



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

Producción de extractos enzimáticos a partir de
Fomes sp. EUM1 y su evaluación en condiciones ruminales

Tesis que para obtener el grado de
DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

M. C. Oscar Arce Cervantes

Director de Tesis:

Dr. Octavio Loera Corral

México D.F., Octubre 2012.

“El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Padrón Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y además cuenta con apoyo del mismo consejo”

Esta tesis se realizó bajo la dirección del Dr. Octavio Loera Corral, Dr. Germán David Mendoza Martínez y Dr. Marcos Meneses Mayo. Asimismo, los autores expresamos nuestro agradecimiento al Dr. Luis Alberto Miranda de la Universidad Autónoma Chapingo.

Al CONACyT por la beca otorgada para los estudios de Doctorado así como también por la beca mixta para realizar una estancia de investigación en la Facultad de Veterinaria en la Universidad de Murcia, España.

México D.F., a 19 de Octubre de 2012

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis:

“Producción de extractos enzimáticos a partir de *Fomes* sp. EUM1 y su evaluación en condiciones ruminales.”

Que presentó: M. C. Oscar Arce Cervantes

COMITÉ TUTORIAL

Director: Dr. Octavio Loera Corral

Asesor: Dr. Marcos Meneses Mayo

Asesor: Dr. Germán David Mendoza Martínez

JURADO

Presidente: Dr. Germán David Mendoza Martínez

Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco

Secretario: Dr. Isaac Almaraz Buendía

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Vocal: Dr. Marcos Meneses Mayo

Universidad Anáhuac, México-Norte.

Vocal: Dr. Armando Peláez Acero

Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

Dedicatoria

Gracias a Dios, por hacer posible todo esto.

*A Silvia y Eduardo por ser mi principal motivación,
gracias por ser parte de mi vida, los amo.
Ustedes me dan la fortaleza necesaria para seguir adelante.*

*A mis padres Margarita y Venancio por haberme dado la vida,
inspirar esos deseos de superación que siempre vi en ustedes,
gracias por el apoyo y por creer en nosotros, este logro es suyo.*

*A mis hermanitos, Isra, Jesús y Azúcena, Venancio y Aurora,
sin ustedes no lo hubiera conseguido, este logro también es de ustedes.*

*A las fuerzas básicas, mis sobrinos, Jesús, Fernando y al nuevo Arce Hernández
son una bendición en nuestras vidas.*

El aprendizaje es experiencia, todo lo demás es sólo información

Albert Einstein

Agradecimientos

Es complicado recordar a todas las personas que contribuyeron de alguna manera en la realización de esta tesis, por lo que espero no olvidar a nadie, y si así fuera mi sincero agradecimiento a todos.

Quiero agradecer de manera muy especial al Dr. Octavio Loera Corral por la oportunidad de ser parte de su equipo de trabajo, por haber creído en mí y haber dirigido esta tesis, por sus consejos y apoyo incondicional, pero sobre todo gracias por su amistad.

Agradezco al Dr. Germán Mendoza y al Dr. Luis Alberto Miranda por el apoyo y sugerencias realizadas durante el desarrollo de esta tesis, por haber contribuido de manera muy importante en mi formación y en este documento, además de ofrecerme su amistad.

Al Dr. Marcos Meneses, Dr. Isaac Almaraz, Dr. Armando Peláez por sus comentarios y contribución para la mejora de este documento.

A la Dra. María Dolores Megías Rivas y Dr. Antonio Martínez Teruel por haber permitido trabajar en su laboratorio (UMU), por haberme asesorado y por el apoyo tan importante que me brindaron durante mi estancia, sin su apoyo no hubiera sido posible.

Recordando que la amistad es muy valiosa hago mención a mis compañeros y amigos de batalla del w104, gracias por la compañía y por haber hecho tan agradable y divertido mi paso por el laboratorio, ahora merecidamente Doctores; Ordaz, Paul, Robert, Erick, Richard, Saúl, Isabel y Núñez.

Por supuesto, agradecer también a los nuevos valores que continúan la historia del w104, Jazmín, Miranda, Noemí, Cuapio, Porcayo, David, Gerardo y Francisco Javier, gracias por apoyarme y por compartir tantos momentos conmigo.

Casa abierta al tiempo

RESUMEN

En este estudio se evaluó la capacidad del hongo termotolerante *Fomes* sp. EUM1 para crecer en cultivo superficial utilizando 13 diferentes subproductos agrícolas. Se encontró que es capaz de crecer y producir enzimas lignocelulolíticas en un intervalo de pH de 4.5 a 7.4. A los 7 días de cultivo en cajas Petri se obtuvo el extracto crudo enzimático y se determinó la producción enzimática. De los subproductos evaluados, el rastrojo de maíz promovió la mayor producción de celulasas y lacasas siendo de 18.3 y 0.9 UI mL⁻¹, respectivamente. La mayor producción de xilanasas fue en la paja de cebada (26 UI mL⁻¹), sin embargo, la producción de lacasas fue la más baja (0.4 UI mL⁻¹) además presentó el menor diámetro de crecimiento ($P < 0.05$).

A partir de lo anterior, se determinó la producción de enzimas lignocelulolíticas por el hongo termotolerante *Fomes* sp. EUM1 en cultivos sólidos usando como sustrato únicamente rastrojo de maíz (Rm), así como suplementado con 20% de salvado de trigo (Rm:St). Esta suplementación aumentó ($P < 0,05$) la producción de xilanasas (160 UI g ms⁻¹), a los 5 días de cultivo. Las celulasas no mostraron diferencias en la producción al quinto día de cultivo, para Rm y Rm:St, 33 y 37 UI g ms⁻¹, respectivamente; sin embargo, el agregar salvado de trigo originó una disminución menor en la actividad, al día 6. La actividad de lacasas alcanzó una producción de 3 UI gms⁻¹ al utilizar el Rm:St, manteniendo este nivel de producción hasta al día 7 de cultivo. Por otra parte; los ensayos de estabilidad (39 °C y pH 6), medida como tiempo de vida media ($t_{1/2}$), de los extractos crudos enzimáticos para estas tres enzimas evaluadas, mostraron que el $t_{1/2}$ para las celulasas y xilanasas no mostraron diferencias significativas ($P > 0.05$) para ambos sustratos; mientras que para las lacasas se observaron diferentes patrones de $t_{1/2}$, alcanzando a duplicarse para el Ext Rm:St (26.6 h).

Ambos extractos de *Fomes* sp. EUM1 y un producto enzimático comercial (Fibrozyme®) se utilizaron en diferentes forrajes como el rastrojo de maíz, bagazo de caña y heno de alfalfa, para medir la digestibilidad y producción de gas *in vitro*. La tasa fraccional de producción de gas (FR; mL g⁻¹ h⁻¹) aumentó ($P < 0,05$) a las 9 h en rastrojo de maíz comparada con el tratamiento sin enzimas. El uso de enzimas siempre favoreció un mayor volumen de gas máximo (Vm, h⁻¹) en el bagazo de caña. La digestibilidad *in vitro* (DIV) del rastrojo de maíz aumentó (12%) con respecto al control, al usar el producto comercial, mientras que los extractos enzimáticos originados por *Fomes* sp. EUM1, en rastrojo de maíz y rastrojo de maíz con salvado de trigo mostraron un incremento en la digestibilidad del 16 y 21% ($P < 0,05$), respectivamente, lo que sugiere una mayor especificidad de estas enzimas producidas en el mismo sustrato (Rm). Además de la estabilidad probada, la

versatilidad de los extractos de Rm y Rm:St fue confirmada por el aumento en los valores de digestibilidad *in vitro* para bagazo de caña (hasta 100%) en relación con el testigo sin enzimas.

