes tiempos de FSS con el hongo. Para la M se

alcanzan valores intermedios comparado con PC y RC y se aprecia en lo general que esto se mantiene durante los días de FSS, además que hay mas homogeneidad entre el sustrato con y sin la acción de *P. sapidus*. M tuvo la mejor degradabilidad entre los tratamientos.

2.6. CONCLUSIONES DEL SEGUNDO ARTÍCULO

La adición de raicilla a la paja de cebada con la acción de *P. sapidus*, permitió modificar la composición química del sustrato y mejoró el aprovechamiento por las bacterias ruminales. Se recomienda tratar con *P. sapidus*, la PC por 8 días, la RC por 24 días y la M por 8 días. El uso de la paja combinada con raicilla presentó mejor digestibilidad, este resultado aporta información relevante para integrar la raicilla con otros sustratos y mejorar la utilización de la paja en la alimentación de rumiantes.

2.8 LITERATURA CITADA

- A. O. A. C., 2007. Official Methods of Analysis. 18th Ed. Off. Agric. Chem., Washington, D.C., U.S.A.
- Blümmel, M., Ørskov, E.R., 1993. Comparison of in vitro gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting feed intake in cattle. Anim. Feed Sci. Technol. 40, 109-119.
- Breene, W.M., 1990. Nutricional and medicinal value of specialty mushrooms. Jour. Food Protect. 53, No 10, 883-894.
- Czerkawski, J.W. and Breckenridge, G., 1969. The fermentation of sugar-beet pulp and sucrose in an artificial rumen, and the effect of linseed oil fatty acids on the fermentation. Br.J. Nutr. 23, 51-66.
- Castañeda de León, V. T., y Leal-Lara, H., 2007. Factores que influyen en la producción de sustratos selectivos para el cultivo de *Pleurotus ostreatus*. En El Cultivo de Cetas *Pleurotus spp.* En México Eds. José H. Vazquez Sánchez, Daniel Martínez Carrera, Gerardo Mata y Hermilo Leal Lara. Colegio de la Frontera Sur. Tapachula Chiapas, México pp. 81-90.
- Davies, Z.S., Mason, D., Brooks, A.E., Griffith, G.W., Merry, R.J., Theodorou, M.K., 2000. An automated system for measuring gas production from forages inoculated with rumen fluid and its use in determining the effect of enzymes on grass silage. Anim. Feed Sci. Technol. 83, 205-221.
- Dehghan-banadaky, M., Corbett, R., Obra, M., 2007. Effects of barley grain processing on productivity of cattle. Anim. Feed Sci. Technol. 137, 1-24.
- Eun, J. S., Beauchemin, K.A., Hong, S.H., Bauer, M.W., 2006. Exogenous enzymes added to untreated or ammoniated rice straw: Effects on *in vitro* fermentation characteristics and degradability. Anim. Feed Sci. Technol. 131, 86-101.
- Fernández Mayer, A., 1998. Fisiología de producción de la carne. INTA. ISSN 0326-2626 40 pp.
- Getachew, G., Blümmel, M., Makkar, H.P.S., Backer, K., 1998. In vitro gas measuring techniques for assessment of nutrition quality of feeds: a review. Anim. Feed. Sci. Technol. 72, 261-281.

