

ENZIMAS FIBROLÍTICAS PRODUCIDAS POR FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO PARA MEJORAR LOS ENSILAJES DE CAÑA DE AZÚCAR

FIBROLYTIC ENZYMES PRODUCED BY SOLID-STATE FERMENTATION TO IMPROVE SUGAR CANE SILAGE

Armando Peláez-Acero¹, Marcos Meneses-Mayo^{2,3*}, L. Alberto Miranda-Romero⁴, Maricela Ayala-Martínez¹, M. Magdalena Crosby-Galván², Octavio Loera-Corral⁵, M. Dolores Megías-Rivas⁶

¹Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias Agropecuarias, Área Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Rancho Universitario Avenida Universidad Km 1 Ex-Hacienda de Aquetzalpa, 43600, Tulancingo, Estado de Hidalgo. ²Ganadería. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. 56230. Montecillo, Estado de México. (mmayo@colpos.mx). ³Facultad de Ciencias de la Salud (Nutrición), Universidad Anáhuac México-Norte, Avenida Universidad Anáhuac Número 46, Colonia Lomas Anáhuac, 52786. Huixquilucan, Estado de México. ⁴Zootecnia, Universidad Autónoma Chapingo. 56235. Chapingo, Estado de México. ⁵Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana. 09340. Iztapalapa, México, D.F. ⁶Universidad de Murcia, Departamento de Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Campus de Espinardo, Murcia, España, 30071.

RESUMEN

Los pastos y forrajes son la principal fuente de alimentos para los bovinos en el trópico, pero la producción forrajera varía en calidad y cantidad a través del año afectando directamente la productividad del ganado. Una alternativa en épocas de sequías es el uso de caña de azúcar (CA), pero tiene baja digestibilidad (20 %), poca proteína (2.5 a 4.5 %) y un desbalance mineral. El objetivo de este estudio fue evaluar el uso de la CA integral en un proceso biotecnológico de fermentación en estado sólido (FES) con un hongo de la pudrición blanca (*Pleurotus sapidus*). Se evaluó la composición química del FES en el día 0 (CF-0) y 15 (CF-15) y los valores de DIVMS, PT, FDN y FDA fueron: 1) para CF-0, 59.17, 2.53, 50.18 y 31.80 %; 2) para CF-15, 65.08, 6.23, 74.24 y 60.84 %. La actividad enzimática de celulasas, xilanasas y lacasas se evaluó sólo para

CF-15: 1.96, 2.08 y 5.25 UI g⁻¹ MS. Los ensilados de CA integral incluyeron 0, 10 y 20 % de CF-15 y se evaluaron cambios en su composición química a 0, 8 y 16 d de ensilaje. A los 16 d los ensilados mostraron pH 4.2 y aumento (p≤0.05) del ácido láctico, acético, NH₃-N; en el tratamiento con 20 % CF-15 hubo mayor (p≤0.05) DIVMS (69.19 %) y volumen máximo de producción de gas *in vitro* (207.09 mL mg⁻¹ MS). El análisis de los resultados sugiere que se pueden incluir fermentos sólidos con *P. sapidus* para mejorar la DIVMS y las variables fermentativas de los ensilados de CA integral.

Palabras clave: *Pleurotus sapidus*, celulasas, digestibilidad, lacasas, fibra, xilanasas.

INTRODUCCIÓN

* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: Julio, 2010. Aprobado: Mayo, 2011.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 45: xxx-xxx. 2011.

La caña de azúcar (CA) es un recurso forrajero abundante en el trópico mexicano y su inconveniente principal es el contenido escaso de proteína y la digestibilidad baja de la fibra debido a que sus paredes celulares tienen contenido alto de hemicelulosa, celulosa y lignina (Cano *et al.*, 2003). Por tanto, se usan tratamientos físicos, químicos y biológicos o sus combinaciones para reducir su contenido de fibra, particularmente el complejo lignocelulósico (Fahey *et al.*, 1993). Los tratamientos biológicos con hongos de la pudrición blanca han mostrado grandes ventajas, por sus enzimas fibrolíticas (extractos fibrolíticos) obtenidas por técnicas biotecnológicas como fermentación líquida y en estado sólido, han contribuido a la pre-digestión de la fracción fibrosa de diversos forrajes y subproductos. Para estos tratamientos se consideran el tipo de forraje, dosis, dieta, presentación del producto (líquido o sólido) y su incorporación al sustrato de interés (Hristov *et al.*, 1998; Jalç *et al.*, 1999; McAllister *et al.*, 1999; Cuervo *et al.*, 2009). Entre las enzimas que producen estos hongos de pudrición blanca están: celulasas (E.C.3.2.1.4), lacasas (E.C.1.1.0.3.2) y xilanasas (E.C.3.2.1.8), que participan en la ruptura de compuestos polifenólicos, enlaces glucosídicos β -1,4 en polisacáridos como la celulosa y hemicelulosa, de la pared celular unidos a lignina. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la inclusión de diferentes porcentajes de fermento en estado sólido, a base de caña de azúcar, y el hongo *Pleurotus*

sapidus en ensilados de CA integral.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Forraje