De los resultados obtenidos en las pruebas *in vitro*, se evaluó el efecto del extracto crudo enzimático (Ext Rm:St) producido mediante fermentación en estado sólido por el hongo *Fomes* sp. EUM1, en la digestibilidad y comportamiento productivo de corderos, alimentados con una dieta forraje:concentrado de 60:40. El hongo se cultivó (6 d) y se midió la actividad enzimática alcanzada, siendo de 169 UI g ms⁻¹, 50 UI g ms⁻¹ y 4 UI g ms⁻¹, para xilanasas, celulasas y lacasas, respectivamente. Para la prueba *in vivo* se utilizaron 18 corderos Suffolk x criollos con un peso inicial (PI) de 20 kg ± 0.5 por 58 días. Los tratamientos consistieron en tres dosis del Ext Rm:St por kg de materia seca de rastrojo de maíz: 0, 60 y 120 mL, asperjado al forraje 24 h antes de ser proporcionado. Los corderos se pesaron cada 14 días. En el día 58 se tomaron muestras de líquido ruminal para determinar ácidos grasos volátiles (AGV) y la actividad enzimática. No se encontraron diferencias (P>0.05) entre tratamientos por efecto de la dosis enzimática en el consumo de MS, MO, FDN y FDA. Por otra parte, la ganancia diaria de peso presentó un efecto lineal (P <0.08) positivo al uso del Ext Rm:St. La digestibilidad de la MS, FDN y FDA presentaron incremento con la dosis media de extracto enzimático (efecto cuadrático, P<0.05). La proporción de ácido butírico también se incrementó con la dosis de 120 mL kg⁻¹ MS (efecto cuadrático, P<0.05). La actividad de celulasas en el líquido ruminal presentó un incremento lineal (P<0.05) en función de la dosis de extracto. El Ext Rm:St del basidiomiceto termotolerante *Fomes* sp. EUM1 favorecieron la actividad celulolítica en el líquido ruminal, manifestándose una mayor ganancia de peso en los corderos a mayor dosis de enzima.

Con los resultados anteriores se muestra que los extractos enzimáticos obtenidos de *Fomes* sp. EUM1 son una alternativa para su uso sobre residuos lignocelulósicos, enfocándose al tratamiento previo de los forrajes para su inclusión a la dieta. El aporte de enzimas fibrolíticas lo mantienen como alternativa para su uso en la alimentación animal, debido a que posiblemente aumente los sitios de unión a las fibras por parte de las bacterias ruminales.

ABSTRACT

This study evaluated the ability of *Fomes* sp. EUM1, a previously identified thermotolerant fungal strain, to grow in superficial culture media, in Petri dishes, using 13 different agricultural by-products. The strain produced lignocellulolytic enzymes in a range of pH from 4.5 to 7.4. From the substrates tested, corn stover promoted the highest production of cellulases and laccases with an activity of 18.3 and 0.9 IU mL⁻¹, respectively. The maximal xylanase production was in barley straw (26 IU mL⁻¹), however, the laccase production was the lowest (0.4 IU mL⁻¹), in addition to the lowest growth with diameter 5.5 cm after 7 days (P<0.05).

These results suggested that lignocellulolytic enzymes can be produced by the thermotolerant fungus *Fomes* sp. EUM1 in solid substrates using corn stover substrate only (Rm) and supplemented with 20% wheat bran (Rm:St). The supplementation increased (P<0.05) the xylanase production (160 IU g ms⁻¹) after 5 days of culture. Cellulases showed no difference in the production on the fifth day of culture, for Rm and Rm: St, 33 and 37 IU g ms⁻¹, respectively; however the addition of wheat bran caused a decrease in activity on day 6. Laccase activity reached a production of 3 IU g ms⁻¹ with the Rm: St, maintaining this level of production until day 7 of culture. Moreover, the stability tests at 39 °C and pH 6, measured as half-life ($t_{1/2}$) of the crude enzyme extracts for these three enzymes showed that those $t_{1/2}$ for cellulases and xylanases did not showed significant differences (P>0.05) for both substrates, while for laccases different patterns were observed for $t_{1/2}$, in fact this value was doubled in extracts from Rm Ext: St (26.6 h).

Both extracts from *Fomes* sp. EUM1 and a commercial enzyme product (Fibrozyme®) were used in different forages as corn stover, bagasse and alfalfa hay to measure ruminal digestibility and gas production *in vitro*. The fractional rate of gas production (FR; mL g⁻¹ h⁻¹) increased (P<0.05) at 9 h in corn stover compared with treatment without enzymes. The use of enzymes always favored a higher maximum gas volume (Vm, h⁻¹) in the bagasse. The *in vitro* digestibility (IVD) of corn stover increased (12%) compared to the control, using the commercial product; whereas the enzymatic extracts obtained by *Fomes* sp. EUM1 in corn stover and corn stover-wheat bran showed an increase in the digestibility of 16 and 21% (P<0.05), respectively, suggesting a higher specificity of these enzymes produced on the same substrate (Rm). Besides proven stability, versatility extracts Rm and Rm:St was confirmed by the increase in the *in vitro* digestibility values for bagasse (100%) compared to the untreated enzymes.

From the results obtained in these *in vitro* tests, effects of the crude enzyme extract (Ext Rm:St) produced by solid state fermentation were evaluated using animals *in vivo*, measuring both digestibility and productive performance of lambs fed a forage: concentrate 60:40. The fungus was grown (6 d) and enzyme activity was measured being 169 IU g ms⁻¹, 50 IU g ms⁻¹ and 4 IU g ms⁻¹ for xylanases, cellulases and laccases, respectively. For these experiments during for 58 days, 18 Criollos x Suffolk lambs were used, weighing initial (PI) of 20 ± 0.5 kg. Treatments consisted of three doses of Rm Ext: St per kg of dry corn stover: 0, 60 and 120 mL, which were sprayed to the fodder 24 h before being provided. The lambs were weighed every 14 days. On day 58 samples were taken to determine rumen fluid volatile fatty acids (VFA) and enzymatic activity. No differences (P>0.05) among treatments for enzymatic dose effect on consumption of DM, OM, NDF and ADF. Moreover, lambs the average daily gain showed a linear effect (P<0.08) positive use Ext Rm: St. The digestibility of DM, NDF and ADF increased with the average dose of enzyme extract (quadratic effect, P<0.05). The proportion of butyric acid also increased with the dose of 120 mL kg⁻¹ DM (quadratic effect, P<0.05). The cellulase activity in the rumen fluid showed a linear increase (P<0.05) depending on the dose of extract.

With the above results show that the enzymatic extracts obtained from *Fomes* sp. EUM1 are an alternative for use on lignocellulosic residues, focusing the pretreatment of fodder for inclusion to the diet. The contribution of fibrolytic enzymes alternatively kept for use in animal feed because it may increase the binding sites to the fibers by ruminal bacteria.