- Getachew, G., Robinson, P.H., DePeters, E.J., Taylor, S.J., 2004. Relationships between chemical composition, dry matter degradation and *in vitro* gas production of several ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 111, 57-71.
- Giraldo, L.A., Tejido, M.L., Ranilla, M.J. Carro, M.D., 2008. Effects of exogenous fibrolytic enzymes on *in vitro* ruminal fermentation of substrates with different forage:concentrate ratios. *Anim. Feed Sci. Technol.* 141, 306-325.
- Karunanandaa, K., and Varga, G.A., 1996. Colonization of rice straw by white-rot fungi (*Cyathus stercoreus*): Effect on ruminal fermentation pattern, nitrogen metabolism, and fiber utilization during continuous culture. *Anim. Feed Sci. Technol.* Vol 61, n° 1-4, 1-16.
- Lowman, R.S., Theodorou, M.K., Cuddeford, D., 2002. The effect of sample processing on gas production profiles obtained using the pressure transducer technique. *Anim. Feed Sci. Technol.* 97, 221-237.
- Mäntysaari, P., Khalili, H., Sariola, J., Rantanen, A., 2007. Use of barley fibre and wet distillers' solubles as feedstuffs for Ayrshire dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 135, 52-65.
- Makkar H., 2003. Recent advances in *in vitro* gas method for evaluation of nutritional quality of feed resources. http://www.fao.org/DOCREP/ARTICLE/AGRIPPA/570_EN_toc.htm .
- Menke, K. H., and Steingass, H., 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Anim. Res. Devel.* 28, 7-55.
- Nagadi, S., Herrero, M., Jessop, N.S., 1999. Effect of frequency of ovine ruminal sampling on microbial activity and substrate fermentation. *Proc. Br. Soc. Anim. Sci.*, 153.
- N.R.C. 2001. Nutrient requirements of domestic animals. Nutrient requirements of dairy cattle. 7th ed. Natl. Acad. of Sci. Washington, DC, EEUU. 381 pp.
- Okano, K., Kitagawa, M., Sasaki, Y. and Watanabe, T. 2005. Conversion of Japanese red cedar (*Cryptomeria japonica*) into a feed for ruminants by white-rot basidiomycetes. *Anim. Feed Sci. Technol.* 120: 235-243.
- Okano, K., Fukui, S., Kitao, S., Usagawa, T. 2006. Effects of cultura length of *Pleurotus eryngii* grown on sugarcane bagasse on *in vitro* digestibility and chemical composition. *Anim. Feed Sci. Technol.* 136 240-247.

- Peláez-Acero, A., Meneses-Mayo, M., Miranda-Romero L.A., Rivas-Regias, M.D., Barcena-Gama, R., Loera, O., 2008. Advantages of solid fermentation state with *Pleurotus sapidus* in sugar cane silage. *Arch. Zootec.* 57 (217), 25-33.
- Posada, S.L., Nogera, R., 2006. Relación entre presión y volumen para la implementación de la técnica *in vitro* de producción de gases en Medellín, Colombia. *Re. Col. Cienc. Pec.* Vol. 19, (4) 407-414.
- Platt, W.M.; Hader, Y. And Chet, I., 1984. Fungal activities involved in lignocellulose degradation by *Pleurotus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 20. 2, 150-154.
- Rajarithnam, S. And Bano, Z.,1989. *Pleurotus* mushrooms III. Biotransformation of natural lignocellulosic wastes: applications and implications. *Critical Reviews in Food Sci. Nutr.*, Vol. 28, No. 1, 31-113.
- Rodriguez, M.A.M., Pino, P., Bezerra, R.M.F., Dias, A.A., Guedes, C.V.M., Cardoso, V.M.G., Cone, J.W. Ferreira, L.M.M., Calação, J. Sequeira, C.A., 2008. Effect of extracts isolated from White-rot fungi on chemical composition and *in vitro* digestibility of wheat straw. *Anim. Feed Sci. Technol.* 141, 326-338.
- SAS., 2002. Institute Inc AS/Stat User's Guide version 9.00 (FS MO), North Caroline, USA. Institute Inc.
- Salmones, D, Mata, G. And Waliszewski, K. N., 2005. Comparative culturing of *Pleurotus spp.* On coffee pulp and wheat straw: biomass production and substrate biodegradation. *Bioresourse Technol.*, 96, 5, 537 – 544.
- SAGARPA Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación 2003. Plan Rector Sistema Nacional CEBADA Segunda Fase: Diagnostico Inicial [en línea] disponible <http://www.amsda.com.mx/PRNacionales/Nacionales/PRNcebada.pdf> [fecha de consulta: enero 06, 2008].
- SAGARPA Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación 2007. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera SIAP [en línea] Disponible: <http://www.siap.gob.mx/> [fecha de consulta: enero 06, 2008].
- Schofield, P. and Pell, A.N., 1995. Measurement and kinetic analysis of the natural detergent-soluble carbohydrate fraction of legumes and grasses. *J. Anim. Sci.* 73, 3455-3463.
- Schwentesius, R., Aguilar-Ávila, J., González-Cruz, M. A., 2004. La cadena agroindustrial de cebada-malta-cerveza. Propuesta para la renegociación del TLACAN y política de fomento para su reconstrucción. 2ª edición CIETAAM y La Jornada, México, 265pp.