Se usó CA integral (hojas, tallo y cogollo) variedad MEX 79-431, de un año de edad, recolectada de una parcela en el Municipio de Ciudad de Ayala, Morelos, México, ubicado a 18° 46' 0" N y 98° 59' 0" O y a 1400 m de altitud; con clima cálido subhúmedo, precipitación y temperatura promedio anual de 800 mm y 24 °C. La CA se troceó a un tamaño de partícula de 1.5 a 2.5 cm con una picadora de cuchillas con motor a gasolina de ½ HP (marca Azteca, México).

Obtención de fermentado en estado sólido CF-0 y CF-15

Para obtener el fermentado en estado sólido (FES) CF-0 y CF-15 se usaron 9.200 kg de CA integral oreada 48 h, con volteos cada 8 h, y se mezclaron con 800 g de micelio activado con el hongo *P. sapidus* (CF-0) obtenido de la empresa Prodicet (México). El FES se almacenó en bolsas cerradas de plástico, transparentes, calibre 7, con perforaciones (1 cm), que se mantuvieron a la sombra por 0 (para CF-0) y 15 d

(para CF-15) a 28 °C.

Análisis químicos de CF-0 y CF-15

En CF-0 y CF-15 se evaluó materia seca (MS), proteína total (PT) según AOAC (1995), fibra de detergente neutro (FDN) y ácido (FDA), hemicelulosa (HMCE) de acuerdo con Van Soest *et al.* (1991) y digestibilidad *in vitro* de la MS (DIVMS) con el método de Menke *et al.* (1979).

Extracto enzimático del CF-15

Durante 20 min se maceraron 30 g de CF-15 en un mortero con 45 mL de amortiguador de citrato pH 5.3 y 50 mM, se prensó manualmente y filtró a través de gasa (Ayala *et al.*, 2011). El líquido resultante se centrifugó 20 min (10 000 rpm) a 4 °C, para obtener el extracto enzimático (líquido sobrenadante).

Proteína soluble y actividad enzimática

La proteína soluble se midió con el método de colorimetría de proteína ligada (Bradford, 1976). El estándar fue seroalbumina bovina 0.15 M (SIGMA) disuelta en amortiguador de citrato 50 mM y pH 5.3, la mezcla de reacción fue de 800 mL de extracto enzimático y 200 mL de reactivo de Bradford (Bio-Rad), se agitó vigorosamente en vórtex y después de

5 min se leyó a l 595 nm en un espectrofotómetro (Perkin Elmer UV/VIS, USA).

La actividad enzimática de celulasas y xilanasas se midió con el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) para azúcares reductores (Miller, 1959). En el método para celulasas, modificado por Márquez *et al.* (2007) y Ayala *et al.* (2011), se usa como sustrato carboximetilcelulosa (CMC, viscosidad media; Sigma-Aldrich C4888) al 0.5 % en amortiguador de citrato 50 mM y pH 4.8. En el caso de las xilanasas, según la técnica modificada por Loera y Córdova (2003), se usan como sustrato xilano de avena (Sigma X-0627) a 0.5 % en amortiguador de citrato 50 mM y pH 5.3. La lectura se realizó a l 540 nm con un espectrofotómetro (Perkin Elmer UV/VIS, USA). La actividad enzimática se reportó como unidades internacionales (UI), definidas UI, como la cantidad de enzima que produce un 1 μ mol de azúcares reductores (xilosa o glucosa) por min en las condiciones de la reacción.

La actividad de lacasas se determinó según Bourbonnais *et al.* (1997) con 2, 2' azino-bis 3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico (ABTS) como sustrato 0.1 M en amortiguador de citrato 50 mM y pH 5.3, con una extinción molar de 36 000 $M^{-1} cm^{-1}$. Las mediciones se realizaron cada 30 s por 5 min a l420 nm con un espectrofotómetro (Perkin Elmer UV/VIS, USA), definiendo UI como la cantidad de enzima producida por 1mmol de sustrato oxidado por minuto de reacción.