Contenido

1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	4
2.1. Hongos de podredumbre blanca.....	4
2.1.1. <i>Fomes</i>	4
2.2. Cultivo en medio sólido.....	8
2.2.1. Subproductos agrícolas.....	9
2.3. Lignocelulosa y enzimas lignocelulolíticas.....	12
2.3.1. Celulosa.....	12
2.3.2. Celulasas.....	13
2.3.3. Hemicelulosa.....	15
2.3.4. Xilanasas.....	16
2.3.5. Lignina.....	17
2.3.6. Lacasas.....	18
2.4. Suplementación de enzimas en la alimentación animal.....	21
2.4.1. Pruebas de digestibilidad.....	23
3. Justificación.....	25
4. Hipótesis.....	26
5. Objetivos.....	27
6. Metodología.....	28
6.1. Microorganismo.....	28
6.2. Propagación y conservación.....	28
6.3. Cultivo superficial de <i>Fomes</i> sp. EUM1.....	29
6.4. Longitud de crecimiento y obtención del extracto crudo enzimático.....	30
6.5. Determinación de las actividades enzimáticas.....	30
6.6. Producción de inóculo y cultivo en medio sólido (CMS).....	33
6.7. Extracción de enzimas del cultivo en medio sólido.....	34
6.8. Estabilidad enzimática.....	35

6.9. Evaluación de extractos crudos enzimáticos <i>in vitro</i>	35
6.10. Producción de gas <i>in vitro</i>	37
6.11. Producción de extractos lignocelulolíticos	38
6.12. Respuesta productiva <i>in vivo</i> y digestibilidad de la materia seca.....	39
6.13. Líquido ruminal, determinación de ácidos grasos volátiles y nitrógeno amoniacal.....	41
6.14. Determinaciones enzimáticas del líquido ruminal	42
6.15. Análisis estadístico	42
7. Resultados y Discusión.....	43
7.1. Producción de enzimas lignocelulolíticas en cultivo superficial.....	43
7.1.1. Rastrojo y pajas de cereales.....	43
7.1.2. Mezclas de pajas y ensilados	46
7.1.3. Subproductos agrícolas	48
7.2. Producción de enzimas lignocelulolíticas en cultivo en medio sólido.....	50
7.2.1. Cinética de estabilidad de enzimas lignocelulolíticas.....	58
7.3. Producción de gas y digestibilidad <i>in vitro</i>	64
7.3.1. Tasa fraccional de producción de gas de rastrojo de maíz	64
7.3.2. Tasa fraccional de producción de gas de rastrojo bagazo de caña.....	68
7.3.3. Tasa fraccional de producción de gas de heno de alfalfa	71
7.3.4. Digestibilidad <i>in vitro</i> de los forrajes.....	72
7.4. Extractos enzimáticos de <i>Fomes</i> sp. EUM1 para pruebas <i>in vivo</i>	78
7.4.1. Pruebas de digestibilidad de la materia seca.....	81
7.4.2. Variables en líquido ruminal y actividades enzimáticas en rumen	87
8. Conclusiones.....	91
9. Perspectivas.....	93
10. Referencias.....	94

Índice de Figuras

Figura 1. Crecimiento de <i>Fomes fomentarius</i> en madera.	6
Figura 2. <i>Fomes</i> sp. EUM1 sobre orujo de oliva y rastrojo de maíz.	7
Figura 3. Vista esquemática de la hidrólisis de la celulosa.	14
Figura 4. Representación esquemática de la hidrólisis de la hemicelulosa.	16
Figura 5. Mecanismo de oxidación de la lignina por lacasas.	19

Índice de cuadros

Cuadro 1. Actividad de extractos enzimáticos a actividad xilanólítica.	36
Cuadro 2. Composición química y dieta basal de los ingredientes.	40
Cuadro 3. Actividad enzimática de <i>Fomes</i> sp. EUM1 sobre diferentes sustratos.	44
Cuadro 4. Actividad enzimática de <i>Fomes</i> sp. EUM1.	47
Cuadro 5. Actividad enzimática de <i>Fomes</i> sp. EUM1 sobre diferentes subproductos agrícolas.	48
Cuadro 6. Producción de gas <i>in vitro</i> y evaluación de la DIVMS de forrajes con diferentes extractos enzimáticos.	74
Cuadro 7. Actividades enzimáticas (UI gss ⁻¹) del extracto de <i>Fomes</i> sp. EUM1.	79
Cuadro 8. Consumo de alimento de los tratamientos con diferentes dosis de extractos crudos enzimáticos (g día ⁻¹).	82
Cuadro 9. respuesta de corderos alimentados con una dieta alta en forraje (60:40) tratadas con extractos enzimáticos de <i>Fomes</i> sp. EUM1.	84
Cuadro 10. Variables de fermentación y actividades enzimáticas en líquido ruminal de corderos alimentados con una dieta alta en forraje (60:40) recibiendo dosis de ECE de <i>Fomes</i> sp. EUM1.	88

Índice de Gráficos

Gráfico 1. Producción de celulasas sobre rastrojo de maíz (Ext Rm) y suplementado con 20% de salvado de trigo (Ext Rm:St).	51
Gráfico 2. Producción de xilanasas sobre rastrojo de maíz (Ext Rm) y suplementado con 20% de salvado de trigo (Ext Rm:St).	53

Gráfico 3. Producción de lacasas sobre rastrojo de maíz (Ext Rm) y suplementado con 20% de salvado de trigo (Ext Rm:St).....	54
Gráfico 4. pH de extractos de rastrojo de maíz (Ext Rm) y rastrojo de maíz con salvado de trigo (Ext Rm:St).....	57
Gráfico 5. Estabilidad de celulasas del extracto enzimático obtenido de <i>Fomes</i> sp. EUM1 sobre rastrojo de maíz (Ext Rm) y rastrojo de maíz suplementado con 20 % de salvado de trigo (Ext Rm:St).....	60
Gráfico 6. Estabilidad de xilanasas del extracto enzimático obtenido de <i>Fomes</i> sp. EUM1 sobre rastrojo de maíz (Ext Rm) y rastrojo de maíz suplementado con 20 % de salvado de trigo (Ext Rm:St).....	61
Gráfico 7. Estabilidad de lacasas incubadas a 39 °C a pH 7, del extracto enzimático obtenido de <i>Fomes</i> sp. EUM1.	63
Gráfico 8. Tasa fraccional de producción de gas <i>in vitro</i> del rastrojo de maíz con diferentes extractos enzimáticos. Ext RM, extracto de rastrojo de maíz; Ext Rm:St, extracto de rastrojo de maíz con salvado de trigo.	65
Gráfico 9. Tasa fraccional de producción de gas <i>in vitro</i> del bagazo de caña con diferentes extractos enzimáticos..	69
Gráfico 10. Tasa fraccional de producción de gas <i>in vitro</i> de heno de alfalfa con diferentes extractos enzimáticos..	71

1. Introducción

Los sistemas de producción de baja intensidad de rumiantes predominan en países en desarrollo y se caracteriza por utilizar forrajes de mediana a baja calidad, ricos en fibra y por lo tanto en pared celular vegetal (González *et al.*, 2003). La proporción de pared celular y la concentración de la lignina incrementan con la madurez de los forrajes lo que ocasiona baja digestibilidad (Van Soest *et al.*, 1991). En México, los sistemas de alimentación para rumiantes están basados en forrajes como las gramíneas, leguminosas y los esquilmos agrícolas. Estos materiales presentan más del 30% de fibra, una proteína menor al 7% y su digestibilidad es menor del 55%, aunque tiene un potencial energético para la alimentación de rumiantes (Ziin y Ware, 2002).