- Sveinbjörnsson., 2006. Effect of the proportions of neutral detergent fibre and Storch, and their degradation rates, on *in vitro* ruminal fermentation. Anim. Feed Sci. Technol 130, 172-190.
- Steel, R.G D. and Torrie, H.J., 1986. Biostatistics. Principles and procedures. (2nd Ed.). McGraw-Hill Boock Co., México. Pp. 620.
- Tafaj, M., Zebeli, Q., Junck, B., Steingass, H., Drochner, W., 2005. Effects of particle size of a total mixed ration on in vivo ruminal fermentation patterns and inocula characteristics used for in vitro gas production. Anim. Feed Sci. Technol. 123-124, 139-154.
- Van Soest, P.J., J.B. Robertson, and B. A Lewis., 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and no starch polysaccharides in relation to animal nutrition. J. Dairy Sci. 74, 3583.
- Wang., Y., Stratling, B.M., ZoBell, D.R., Wiedmeier, and T.A. McAllister., 2004. Effect of alkali pretreatment of wheat straw on the efficacy of exogenous fibrolitic enzymes. J. Anim. Sci. 82 (1), 198-208.
- Yildiz, S., Yildiz, U.C., Gezer, E.D. and Temiz, A., 2002. Some lignocellulosic wastes used as raw material in cultivation of the *Pleurotus ostreatus* culture mushroom. Process Biochem., 38 , 3, 301 – 306.
- Zadrazil F., D.N. Karma, O.S. Isikhuemhen, F. Schuchardt, G. Flachowsky., 1996. Bioconversion of Lignocellulose into Ruminant Feed with White Rot Fungi – Review of Work Done at the FAL, Braunschweig. J. Appl. Anim. Res. 10, 105-124.
- Zhang, R., Li, X., and Fadel, J.G., 2002. Oyster mushroom cultivation with rice and wheat straw. Bioresource Technol., 82, No 3, 277-284.

3. DISCUSION GENERAL

En general existe una amplia información que estudia el contenido de los componentes celulares y cómo aumentar su disponibilidad y degradación por los microorganismos ruminales. (Zadrazil, 1985 ; Agosin *et al.*,1987;Gupta, 1987; Zadrazil *et al.*,1995 Zadrazil *et al.*,1996). El trabajo presenta una originalidad, basada en la combinación de un organismo biológico el *Pleurotus sapidus* con la incorporación de la raicilla como fuente de nitrógeno buscando un sinergismo entre la digestibilidad de la fibra y la incorporación de nutrientes que benefician el aporte nutritivo de los forrajes

El tiempo de cultivo del *P. sapidus* sobre la paja de cebada (PC), raicilla (RC) y la mezcla de ambos 75-25% (M) Fue un factor importante para estudiar la composición bromatológica de estos sustratos, la capacidad enzimática de las celulasas, xilanasas y lacasas. En trabajo previo de Luna-Rodríguez *et al.* (2007) indicaron que el tiempo óptimo de la acción enzimática fue entre 10 y 16 días. Especialmente la capacidad de los hongos de pudrición blanca como *Pleurotus* se caracterizaron por degradar la fracción de lignina presente en el forraje sobre el contenido de la celulosa. Similarmente Kamra y Zadrazil, (1986) y Valmaseda *et al.* (1991) reportan la acción sobre la lignina de *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus* y a *Pleurotus eryngii* con capacidad de remover hasta el 50% de la lignina existente, con una menor acción sobre la celulosa.