Ensilaje

El material para ensilar (CAM) consistió de la mezcla de 44 kg de CA integral (tamaño de partícula 2.5 cm), 5 kg de maíz molido, 0.73 kg de urea, 0.26 kg de sales minerales para bovinos (Minelap, phos, LAPISA) y 0.02 kg de sulfato de amonio (Gómez *et al.*, 2011). Para obtener los tratamientos (cuatro repeticiones) se incluyó al CAM 0, 10 y 20 % de CF-15, conservándolos 0, 8 y 16 d en microsilos (1 kg) de bolsa de plástico polietileno negro (calibre 5). La mezcla se compactó y la bolsa se selló herméticamente, y conservó entre 25 a 28 °C. Así, los tratamientos fueron: CAM-0 % d0 (día 0), CAM-10 % d0, CAM-20 % d0, CAM-0 % d8 (día 8), CAM-10 % d8, CAM-20 % d8, CAM-0 % d16 (día 16), CAM-10 % d16, y CAM-20 % d16.

Análisis químicos de los ensilados

Se evaluó FDN, FDA, HMCE (Van Soest *et al.*, 1991), PT y MS (AOAC, 1995), carbohidratos solubles (Dubois *et al.*, 1956), ácido láctico (Tejada, 1985), ácido acético (Erwin *et al.*, 1961), nitrógeno amoniacal (McCullough, 1967), y pH, con potenciómetro (modelo 10 Fisher Scientific, USA) (AOAC, 1995).

Volumen máximo de producción de gas (V_{max} ; $mL g^{-1} MS$)

Los ensilados y CF-15 se deshidrataron y molieron (2 mm). De cada tratamiento se colocó 0.5 g en un frasco de vidrio ámbar y se agregaron 90 mL de inóculo ruminal con flujo continuo de CO_2 . Se usó líquido ruminal de dos novillos canulados, adaptados a una dieta con 60 % de CA integral y 40 % de concentrado comercial para bovinos (18 % PT). Los frascos se cerraron herméticamente y se colocaron en baño maría a 39 °C (Theodorou *et al.*, 1994). Las variables fueron: 1) presión de gas a 0, 1, 2.5, 4, 6, 9, 12, 16, 20, 24, 28, 34, 40, 46, 54, 62 y 72 h de incubación; 2) DIVMS (Menke *et al.*, 1979) a las 72 h. El líquido ruminal fermentado de cada frasco se filtró con papel Whatman # 54 y se deshidrató (60 °C, 24 h) en una estufa de aire forzado. Para calcular el volumen máximo de producción de gas (V_{max} ; $mL g^{-1} MS$) se usó el modelo logístico $VA = V_{max} / (1 + \exp(2-4*s*(t-L)))$ descrito por Schofield y Pell (1995), donde: VA = volumen de gas producido al tiempo t, V_{max} = volumen máximo de gas producido, s = tasa de producción de gas, t = tiempo, y L = tiempo de retardo. Los valores de presión de gas ($kg cm^{-2}$) se transformaron a volumen de gas ($mL g^{-1} MS$) con un modelo de regresión lineal.

Análisis estadístico

Para el FES con CF-0 y CF-15 el diseño experimental fue completamente al azar, con cuatro re-

peticiones por tratamiento y se analizaron con el procedimiento GLM (SAS, 2000), y las medias se compararon con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). El modelo estadístico fue:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

donde, Y_{ij} = variable de respuesta en el i -ésimo tratamiento (CF0, CF-15) y j -ésima repetición (1, 2, 3 y 4); μ = media general; τ_i = efecto del i -ésimo tratamiento; ε_{ij} = error aleatorio.

Para los ensilados el diseño experimental fue de parcelas divididas (Kuehl, 2001), con el siguiente modelo estadístico:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + d_{ik} + \beta_j + g_{jk} + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

donde, Y_{ijk} = variable de respuesta; μ = media general; α = efecto del porcentaje de inclusión de CF-15, $i = 0, 10$ y 20 %; d_{ik} = error asociado al porcentaje de inclusión de CF-15; β = efecto del día de ensilaje; g_{jk} = error asociado al día de ensilaje; $\alpha\beta_{ij}$ = interacción de la inclusión de CF-15 y del día de ensilaje; ε_{ijk} = error general, siendo $k = 1, 2, 3$ y 4 . El análisis de varianza se realizó con el procedimiento GLM (SAS, 2000) y la comparación de medias con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El contenido de humedad de la CA integral disminuyó de 84.74 a 75.99 % después de 48 h de aireación, obteniendo un nivel óptimo para una buena fermentación en estado sólido. Preston *et al.*, (1976) y Pedroso *et al.*, (2008) indican que es importante reducir la humedad a < 80 % para optimizar las condiciones de FES y el crecimiento microbiano. La PT aumentó ($p \leq 0.05$) más de 3 % de CF-0 a CF-15 (Cuadro 1), lo cual se atribuye a la proteína microbiana y enzimas obtenidas del FES (Rajaratnam, 1979; Nair, 1989; Shashirekha *et al.*, 2005). La FDN y FDA aumentaron ($p \leq 0.05$) de 50.18, y 31.80 % en CF-0 a 74.24 y 60.84 % en CF-15, debido a la síntesis de ácidos orgánicos y consumo de carbohidratos solubles por el hongo durante la FES. La hemicelulosa disminuyó ($p \leq 0.05$) 5 % de CF-0 a CF-15, debido a la acción de las xilanasas durante el proceso de fermentación (Schmidt *et al.*, 2007). La DIVMS fue mayor ($p \leq 0.05$) en CF-15 que en CF-0

Cuadro 1. Análisis químico de CF-0 y CF-15 .