Generalmente son abundantes los materiales de desecho con potencial de bioconversión que contienen una alta proporción de lignocelulosa. Esta fuente renovable de materia orgánica puede ser transformada por métodos químicos (hidrólisis con ácidos y bases) y biológicos (hidrólisis enzimática y cultivo de microorganismos) en productos de interés industrial como biocombustibles, enzimas, azúcares simples, metabolitos secundarios y proteína celular (Howard *et al.*, 2003; Tengerdy y Szakacs, 2003).

A través de la biotecnología se han desarrollado productos que mejoran la utilización de la fibra por los animales rumiantes. Entre los aditivos para aumentar la digestibilidad de los alimentos lignocelulósicos, son las enzimas exógenas fibrolíticas,

las cuales al agregarse pueden mejorar la utilización de los polisacáridos de los forrajes (Pinos-Rodríguez *et al.*, 2002; Beauchemin *et al.*, 2003; Colombatto *et al.*, 2003).

Las enzimas lignocelulolíticas exógenas comerciales son comúnmente producidas por cultivo en medio sólido y cultivo en medio líquido, utilizando hongos como *Aspergillus oryzae*, *A. niger*, *Trichoderma reesei* y *T. viride* (Loera y Villaseñor-Ortega, 2006). Las actividades reportadas para los productos enzimáticos comerciales son considerablemente altas debido a que la actividad de estas enzimas se mide de acuerdo a las recomendaciones del fabricante (60 °C y pH 4 a 5), sin embargo, tales condiciones no son similares al ambiente ruminal (Coughlan y Ljungdahl, 1998).

Dentro de los microorganismos que producen enzimas lignocelulolíticas están los hongos de podredumbre blanca. Algunos de estos basidiomicetos con interés biotecnológico por su resistencia a sustancias recalcitrantes se encuentran reportados *Trametes versicolor*, *Bjerkandera adusta*, *Pleurotus ostreatus* y *Fomes fomentarius* (Rodrigues *et al.*, 2008; Papinutti *et al.*, 2008). Estos hongos crecen sobre sustratos lignocelulósicos debido a su capacidad de producir enzimas hidrolíticas y oxidativas (Da Silva *et al.*, 2005; Elisashvili *et al.*, 2006), las cuales alteran los componentes de la pared celular, aumentando la calidad de los sustratos lignocelulósicos en la alimentación de los rumiantes (Peláez-Acero *et al.*, 2008).

La cepa termotolerante *Fomes* sp. EUM1 identificado por técnicas de biología molecular por Ordaz *et al.*, (2012), es capaz de crecer a temperaturas de hasta 40 °C en sustratos como el rastrojo de maíz y producir enzimas como xilanasas, celulasas y lacasas en fermentación en estado sólido (Ordaz, 2008). El hongo *Fomes* sp. EUM1 aumentó la adherencia microbiana de las bacterias ruminales a la paja de sorgo (Villegas-Castañeda *et al.*, 2010).

Sin embargo, el extracto crudo enzimático (ECE) producido por este hongo no se ha evaluado en producción de gas *in vitro* ni en pruebas *in vivo*. Por lo tanto, en este trabajo se determinó el crecimiento y la producción de enzimas lignocelulolíticas (celulasas, xilanasas y lacasas) por el Basidiomiceto *Fomes* sp. EUM1 en cultivo superficial utilizando 13 subproductos agrícolas. De lo anterior, se trabajó con extractos crudos enzimáticos de *Fomes* sp. EUM1 a partir de cultivo en estado sólido sobre rastrojo de maíz y una mezcla de rastrojo de maíz con salvado de trigo. Posteriormente, el ECE exógeno se adicionó a tres forrajes y se evaluó la producción de gas *in vitro* y la digestibilidad la materia seca. Finalmente, el ECE se agregó a rastrojo de maíz y se evaluó la respuesta productiva de corderos, la digestibilidad de la materia seca y cambios en variables ruminales de corderos.

2. ANTECEDENTES

2.1. Hongos de podredumbre blanca

La biodegradación de la lignina es un paso clave en el reciclado del carbono, los hongos de podredumbre blanca son conocidos como eficientes degradadores de lignocelulosa debido a su capacidad para sintetizar diferentes complejos enzimáticos como las celulasas, xilanasas y lacasas (Baldrian y Gabriel, 2003; Elisiashvili *et al.*, 2006).

La utilización de hongos de podredumbre blanca, productores de enzimas lignocelulolíticas, para mejorar la degradación de compuestos fibrosos, generalmente residuos de cosecha, ha presentado resultados de digestibilidad positivos en condiciones *in vitro*, tendiendo a ser enfocada a la utilización de hongos como *Trametes versicolor*, *Bjerkandera adusta*, *Fomes fomentarius* y *Pleurotus ostreatus*, los cuales sugieren un potencial grande de los hongos de podredumbre blanca para alterar los componentes de la estructura de la pared celular (Rodrigues *et al.*, 2008; Papinutti *et al.*, 2008; Peláez-Acero *et al.*, 2008).

2.1.1. *Fomes*

La clasificación taxonómica de los hongos incluye aspectos morfológicos del micelio, tipo de reproducción y naturaleza de las esporas. Los hongos denominados de podredumbre blanca se encuentran dentro de la división de los basidiomicetos (Eumycota), que de acuerdo a Herrera y Ulloa (2004), el género *Fomes* tienen la siguiente clasificación:

- Reino: Fungi
- División: Eumycota
- Subdivisión: Basidiomycota
- Clase: Holobasidiomycetes
- Subclase: Hymenomycetidae
- Orden: Polyporales
- Familia: Polyporaceae
- Género: *Fomes*

Este género es de gran importancia económica, se localiza principalmente en América del norte o Europa, y es de un color marrón, gris o beige. Comprende especies saprobias y fitopatógenas, comestibles y tóxicas; además, muchas de ellas son lignícolas y causan pudrición en la madera. Cuando destruye sólo la celulosa ocasionan la llamada pudrición parda, cuando atacan tanto la celulosa como a la lignina produce la pudrición blanca (Campbell, 1938).

El género *Fomes* incluye especies lignícolas con la fructificación en forma de repisa aplanada, de concha o de casco de caballo (ungulada), leñosa y perene, de contexto moreno castaño, claro u oscuro desde las fases juveniles (Figura 1). La mayoría de las especies del género *Fomes* son mesofílicas con temperaturas óptimas de crecimiento entre los 20 y 36 °C, siendo pocas especies reportadas como termotolerantes (Campbell, 1938).



Figura 1. Crecimiento de *Fomes fomentarius* en madera.

(<http://www.rogersmushrooms.com/gallery/DisplayBlock~bid~5928.asp>)

Dado lo anterior, se obtuvo un aislado a partir de 6 hongos basidiomicetos termofílicos productores de lacasas. Este microorganismo fue seleccionado (hongo EUM1) debido a que al incubarlo a 40 °C durante 2 días, presentó los halos más grandes de oxidación del ABTS por debajo de la colonia, lo que indica la producción de lacasas (Medina 2003).

Posteriores trabajos cultivando *Fomes* sp. EUM1, anteriormente llamado *Trametes* sp. EUM1, permitieron detectar la actividad de lacasas en cultivo de hojuelas de salvado de trigo (3%). Además, Medina (2003), evaluó los extractos enzimáticos a pruebas de pH, siendo su actividad óptima a pH de 4, así como ser estable en un rango de pH (4 a 10) durante una hora, conservando casi el 100% de la actividad de lacasas.