Cuando usamos a *Pleurotus sapidus* el sustrato RC mostró un comportamiento similar con PC y M, considerando por trabajos previos a PC (Zadrazil 1985; Zadrazil *et al.*, 1996)

como un sustrato adecuado para la acción enzimática del hongo *Pleurotus* y la M que cuenta con 75% de PC, se registró una diferencia estadística mayor entre RC, PC y la M en la producción de Xilanasas (alrededor de 200 UI g⁻¹ para PC y M al día 16 de FSS) y Celulasas (3.2 UI g⁻¹ en M contra 2.5 UI g⁻¹ en PC). Se observó que en el sustrato RC se tiene un menor desempeño de las enzimas lacasas, lo que coincide con el trabajo de Quintero *et al.* (2006) y que reportan atribuible a los altos niveles de nitrógeno y carbono que inhiben la síntesis de estas enzimas en particular. Es de destacar el buen desempeño enzimático del hongo *P. sapidus* al actuar sobre M que al día 16 de FSS registra niveles de producción de 45.00 UI g⁻¹.

El segundo aspecto de análisis y discusión en este estudio son los efectos del tiempo de cultivo de *Pleurotus sapidus* sobre la: PC, RC y M, en la composición química de estos sustratos y su efecto en la digestibilidad, basándonos en trabajos previos consideramos pertinente observar que efecto se logra sobre los subproductos y antes de realizar la cosecha del hongo para fines de consumo en humanos.

Los siguientes autores (Tsang *et al.*, 1987; Zadrazil, 1996). reportan cambios en la composición del sustrato usando hongos del género *Pleurotus* como *P. sajor-caju*, *P. sapidus*, *P. cornucopiae*, *P. ostreatus* y *P. eryngii* con promedios de pérdida de peso de 18 %, pérdidas de lignina de 11 %, celulosa del 20 % y hemicelulosa 50% después de su cosecha, y menor digestibilidad de la celulosa comparado con la paja intacta

En los resultados obtenidos se registraron menores niveles de pérdidas porcentuales de los componentes químicos en los sustratos tras el cultivo con *P. sapidus*, la disminución registrada de la hemicelulosa tras la inoculación en PC a 16 días fue de 1.3 %, para RC 2.9 % y para M 0.05 %.

La disminución en los niveles de FDN a 8 días de fermentación de entre los tratamientos se nota al comparar a PC -0.09 % con RC -1.7 % y M 0.7 %, con un porcentaje de pérdida mayor en RC seguida de PC y M. Es más notable la diferencia entre celulosa y hemicelulosa al comparar RC con PC, efecto que se mantiene para hemicelulosa en menor proporción en M. Sin embargo, la disminución de la hemicelulosa se mantuvo constante. Esta disminución en los componentes químicos está de acuerdo con otros reportes (Yamakawa *et al.*, 1992; Li *et al.*, 2001; Miki *et al.*, 2005). Es decir, la hemicelulosa y los hidratos de carbono solubles se consumen como fuente de energía antes de la celulosa y lignina en la fase de crecimiento micelial de los hongos.

En este estudio, usando a *P. sapidus* la diferencia en DIVMS de los sustratos antes del día 24 fue mejor para RC con 31.11 y seguida de M con 14.76 puntos porcentuales, Kewalramani *et al.* (1988) observó que la digestibilidad in vitro de la MS de bagazo de caña de azúcar cultivadas con *P. sajor-caju* y *Polyporus caperatus* a 25°C durante 50 días aumentó en 0.220 y 0.190, unidades respectivamente. Del mismo modo, Zadrazil y Puniya (1995) reportaron que la DIVMO del bagazo cultivado con *P. eryngii* a 25° C durante 42 días aumentó en 0.115 unidades porcentuales con respecto al testigo, partiendo de 0.4 g. de muestra sometida al análisis.