Table 1.

Variable (%)	CF-0	CF-15
MS	35.26b \pm 0.50	44.01a \pm 0.91
PT (N \times 6.25)	2.53b \pm 0.42	6.23a \pm 0.33
FDN	50.18b \pm 0.97	74.24a \pm 0.99
FDA	31.80b \pm 0.82	60.84a \pm 1.48
Hemicelulosa	18.38a \pm 0.54	13.40b \pm 0.87
DIVMS	59.10b \pm 0.67	65.08a \pm 0.56

a,b Literales diferentes por fila ($p \leq 0.05$). DIVMS = desaparición *in vitro* de la materia seca; PT = proteína total; MS = materia seca. \pm = error estándar de la media \diamond

x

x

lo cual se puede atribuir a la acción de enzimas fibrolíticas y de lacasas producidas por el hongo (Márquez *et al.*, 2007).

Las actividades enzimáticas en CF-15 fueron 2.08 ± 0.37 para xilanasas, 5.25 ± 0.56 para lacasas y 1.98 ± 0.13 UI g MS⁻¹ para celulasas. Lo anterior difiere de lo observado en bagazo de caña de azúcar y *Pleurotus ostreatus* IE8 en FES de 14 d, de 27.41 para xilanasas, 15.54 para lacasas y 0.96 UI g⁻¹ MS para celulasas (Márquez *et al.*, 2007), así como 20 para xilanasas, 0.06 para lacasas y 0.15 UI g⁻¹ MS para celulasas, en *P. ostreatus* IE8 y bagazo de CA en FES de 15 d (Membrillo *et al.*, 2011). Las actividades enzimáticas en esta investigación con CA integral y *P. sapidus* con 15 d de fermentación fueron menores para xilanasas, lacasas y mayores para celulasas por la especie de hongo, el sustrato contenía menor cantidad de materia seca (35.36 %) y no se realizó un pre-tratamiento de pasteurización o esterilización. Esta última es una actividad común para el desarrollo óptimo del micelio del hongos (Gusakov y Sinitsyn, 1992; Sánchez, 2004).

En los ensilados, la producción de NH₃-N y ácidos orgánicos (acético y láctico) fue mayor ($p \leq 0.05$) al disminuir el porcentaje de inclusión de CF-15, lo que reflejó mayor contenido de carbohidratos solubles. En cambio al incrementar ($p \leq 0.05$) los días de ensilaje disminuyeron los carbohidratos solubles y aumentaron el NH₃-N, ácido láctico y acético. La interacción porcentaje de inclusión y días de ensila-

je fue significativa ($p \leq 0.05$), y el ensilaje de mejor calidad se obtuvo con pH 4.4, 3.2 de carbohidratos solubles, 16.36 de ácido láctico, 14.53 de ácido acético y 6.15 % de NH₃-N (Cuadro 2). Estos datos son congruentes con los modelos de ensilaje con consumo de carbohidratos solubles y producción de ácidos orgánicos (Cañeque y Sancha, 1998) y procesos químico-biológicos por acción de las enzimas de la planta y microorganismos lácticos, que disminuyen el pH y estabilizan el producto ensilado (Schmith *et al.*, 2007). Los resultados del presente estudio son similares a los de Alcántara *et al.*, (1989) y Pedroso *et al.* (2008) con ensilados de CA y diferentes aditivos (NaOH y cultivos bacterianos).

Al incrementar ($p \leq 0.05$) el porcentaje de inclusión CF-15 disminuyó el contenido de FDN y FDA e incrementó la hemicelulosa (Cuadro 3). La interacción porcentaje de inclusión y días de ensilaje fue significativa ($p \leq 0.05$) obteniendo un ensilaje con 20 % de CF-15 a 16 d con mayor FDN, FDA, hemicelulosa y proteína. Estos resultados son similares a los de Pedroso *et al.* (2005), en los que la variación de FDN y FDA en el tiempo de ensilaje está relacionada con los cambios en azúcares solubles. Similarmente en el tratamiento con 20 % de inclusión a 16 d de ensilaje mostró (Cuadro 2) una considerable disminución de los carbohidratos solubles, incrementó de ácidos orgánicos, principalmente ácido láctico, el cual conlleva a disminuir el pH y estabilizar el ensilado.