Por otra parte; mediante cultivo líquido del hongo, Márquez (2006) encontró que de la expresión de dos isoformas de lacasas al menos una es termoestable a 70 °C,

conservando hasta un 35% de su actividad después de una hora. Asimismo, identificó por medio de técnicas de biología molecular un fragmento de 324 pb que corresponde a un gen de lacasas.

La realización de trabajos en cultivo en estado sólido mostraron la capacidad de *Fomes* sp. EUM1 de crecer sobre diferentes sustratos. Se encontró que produce enzimas lignocelulolíticas sobre paja de avena y rastrojo de maíz (Ordaz, 2008), en bagazo de caña (Márquez- Araque *et al.*, 2007) y en una mezcla de rastrojo de maíz con salvado de trigo, como única fuente de carbono (Méndez, 2010). Esta producción enzimática se evaluó en diferentes rangos de temperatura, desde los 25 °C hasta los 45 °C. Lo que permite considerarlo para la producción de enzimas con aplicación comercial, particularmente como extractos crudos enzimáticos exógenos para la alimentación de rumiantes. En la Figura 2 se muestra el crecimiento vegetativo de *Fomes* sp. EUM. 1 en cajas de Petri (Orujo de oliva y rastrojo de maíz, lado derecho).



Figura 2. Crecimiento de *Fomes* sp. EUM1 sobre orujo de oliva y rastrojo de maíz. (Tomada 2012).

2.2 Cultivo en medio sólido

El cultivo en medio sólido (CMS) es una técnica que reproduce los procesos naturales como el compostaje y el ensilado microbiológico. El CMS se define como un proceso de fermentación que ocurre en ausencia (o cercana ausencia) de agua libre, utilizando ya sea un soporte natural o un soporte inerte (Pandey *et al.*, 2000). Éste ofrece numerosas oportunidades en el proceso de residuos agrícolas. Debido a que los procesos de cultivo sólido presentan bajos requerimiento energéticos, producen menor agua residual, bajos costos de producción, se obtienen productividades más altas y se disminuyen los efectos de inhibición por sustrato (Pandey, 2003; Viniegra-González *et al.*, 2003).

La producción de enzimas es un campo cada vez mayor de la biotecnología y el CMS se ha mostrado particularmente adecuado para la producción de enzimas por hongos filamentosos (Pandey *et al.*, 1999). No obstante, la producción de enzimas extracelulares fúngicas por diferentes basidiomicetes está fuertemente influenciada por la cepa, la composición del sustrato utilizado, la concentración y cantidad de nutrientes en el sustrato y el método de cultivo (Rodríguez-Couto y Sanromán, 2005; Elisashvili *et al.*, 2008).

Varios trabajos se han enfocado en la utilización de residuos agroindustriales usados como sustratos para la producción de enzimas en cultivo sólido, como primer paso para su uso como aditivos en la alimentación de rumiantes, proporcionándoles un valor agregado y contribuyendo a solucionar problemas ambientales (Beauchemin *et al.*, 2004; Levin *et al.*, 2008; Peláez-Acero *et al.*, 2008; D'Agostini *et al.*, 2011).

A este aspecto, la adecuada selección del sustrato para la realización del CMS es esencial, ya que el éxito del proceso depende de él. Los sustratos suelen seleccionarse de acuerdo a las características del microorganismo y de la enzima a producir. Para producir celulasas y xilanasas es recomendable emplear sustratos con altos contenidos de celulosa y hemicelulosa (Shah y Madamwar, 2005); mientras que para enzimas oxidasas es preferible utilizar sustratos con alto contenido de lignina (Rodríguez-Couto y Sanromán, 2005; Membrillo *et al.*, 2008).

El cultivo en medio sólido está involucrado el control de diferentes parámetros fisicoquímicos y bioquímicos como el tamaño de partícula, la humedad, actividad de agua, temperatura, pH, agitación y aireación, edad y tamaño del inóculo, suplementación de nutrientes, fuentes de carbono e inductores y finalmente la extracción y purificación del producto (Pandey, 2003; Membrillo *et al.*, 2011).

2.2.1. Subproductos agrícolas

La agricultura intensiva genera grandes cantidades de subproductos agrícolas en épocas del año muy concretas que de no ser retiradas producen graves problemas medioambientales (SAGARPA, 2006). Distintas características hacen que estos subproductos tenga una serie de ventajas interesantes en su uso en la alimentación animal, como por ejemplo, el bajo costo (Meneses *et al.*, 2007), y que generalmente son materiales altamente lignocelulolósicos (Graminha *et al.*, 2008). Sin embargo, su disponibilidad se ve limitada, por lo tanto, se emplean diferentes métodos químicos, físicos y biológicos para mejorar su digestibilidad.

Dado que la alimentación animal está sujeta a la búsqueda continúa de nuevos ingredientes en la dieta, el utilizar como sustratos los residuos lignocelulósicos se convierten en un recurso con potencial biotecnológico desarrollable. Tanto para la ciencia aplicada como para la conservación ambiental, es importante entender la naturaleza de la descomposición y biodegradación de lignocelulosa por los organismos responsables (Ohkuma *et al.*, 2001).

Los materiales lignocelulósicos son ubicuos y consisten principalmente de celulosa (40-60 %), hemicelulosa (20-30 %) y lignina (15-30 %) (Bhat y Hazlewood, 2003). La acumulación de biomásas en grandes cantidades no solo da como resultado deterioro ambiental, sino genera una pérdida de material potencialmente valioso para producir alimentos, piensos y una gran variedad de productos (Khalil, 2002). Sin embargo, el uso de los materiales lignocelulósicos se ve obstaculizado por la lignina, la cual limita la accesibilidad de las enzimas para la hidrólisis de la celulosa y la hemicelulosa

El principal residuo lignocelulósico generado en México es el bagazo de caña con una producción de 380 millones de toneladas anuales (Sánchez, 2009), es un bio-producto de la industria cañera que representa una fuente potencial de energía en la alimentación animal (Gómez *et al.*, 2003; Campos *et al.*, 2004). Por otra parte el rastrojo de maíz alcanza una producción de 191 millones de toneladas anuales (Sánchez, 2009) y se clasifica con alto contenido de fibra (65% de FDN) (Campos-Montiel *et al.*, 2008).

La evaluación de sustratos alternos para el cultivo de *Fomes* sp. EUM1, se realizó en orujo de oliva. Debido a que en países del mediterráneo la producción de aceite de oliva presenta problemas ecológicos por la escasa aplicabilidad del efluente generado por la industria. La descarga de las almazaras tiene efectos ambientales adversos y actualmente han sido propuestas varias tecnologías para tratar estos efluentes; sin embargo, son limitadas por cuestiones económicas y técnicas.

El orujo o alperujo es el residuo semi-sólido procedente de las almazaras, tras el proceso de obtención del aceite de oliva, resultante de la mezcla de hueso, resto de pulpa y agua; tiene una elevada humedad (65-70%), por tanto se vierte en balsas de evaporación para su tratamiento y utilización como combustible (Aranda, 2006). Presentan una composición química variable, con variaciones intrínsecas y extrínsecas. Esta heterogeneidad, así como su concentración, es considerada como uno de los principales factores limitantes para la estandarización del método que permita el reusó de este subproducto.

Sin embargo, debido a la gran cantidad que se genera, la eliminación de este subproducto, respetando el medio ambiente se ha convertido en un problema para la industria siendo necesaria la búsqueda de alternativas para la completa valorización de este subproducto. Aunque los compuestos fenólicos son los principales factores tóxicos de este subproducto, los basidiomicetes disminuyen la toxicidad mediante la polimerización de los compuestos fenólicos, debido a la actividad enzimática producida por estos hongos, particularmente de peroxidasas y lacasas.