En un experimento de digestibilidad utilizando ovejas, Suzuki, (1995) observó que la energía digestible del bagazo de caña de azúcar que *P. abalonuswas* cultivado durante 96 días a temperatura ambiente, aumentó de 1,3 a 2,0 Mcal kg⁻¹ MS. Como se mencionó anteriormente, el efecto de la mejora de la digestibilidad fue diferente dependiendo de las condiciones de cultivo, temperatura, tiempo de cultivo y las especies de hongos. Aunque la

temperatura de cultivo en este estudio con *P. sapidus* fue de 25° C, similar a informes anteriores, el efecto de la mejora de la digestibilidad fue registrado, considerando en términos generales como el día 16 de fermentación sólida como el mejor de los tiempos evaluados, para considerar su uso como alimento para rumiantes.

Con todo lo discutido anteriormente, esta investigación aporta información nueva sobre la acción enzimática del hongo *P. sapidus* sobre los subproductos señalados, se considera aprovechar estos cambios en forma íntegra, ya que no esperamos a la fructificación y además se suma a éste potencial el incremento en la digestibilidad y la presencia del mismo hongo como recurso alimenticio que consideramos es de utilidad y de aplicación en la alimentación de rumiantes.

LITERATURA CITADA

- Agosin, E., Tollier, M.T., Heckmann, E., Brillouet, J.M., Thivend, P., Monties, B., 1987. Effect of fungal treatment of lignocellulosics on biodegradability. In: Van der Meer, J.M., Rijkens, B.A., Ferranti, M.P. (eds.) Degradation of lignocellulosics in ruminants and in industrial processes. Commission of the European Communities. Elsevier, New York, pp 35-43.
- Gupta, B.N., 1987. Fungal treatment of cereal straws for ruminant feeding. In: Singh, T., Flegal, T.W., Schiere, J.B. (eds.) Biological, chemical and physical treatment of crop residues for use as animal feeds. ICAR, New Delhi, India, pp 26-36.
- Kamra, D.N., Zadrazil, F., 1986. Influence of gaseous phase light and substrate pretreatment on fruit body formation, lignin degradation and in vitro digestibility of wheat straw fermented with *Pleurotus* spp. Agric. Wastes 18: 1-17.
- Kewalramani, N., Kamra, D.N., Lall, D., Pathak, N.N., 1988. Bioconversion of sugarcane bagasse with white rot fungi. Biotechnol. Lett. 10: 369-372.
- Li, X., Pang, Y., Zhang, R., 2001. Composition changes of cottonseed hull substrate during *P. ostreatus* growth and the effects on the feeding value of the spent substrate. Bioresour. Technol. 80: 157-161.
- Luna-Rodríguez, L., Meneses-Mayo, M., Mendoza-Martínez, G., Montalvo-Paquini, C., y Loera-Corral, O., 2007. Producción de enzimas fibrolíticas por fermentación sólida en rastrojo de cebada empleando *Pleurotus ostreatus*. Archivos de Zootecnia (En revisión).
- Miki, S., Nimura, Y., Kitao, R., Okano, K., 2005. Effect of continued culture of spent corncob meal medium with *Pleurotus eryngii* on the nutritive value of the medium. Nihon Chikusan Gakkaiho 76: 309-314.
- Mthivane, D.M.N., Nsahlai, J.V., Bonsi, M.L.K., 2001. The nutritional composition, fermentation characteristics, in sacco degradation and fungal pathogen Dynamics of sugarcane tops ensiled with broiler litter with or without water. Animal Feed Sci. Technol. 94: 171-185.
- Quintero, J.C., Feijoo, G. y Lema, J.M., 2006. Producción de enzimas ligninolíticas con hongos basidiomicetos cultivados sobre materiales lignocelulósicos. VITAE, Revista de la facultad de Química farmacéutica ISSN 0121-4004 Vol. 13 N° 2 pp. 61-67.