La DIVMS a las 72 h (Figura 1) fue 69.1 % en

Cuadro 2. Variables fermentativas de los ensilados con CF-15.**Table 2.**

Tratamiento	pH	MS %			
		Carbohidratos solubles	Ácido láctico	Ácido acético	NH ₃ -N
CAM-0 % d0	5.46a ± 0.32	9.14a ± 0.81	6.32e ± 0.88	ND	3.80ef ± 0.87
CAM-10 % d0	5.50a ± 0.15	7.68b ± 0.77	6.09e ± 0.95	ND	4.14e ± 0.32
CAM-20 % d0	5.56a ± 0.41	7.58b ± 0.93	5.58f ± 0.72	ND	3.54f ± 0.18
CAM-0 % d8	4.30b ± 0.19	5.59c ± 0.86	13.54d ± 0.66	12.09d ± 1.12	5.31c ± 0.41
CAM-10 % d8	4.60b ± 0.45	5.32c ± 0.94	13.72d ± 1.03	9.88e ± 1.32	5.21c ± 0.21
CAM-20 % d8	4.70b ± 0.51	4.87d ± 0.73	13.54d ± 0.95	9.55e ± 0.87	5.02d ± 0.16
CAM-0 % d16	4.00c ± 0.34	4.05de ± 0.96	19.44a ± 0.87	20.41a ± 1.43	7.36a ± 0.45
CAM-10 % d16	4.20bc ± 0.27	3.38f ± 0.78	17.71b ± 0.92	18.70b ± 1.65	7.18a ± 0.25
CAM-20 % d16	4.40b ± 0.11	3.20f ± 0.76	16.36c ± 0.82	14.53c ± 1.11	6.15b ± 0.20

a,b,c,d,e,f Literales diferentes por columna ($p \leq 0.05$). ND= no detectable; NH₃-N=nitrógeno amoniacal; \pm =error estándar de la media
 ✦ x

Cuadro 3. Análisis químico de los ensilados con CF-15.**Table 3.**

Tratamiento	% MS			
	FDN	FDA	Hemicelulosa	PT (N x 6.25)
CAM-0%d0	51.61f ± 3.34	31.91f ± 2.54	19.70e ± 1.56	12.62d ± 2.45
CAM-10%d0	51.30f ± 2.67	32.68f ± 3.91	18.62ef ± 3.78	13.11d ± 3.01
CAM-20%d0	50.90g ± 3.76	30.08g ± 4.05	20.82d ± 3.87	13.4cd ± 2.11
CAM-0%d8	59.12d ± 4.01	34.45de ± 4.76	24.67b ± 3.87	14.07c ± 2.65
CAM-10%d8	58.95d ± 2.67	35.29d ± 2.87	23.66bc ± 2.14	14.16c ± 1.89
CAM-20%d8	56.31e ± 4.65	34.05e ± 3.38	22.26c ± 2.89	14.98ab ± 1.59
CAM-0%d16	63.28a ± 5.65	38.90a ± 5.76	24.38b ± 1.54	14.70bc ± 2.76
CAM-10%d16	62.25ab ± 4.88	37.77b ± 3.54	24.48b ± 2.64	14.82bc ± 1.59
CAM-20%d16	61.82c ± 3.35	36.62c ± 4.06	25.20a ± 2.79	15.32a ± 1.42

a,b,c,d,e,f,g Literales diferentes por columna ($p \leq 0.05$). PT = proteína total; \pm = error estándar de la media. ✦
 x

el tratamiento con 20 % de inclusión de CF-15 y 16 d de ensilaje; fue el mayor ($p \leq 0.05$) valor debido a que las enzimas fibrolíticas y lacasas de *P. sapidus* afectaron la pared celular (FDN y FDA) durante la fermentación en estado sólido y coadyuvó en el proceso de ensilaje (Cuadro 2). Estos resultados son similares a los reportados por Dean *et al.* (2005) al incorporar enzimas fibrolíticas (celulasas y hemicelulasas) en en-

silajes de pasto bermuda (*Cynodon dactylon*) y a los observados por Magaña *et al.* (2009) quienes señalan que la DIVMS de caña de azúcar aumenta después de 30 d de ensilaje.

Durante la fermentación *in vitro* el mayor valor ($p \leq 0.05$) de Vmax se obtuvo en el día 16, con 10 y 20 % de CF-15 (203.92 y 207.09 mL 500 g⁻¹ MS), lo cual se puede atribuir a la acción de las enzimas