Otro subproducto es la harina de girasol que tiene entre un 32-33% de proteína bruta, pero la existencia de algunos factores anti nutricionales limitan la incorporación de este subproducto en las dietas de aves y cerdos. No obstante, los altos contenido en fibra cruda (18-19%), los bajos niveles de lisina (0.6-0.7%) y de energía metabolizable (1900 - 2100 cal/g) y los efectos adversos provocados por la presencia de polisacáridos de baja digestibilidad (15-20 %) que caracterizan a este tipo de harina, son factibles de ser mejorados mediante la aplicación de procesos industriales y la utilización de enzimas exógenas.

2.3 Lignocelulosa y enzimas lignocelulolíticas

La lignocelulosa es el componente principal de las plantas y del material vegetal en descomposición, siendo la fuente de biomasa más abundante (Tuomela *et al.*, 2000). La lignina protege a la celulosa y estructuralmente es heterogénea, con un arreglo irregular de polímeros de fenilpropano que resiste la degradación química o enzimática. La degradación de los componentes de las paredes vegetales es un proceso complejo que involucra la acción sinérgica de un gran número de enzimas extracelulares. En los hongos filamentosos, estas proteínas son indispensables para la obtención de energía y nutrientes.

2.3.1. Celulosa

La celulosa es el biopolímero más abundante y fuente potencial de azúcares utilizables en la naturaleza. Esta constituida de 3 500 unidades de glucosa ó más, unidas por enlaces glicosídicos β -1,4. La unión de cientos de unidades de este polímero forma las cadenas llamadas microfibrillas, las cuales se agrupan para

formar las fibras elementales que forman la celulosa. Dependiendo del arreglo de las mismas, las fibras de celulosa presentan regiones denominadas cristalinas (arreglo ordenado de las fibras) y regiones denominadas amorfas (arreglo desordenado de las fibras), estas últimas son las regiones más susceptibles a la hidrólisis enzimática (Cullen y Kersten, 1992; Pérez, *et al.*, 2002).

El uso de los materiales lignocelulósicos se ve obstaculizado por la lignina, la cual limita la accesibilidad de las enzimas para la hidrólisis de la celulosa y la hemicelulosa. La hidrólisis completa de la celulosa nativa requiere la acción conjunta de múltiples enzimas con distintas especificidades de sustrato. Las tres enzimas más importantes son las endocelulasas, las exocelulasas y las β -glucosidasas. En el caso de los hongos de podredumbre blanca, producen los tres tipos de enzimas (Harris y Smith, 2006).

2.3.2 Celulasas

Se ha comenzado a incrementar el estudio de las celulasas, debido a su aplicación en la hidrólisis de la celulosa, el más abundante biopolímero y fuente potencial de azúcares utilizables, que sirven como materia prima en la producción microbiana para una amplia variedad de químicos, alimentos y combustibles. La bioconversión de la celulosa contenida en las materias primas es un problema importante para la biotecnología, debido a las crecientes necesidades de alimento (Solovyeva *et al.*, 1997).

Las celulasas hidrolizan al azar los enlaces glicosídicos internos β -1,4, primeramente, las endo- β 1,4-glucanasas o CMcelulasas (EC 3.2.1.4), son las más ampliamente encontradas, hidrolizan la celulosa amorfa (Figura 3) generando sitios nuevos para la acción de otras enzimas. Las endoglucanasas presentan inhibición por la presencia de celobiosa (Coughlan y Ljungdahl, 1998; Massadeh *et al.*, 2001). Estas enzimas juegan un papel importante al incrementar el rendimiento de jugo de frutas, la filtración de cerveza, mejoran la calidad nutricional de productos de panadería y alimento para ganado (Cullen y Kersten, 1992; Kaur *et al.*, 2007).

El segundo grupo son las exo- β -glucanasas o 1,4- β -glucan celobiohidrolasas (EC 3.2.1.9), éstas son importantes en la degradación de la celulosa cristalina, actúan en los extremos de las fibras de la celulosa y en los sitios creados por la acción de las endoglucanasas generando moléculas de celobiosa y pequeñas cantidades de glucosa (Figura 3). Estas enzimas se inactivan en carboximetilcelulosa, pero hidrolizan la celulosa amorfa al atacar los residuos de celobiosa (Kaur *et al.*, 2007).

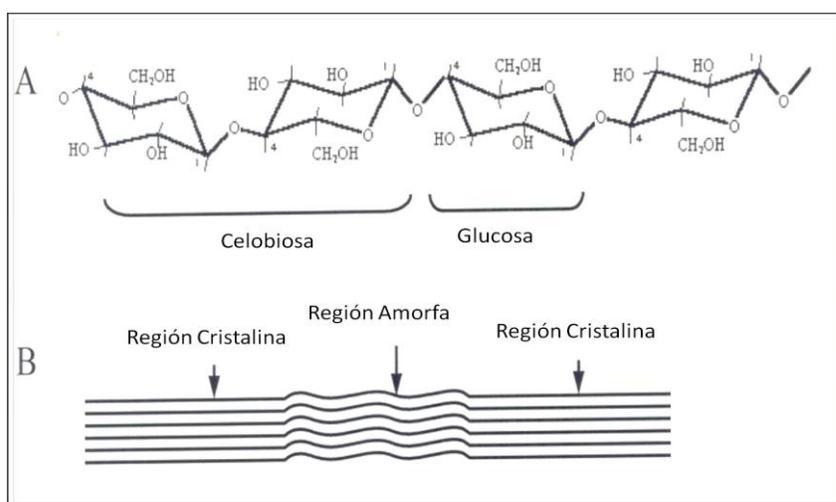


Figura 3. Representación de la hidrólisis de la celulosa.

Finalmente, las β -glucosidasas (EC 3.2.1.21) las cuales hidrolizan las moléculas de celobiosa a monómeros de glucosa (Massadeh *et al.*, 2001), de esta manera, los microorganismos pueden utilizar los productos generados por la hidrólisis de la celulosa como fuente de carbono para el crecimiento (Rabinovich *et al.*, 2002).

2.3.3. Hemicelulosa

La hemicelulosa es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza (Collins *et al.*, 2005), es un polímero complejo que esta asociado a las fibras de celulosa y a la lignina. La hemicelulosa, llega a representar hasta el 35 % del peso seco de las plantas superiores. Por lo general, la hemicelulosa se clasifica de acuerdo al azúcar residual principal del polímero, siendo el xilano el principal tipo de hemicelulosa. El xilano es un polímero lineal de unidades β - xilanopiranosil unidos por enlaces β 1-4 xilosídicos; constituido principalmente de unidades de xilosa (150-200) arregladas en forma lineal, con presencia de ramificaciones que consisten de unidades de otros azúcares como la manosa, arabinosa, galactosa, glucosa, arabinosa y ácidos glucorónicos (Figura 4).

Aproximadamente una de cada diez moléculas de xilasas en la cadena tiene una sustitución en su carbono 2, en la que se une un residuo de 4-O-metil- α -D-glucurónico por medio de un enlace α -(1-2). Cerca del 70 % de las xilasas están acetiladas en el C₂, C₃ ó ambos. La presencia de los grupos acetyl es responsable de su solubilidad parcial del xilano en agua. Además, una proporción de las unidades de arabinosa de las cadenas laterales de xilanos está esterificada con ácidos *p*-

cumárico y ferúlico, que establecen enlaces con las cadenas de lignina (Khandeparkar y Bhosle, 2006).