- Suzuki, Y., 1995. Study on nutritional upgrading of underutilized feed resources by basidiomycetes. PH.D. thesis, Kyoto University, Kyoto. Japon.
- Tsang, L.J., Reid, I.D., Coxworth, E.C., 1987. Delignification of wheat straw by *Pleurotus* spp under mushroom growing condition. Appl. Environ. Microbiol. 53: 1304-1306.
- Valmaseda, M., Martinez, M.J., Martinez, A.T., 1991. Kinetics of wheat straw solid-state fermentation with *Trametes versicolor* and *Pleurotus ostreatus* – lignin and polysaccharide alteration and production of related enzymatic activities. Appl. Microbial Biotechnol. 35: 817-823.
- Yamakawa, M., Abe, h., Okamoto, M., 1992. Effect of incubation with edible mushroom, *Pleurotus ostreatus*, on voluntary intake and digestibility of rice straw by sheep. Anim. Sci. Technol. (Jpn.) 63: 129-133.
- Zadrazil, F., 1985. Screening of fungi for lignin decomposition and conversion of straw into feed. Angew Bot 59: 433-452.
- Zadrazil, F., Puniya, A.K., 1995. Studies on the effect of particle size on solid-state fermentation of sugarcane bagasse into animal feed using white-rot fungi. Bioresour. Technol. 54: 85-87.
- Zadrazil, F., Kamra, D.N., Isskhuemhen, O.S., Schuchardt, F., Flachowsky, G., 1996. Bioconversion of lignocellulose into ruminant feed with White rot fungi – review of work done at the FAL. Braunschweig. J. Appl. Anim. Res. 10: 105-124.

4. CONCLUSIÓN GENERAL

Los recursos forrajeros son por lo general de bajo valor nutritivo, sin embargo su uso está muy generalizado y en algunas partes del mundo resultan ser los únicos disponibles para la alimentación de los rumiantes. Generar conocimiento del efecto enzimático del hongo *Pleurotus sapidus* sobre la raicilla y su mezcla con paja de cebada, permite conocer sobre las modificaciones y efectos benéficos posibles para su aplicación en la nutrición del ganado.

Después de analizar los resultados con la aplicación del hongo basidiomiceto *P. sapidus* y mediante un proceso de fermentación sólida, a diferentes tiempos, sobre los subproductos indicados, en la presente investigación consideramos que por efecto de la actividad enzimática del hongo, se logra modificar de manera favorable su composición fisicoquímica, considerando que M, la cual se compone de 75% de paja de cebada y del 25% del producto de desecho de la industria Maltera denominada raicilla manifiesta un mejor desempeño comparado con la raicilla sola, se considera que al reducir la proporción de lignina se logra liberar recursos atrapados como son la celulosa y hemicelulosa, con esta idea se consideró conveniente someter a análisis las muestras evaluadas en una prueba de digestibilidad *in vitro* por la técnica de producción de gas, y medir su potencial uso e incorporación en dietas para rumiantes.

En la prueba de digestibilidad se observaron modificaciones efectuadas por el hongo sobre el sustrato, comparadas con el material sin tratamiento permiten concluir que si bien

los valores de los sustratos testigo son mayores, sí se evidencian diferencias entre los sustratos tratados considerando que la modificación realizada por el hongo *Pleurotus sapidus* resulta en una mayor respuesta en la producción de gas y en consecuencia en la digestibilidad ruminal de los materiales sometidos a la prueba; concluyendo que el tratamiento M resultó en una buena posibilidad para su uso en la alimentación de rumiantes.

La modificación en su composición mejoró el aprovechamiento de estos subproductos, obteniendo beneficios directos e indirectos. El inóculo de *P. sapidus* modificó las características fisicoquímicas y se obtuvo un mejor aprovechamiento de los recursos existentes, haciéndolos más disponibles a la degradación de los microorganismos ruminales.

Concluyendo, esta investigación fue un desarrollo básico y puede ser potencialmente escalado para su aplicación en una forma más práctica para beneficio de la alimentación animal.