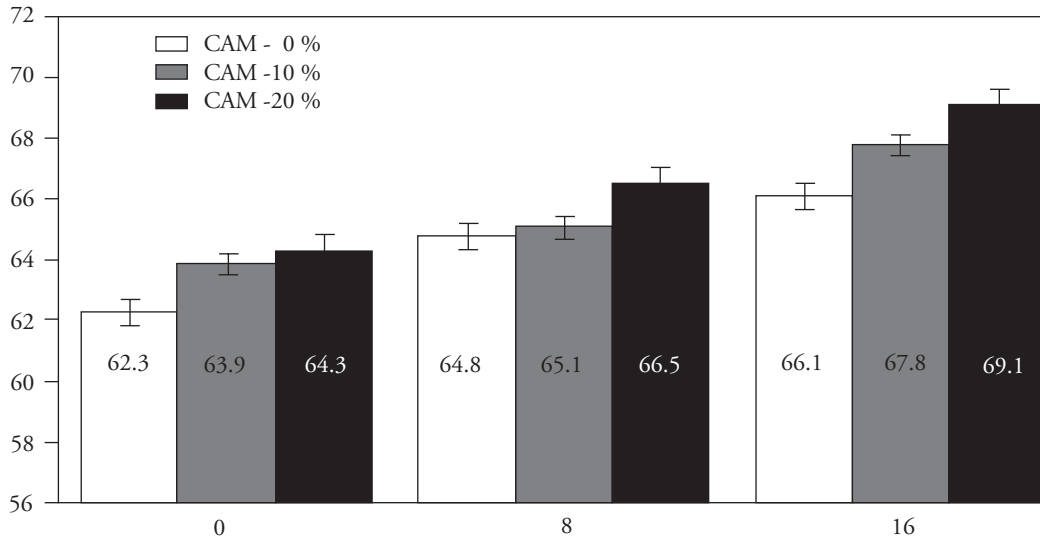


Figura 1. Digestibilidad de la materia seca de ensilados con CF-15 a 72 h de fermentación *in vitro*. \pm = error estándar de la media.
Figure 1.

producidas durante la FES en el producto CF-15, ácidos orgánicos liberados durante el ensilaje (bacterias lácticas) y flora microbiana ruminal que promovieron una mayor disponibilidad de carbohidratos estructurales y solubles de la pared celular (Cuadro 2) del material ensilado. Lo anterior indica que el

ensilaje y la adición del fermentado mejoran la disponibilidad de los componentes nutritivos existiendo un efecto benéfico en los microorganismos ruminales cuando son incorporados en la alimentación de rumiantes (Wallace *et al.*, 2001).

En general las características organolépticas (color

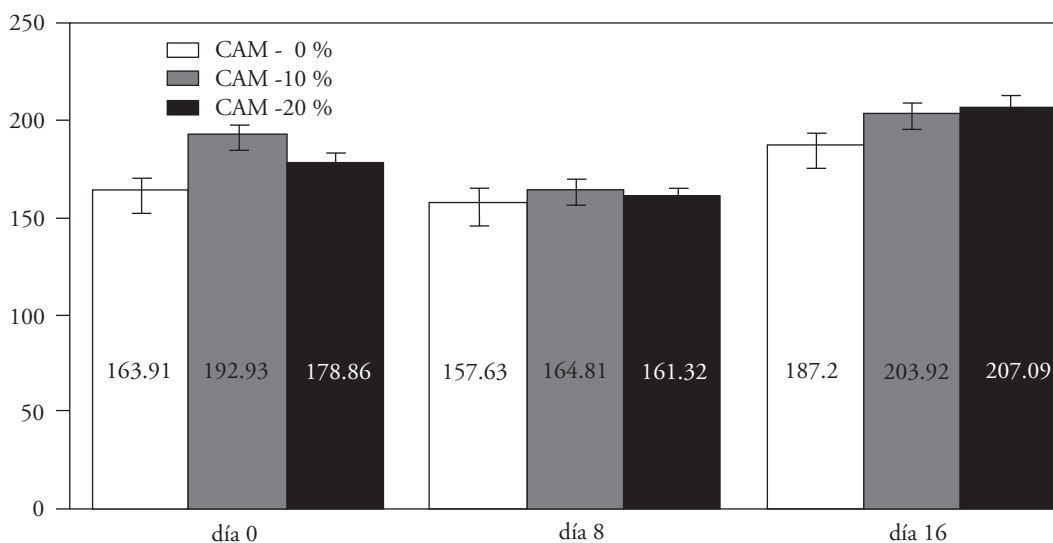


Figura 2. Producción máxima de gas *in vitro* evaluada a 72 h, de ensilados con CF-15. \pm = error estándar de la media.
Figure 2.

verde claro y aroma agradable de fruta madura) de todos los ensilados con CF-15 correspondieron a lo descrito por Cañequé y Sancha, (1998) como ensilados de forrajes de buena calidad.