2.3.4. Xilanasas

La hidrolisis del xilano es efectuada por un complejo de enzimas llamadas genéricamente xilanasas, las principales enzimas involucradas son las endo-1,4- β -xilanasas y las β -xilosidasas. Se ha descrito que son producidas por hongos, bacterias, levaduras, algas marinas, insectos, semillas, etc. Siendo la principal fuente comercial los hongos filamentosos.

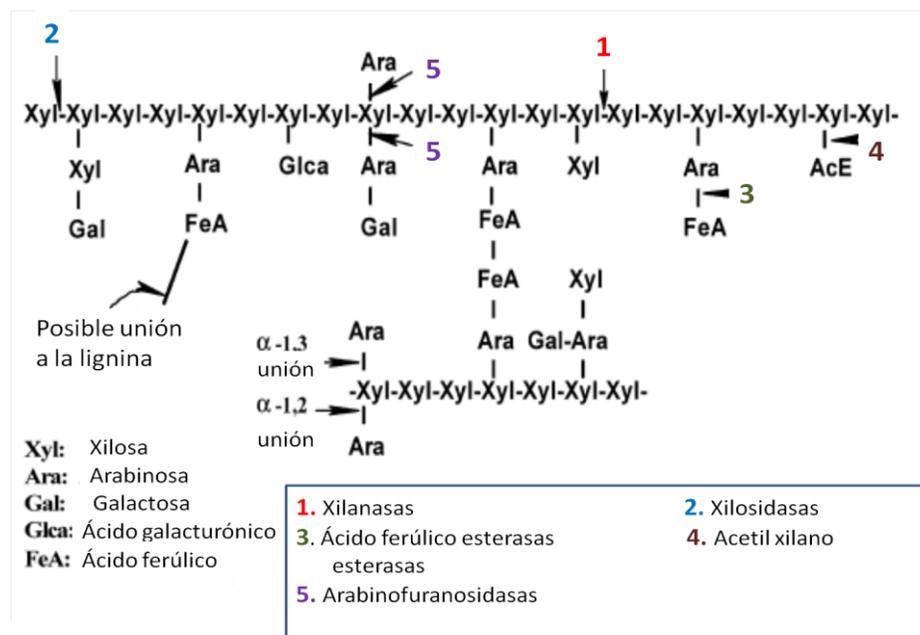


Figura 3. Representación esquemática de la hidrolisis de la hemicelulosa (Beg *et al.*, 2001).

Las xilanasas tienen un número creciente de usos, de manera individual o combinada con otras enzimas. Existen numerosas investigaciones con endoxilanasas (EC 3.2.1.8) para la producción de xilanos y su empleo en procesos

biotecnológicos. Por otro lado, junto con otras enzimas hemicelulasas, las xilanasas permiten la obtención de oligosacáridos de xilano provenientes de desechos agrícolas para su uso como aditivos alimenticios y edulcorantes. Además, empleadas junto con celulasas, son útiles para la modificación de masas en panadería y para el mejoramiento de las dietas de aves y rumiantes, puesto que la hidrólisis enzimática de los arabinoxilanos, en forrajes y cereales, aumenta la digestibilidad de las materias primas de la dieta (Topakas *et al.*, 2003).

La hidrólisis del xilano (Figura 4), se lleva a cabo por la acción cooperativa de las endoxilanasas (endo-1,4- β -xilanasas) las cuales hidrolizan los enlaces β - 1,4 internos del xilano para generar oligómeros, dímeros y monómeros de xilosa. Las endoxilanasas no hidrolizan el xilano al azar como sucede en la hidrólisis de la celulosa por las endoglucanasas, sino en sitios donde existan ramificaciones ó ciertos azúcares específicos. Los oligómeros ramificados y dímeros generados por la acción de las endoxilanasas son rápidamente hidrolizados en forma simultánea por otras enzimas como las xilosidasas, acetil esterasas, glucoronidasas, arabinofuranosidasas, galactosidasas para liberar azúcares como la xilosa, ácido glucorónico, arabinosa y galactosa, respectivamente (Beg *et al.*, 2001; Polizeli *et al.*, 2005).

2.3.5. Lignina

La lignina es un polímero difícil de degradar, por la complejidad de su estructura y por su insolubilidad en agua. La lignina recubre el polímero de la hemicelulosa, su estructura está compuesta de unidades de fenilpropano (alcohol coniferílico,

sinaprílico y cumarílico) que están unidos entre sí por enlaces carbono-carbono y aril-éter. Su función es conferir soporte estructural, impermeabilidad y resistencia al ataque de microorganismos (Howard *et al.*, 2003; Martínez *et al.*, 2005).

2.3.6. Lacasas

En la actualidad, las lacasas más estudiadas son las que pertenecen a los hongos de podredumbre blanca. Son llamados así debido a que degradan la lignina y producen un residuo de color blanco que corresponde a los desechos de celulosa y hemicelulosa que contienen las cortezas (González, 2004). Las lacasas (bencendiol:oxígeno reductasas, EC 1.10.3.2) pertenecen al grupo de las polifenol oxidasas que contienen cobre en el centro catalítico y se encuentran unidas en tres sitios distintos con cobre (Baldrian, 2006). Son capaces de oxidar lignina en ausencia de lignino peroxidasa y manganeso peroxidasa (Mayer y Staples, 2002).

La reducción del oxígeno a agua por esta enzima, está acompañada por la oxidación de un sustrato fenólico, generando un radical libre que generalmente es inestable (Thurson, 1994). Las reacciones oxidativas que pueden llevar a cabo las lacasas para despolimerizar la lignina incluyen: rompimiento entre enlaces C_{α} - C_{β} , hidroxilación, rompimiento de estructuras aromáticas y desmetilación.

Las lacasas son inespecíficas con respecto a la oxidación de sustratos. Catalizan la oxidación de varios sustratos orgánicos, incluidos *o*- y *p*-difenoles, aminofenoles, polifenoles, poliaminas, metoxifenoles, ligninas y algunos iones inorgánicos, con la

reducción simultánea directa de oxígeno a agua y sin la producción del intermediario peróxido de hidrógeno (Mayer y Staples, 2002).

Como se muestra en la Figura 5, las lacasas y las peroxidasas oxidan el polímero de lignina generando radicales aromáticos (a), por ser compuestos tan inestables, estos presentan rupturas de enlaces éter (b), rupturas de anillos aromáticos (c), enlaces C-C (d) y desmetilación (e).