CONCLUSIONES

La fermentación en estado sólido de caña de azúcar integral con *Pleurotus sapidus* genera un producto con actividad enzimática fibrolítica que promueve el fraccionamiento de compuestos fenólicos, confiere mayor digestibilidad de la fibra y con ello mayor disponibilidad para los microorganismos ruminales. Al incluir 20 % de CF-15 en ensilados de 16 d, disminuye la pérdida de proteína y aumenta la producción de ácido láctico, que estabiliza la fermentación anaerobia y conserva al producto durante el proceso de ensilaje. Por tanto, ensilar productos donde existan procesos biotecnológicos combinados puede ser una alternativa para mejorar la calidad nutricional del producto final que se usará en la alimentación de rumiantes.

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto fue financiado por la línea 7 de inocuidad, calidad de alimentos y bioseguridad, del Colegio de Postgraduados.

LITERATURA CITADA

- Alcántara E., A. Aguilera, R. Elliott, and A. Shimada. 1989. Fermentation and utilization by lambs of sugarcane harvested fresh and ensiled with and without NaOH₄. Ruminant kinetics. Anim. Feed Sci. Technol. 23: 323-331.
- AOAC. 1995. Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th edition. Cunniff, P. Arlington Virginia. USA. 1298 p.
- Ayala M., M., S. S. González M., J. M. Pinos R., C. Vázquez P., M. Meneses M., O. Loera C., and G. D. Mendoza M. 2011. Fibrolytic potential of spent compost of the mushroom *Agaricus bisporus* to degrade forages for ruminants. Afr. J. Microbiol. Res. 5 (3), 241-249.
- Bourbonnais R., M. G. Paice, B. Freiermuth, E. Bodie, and S. Borneman. 1997. Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds. Appl. Environ. Microbiol. 63(12):4627-4632.
- Bradford M., M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-252.
- Cano A., L., E. M. Aranda I., G. D. Mendoza M., J. Pérez P., J. A. Ramos J. 2003. Comportamiento de toretes en pastos tropicales suplementados con caña de azúcar y enzimas fibrolíticas. Téc. Pec. Méx. 41 (2): 153-164.

- Cañeque M. V. y J. L. Sancha S. 1998. Ensilado de Forrajes y su Empleo en la Alimentación de Rumiantes. Ediciones Mundi-Prensa. España. pp:13-20.
- Cuervo L., J. L. Folch, y R. E. Quiroz. 2009. Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol. *Bio Tecnología*. 13:(3):11-25.
- Dean D., B., A. T. Adesogan, N. Krueger, and R. C. Littell. 2005. Effect of fibrolytic enzymes on the fermentation characteristics, aerobic stability, and digestibility of bermuda grass silage. *J. Dairy Sci.* 88: 994-1003.
- Dubois M., K., A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem.* 28(3):350-356.
- Erwin E., S., G. J. Marco, and E. M. Emery. 1961. Volatile fatty acid analysis of blood and rumen fluid by gas chromatography. *J. Dairy Sci.* 44(9):1768-1771.
- Fahey G., C., L. D. Bourquin, E.C. Titgemeyer, and D. G. Atwell. 1993. Postharvest treatment of fibrous feed stuffs to improve their nutritive value. in forage cell wall structure and digestibility. Ed. By Jung, H.G., Buxton, D.R., Hatfield, R.D., and Ralph, J., Proc. Symp. Madison.WI.pp: 715-766.
- Gómez V., A., J. M. Pinos R., J. C. García L., E. de la Cruz L., C. Luna P., R. Sánchez H. 2011. Nutritional value of sugarcane silage enriched with corn grain, urea, and minerals as feed supplement on growth performance of beef steers grazing star-grass. *Trop Anim Health Prod.* 43: 215-220.
- Gusakov A., V., and A. Sinitsyn P.1992. A theoretical analysis of cellulase product inhibition: Effect of cellulase binding constant, enzyme/substrate ratio, and β -glucosidase activity on the inhibition pattern. *Biotechnology and Bioengineering*, 40:663-671.
- Hristov A., N., T. A. McAllister, and K. J. Cheng. 1998. Effect of dietary or abomasal supplementation of exogenous polysaccharide-degrading enzymes on rumen fermentation and nutrient digestibility. *J. Anim. Sci.* 76(12):3146-3156.
- Jalč D., P. Siroka, J. Feješ, and Z. Čerenšňáková. 1999. Effect of three strains of *Pleurotus tuberregium* (Fr). On Chemical composition and rumen fermentation of wheat straw. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 45(6):277-282.
- Kuehl R., O. 2001. Diseño de Experimentos. Principios Estadísticos para el Diseño y Análisis de Investigaciones. 2ª. Ed. Thomson Learning. México. 666 p.
- Loera C., O., and J. Córdova. 2003. Improvement of xylanase production by a parasexual cross between *Aspergillus niger* strains. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 46:177-181.
- Magaña R., J. Aguirre, A. Aguirre, A. Gómez, S. Martínez, C. Lemus, R. Ulloa, and J. Ly.2009. Entire sugar cane or sugar cane residues for fee-

- ding sheep. Performance traits of hairless sheep. Liv. Res. Rural Develop. Vol. 21, Article # 24. <http://www.lrrd.org/lrrd21/2/maga21024>. (Accessed July 2011).
- Márquez A., A., T., G. D. Mendoza M., S. S. González M., S. E. Buntinx D., y O. Loera C. 2007. Actividad fibrolítica de enzimas producidas por *Trametes sp. EUm1*, *Pleurotus ostreatus IE8* y *Aspergillus niger AD96.4* en fermentación sólida. Interciencia. 32 (11):780-785.
- McAllister T., A., S. J. Oosting, J. D. Popp, Z. Mir, L. J. Yanke, A.N. Hristov, R. J. Treacher, and K. J. Cheng. 1999. Effect of exogenous enzymes on digestibility of barley silage and growth performance of feedlot cattle. Can. J. Anim. Sci. 79:353-360.
- McCullough H. 1967. The determination of ammonia in whole blood by direct colorimetric method. Clin. Chem. 17:297-304.
- Membrillo I., C. Sánchez, M. Meneses, E. Favela, and O. Loera. 2011. Particle geometry affects differentially substrate composition and enzyme profiles by *Pleurotus ostreatus* growing on sugar cane bagasse. Bioresource Technol. 102:1581-1586.
- Menke K., H., L. Raab, A. Salewski, H. Stengass, D. Fritz, and W. Scheneider. 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. J Agric Sci. 93: 217-222.
- Miller G., L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31: 426-48.
- Nair N., G. 1989. Tropical mushrooms biological nature and cultivation methods. In: Chang, S. T., and T. H. Quimio (eds). Substrates for Mushroom Production. The Chinese University of Hong Kong. Polydesign Printing Co., Ltd. Hong Kong. pp: 180-192.
- Pedroso A., D., L. G. Nussio, S. D. Paziani, L. D. Reboucas S., M. S. Igarasi, R. M. Coelho, I. H. Packer, J. Horii, and L. H. Gomes. 2005. Fermentation and ephiphytic microflora dynamics in sugar cane silage. Sci. Agric. 62(5):427-432.
- Pedroso A., D., L. G. Nussio, D. R. Santana L., S. F. Paziani, J. L. Ribeiro, L. J. Mari, M. Zopollatto, P. Schmidt, W. R. Soares M., and J. Horii. 2008. Fermentation, losses, and aerobic stability of sugarcane silages treated with chemical or bacterial additives. Sci. agric. 65(6):589-594.
- Preston T., R., C. Hinojosa, y L. Martin. 1976. Ensilaje de la caña de azúcar con amoniaco, miel y ácidos minerales. Prod. Anim. Trop.1:124-131.
- Rajaratnam S., D. B. Wankhede, and M. V. Patwardhan. 1979. Some chemical and biochemical changes in straw constituents during the growth of *Pleurotus flabellatus* (Berk & Br.) Sacc. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 8:125-134.
- Sánchez C. 2004. Modern aspects of mushroom cul-

- ture technology. *Appl. Microbiol.* 64:756-762.
- SAS. SAS/STAT. 2000. Guide for personal computer. Vers. 8. SAS Institute Cary, NC. USA.
- Schofield P., and A. N. Pell. 1995. Measurement and kinetic analysis of the neutral detergent-soluble carbohydrate fraction of legumes y grasses. *J. Anim. Sci.* 73:3455-3463.
- Shashirekha M., N., S. Rajarathnam, and Z. Bano. 2005. Effects of supplementing rice Straw growth substrate with cotton seeds on the analytical characteristics of the mushroom, *Pleurotus florida* (Block y Tsao). *Food Chem.* 92:255-259.
- Schmidt P., L. J. Mari., L. G. Nussio, A. D. Pedroso E., S.de F. Paziani, e F. S. Wechsler. 2007. Aditivos químicos e biológicos na ensilagem de cana-de-açúcar. Composição química das silagens, ingestão, digestibilidade e comportamento ingestivo. *R. Bras. Zootec.* 36(5):1666-1675.
- Tejada I. 1985. Manual de laboratorio para análisis de ingredientes utilizados en la alimentación animal. Patronato de Apoyo a la Investigación y Experimentación Pecuaria en México, A.C. México. D.F. México. 387 p.
- Theodorou M., K., B. A. Williams, M. S. Dhanoa, A. B. McAllan, and J. France. 1994 A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Tech.* 48: 185-197.
- Van Soest P., J., J. B. Robertson and B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy. Sci.*, 74: 3583-3597.
- Wallace R., J., S. J. Wallace, N. Mckain, V. L. Nsereko, and G. F. Hartnell. 2001. Influence of supplementary fibrolytic enzymes on the fermentation of corn and grass by mixed ruminal microorganisms *in vitro*. *J. Anim. Sci.* 79: 1905-1916.