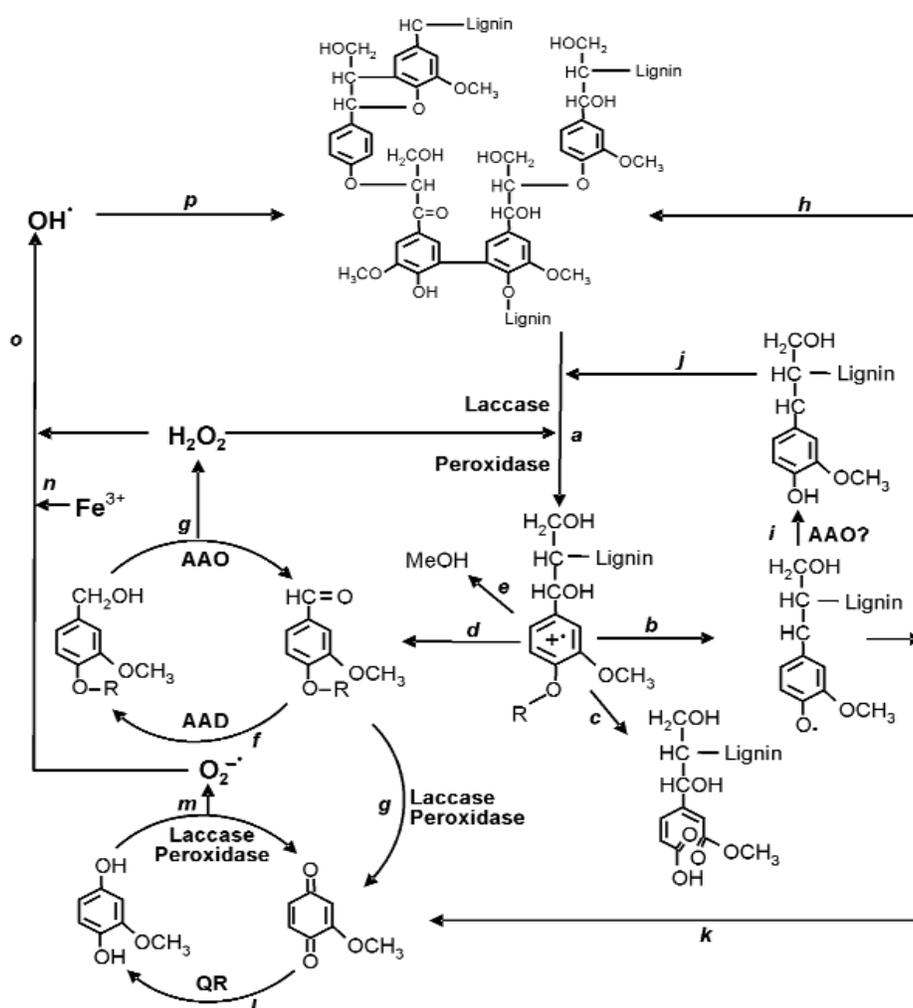


Figura 4. Representación de mecanismo de oxidación de la lignina por lacasas, peroxidasas y deshidrogenasas (Martínez *et al.*, 2005).

Los compuestos aromáticos generados por la ruptura de los enlaces C-C son utilizados como sustratos por las enzimas AAO y AAD para generar peróxido de hidrógeno (H_2O_2) mediante procesos de reacción de oxidación cíclica (f, g). Los radicales fenoxi generados por la ruptura de los enlaces éter pueden volverse a polimerizar sobre la lignina (h), si no son reducidos por oxidasas a compuestos fenólicos (i), pueden volverse a oxidar por las lacasas ó peroxidadas (j) o pueden ser retomados para una nueva ruptura de enlaces C-C para producir quinonas (g, k), las cuales son oxidadas en forma cíclica por la acción de las quinonareductasas (QR), lacasas y peroxidadas (l, m) para generar iones superóxido (O_2^-) y peróxido de hidrógeno. Posteriormente, estos iones son reducidos y oxidados respectivamente para generar iones oxidrilos (n, o), estos compuestos son muy reactivos y provocan rupturas en la estructura de la lignina (p). Los productos generados durante la oxidación de la lignina son incorporados dentro de las células de los microorganismos para su metabolismo (Martínez *et al.*, 2005).

Las enzimas lacasas se han utilizado para la degradación previa de la lignina con el fin de aumentar la exposición de la celulosa a las celulasas fúngicas (Anderson *et al.*, 1988). Estas enzimas presentan un mecanismo de biocatálisis no específico y tienden a ser utilizadas en procesos de bioremediación por hongos. Rogalski *et al.*, (1993) señalaron que el sistema ligninolítico de los hongos de pudrición blanca actúan en cooperación con el sistema celulolítico, la acción concertada de las enzimas que oxidan lignina y las que hidrolizan la celulosa es muy importante para futuras aplicaciones.

El ácido fenilacético y el ácido fenilpropiónico son productos intermedios de la degradación de la lignina (Stack y Hungate, 1984) y parecen favorecer la adhesión de bacterias ruminales como *Ruminococcus albus* hacia la celulosa (Miron *et al.*, 2001). Sin embargo, los ácidos p-cumárico y ferúlico, que también forman parte en la estructura de muchas gramíneas, pueden afectar la pared celular de varios microorganismos e inhibir la fijación hacia el sustrato.

2.4 Suplementación de enzimas en la alimentación animal

En el mercado existen productos enzimáticos comercializados para la ganadería, los cuales se obtienen principalmente de cuatro bacterias: *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum* y *Streptococcus faecium* spp, de tres géneros de hongos: *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma reesei* y *Saccharomyces cerevisiae* (Muirhead, 1996).

Una diferencia sustancial entre los productos comerciales es el tipo de sustrato que utilizan, de tal modo que no son preparaciones de enzimas individuales, actividades secundarias de enzimas como las amilasas, proteasas, o pectinasas están presentes. Comercialmente lo más común es encontrar una mezcla de enzimas tanto xilanolíticas como celulolíticas (Beauchemin *et al.*, 1997).

La diversidad de actividades enzimáticas presentes en los preparados comerciales es beneficiosa, ya que puede haber una gran variedad de sustratos blanco de un solo producto, pero presenta problemas en términos de control de calidad y en la extrapolación de los resultados en la investigación. Para los rumiantes, los productos

enzimáticos suelen ser normalizados por la mezcla de extractos crudos enzimáticos para obtener determinados niveles de una o dos actividades enzimáticas (xilanasas y/o celulasas). Estos productos no están estandarizados para actividades secundarias y las actividades de celulasas y xilanasas pueden diferir sustancialmente entre los productos, esto presenta un impacto en la eficacia de la degradación de la pared celular para estos productos (Beauchemin *et al.*, 2001).

En el contexto de los aditivos enzimáticos que se comercializan principalmente para rumiantes, se basan en la capacidad de las enzimas exógenas de remover factores antinutricionales, aumentar la digestibilidad de sustancias nutritivas existentes en la fibra, y complementar la actividad de enzimas endógenas (Classen *et al.*, 1991; Bedford, 1993); esto hace que la alimentación animal sea más eficiente en términos de asimilación y también de costos, incluso tornándola amigable con el medio ambiente (Montes y Magaña, 2002).

El empleo de enzimas fibrolíticas exógenas se presenta como un método biológico que favorece la utilización de alimentos fibrosos por parte de los rumiantes, al complementarse la actividad celulolítica de las bacterias ruminales y mejorando la digestibilidad de la fibra (Coronel *et al.*, 2001; Pinos *et al.*, 2002; Colombatto *et al.*, 2003). Los aditivos enzimáticos tienen un potencial significativo para mejorar la digestión de la fibra para la alimentación del ganado, así optimar la utilización del alimento y el rendimiento animal. El agregar enzimas causa una mejor disponibilidad de energía, incrementando el valor total de energía metabolizable de la materia prima.

Actualmente, la producción de enzimas tiene como base la utilización de microorganismos, sobre todo hongos y bacterias. Los microorganismos pueden secretar una serie de enzimas hidrolíticas que los organismos animales son incapaces de producir (Forsberg *et al.*, 2000). Para todo esto es necesario pasar por ensayos con cientos de cepas antes de identificar una adecuada a las necesidades del investigador, y que además produzca los volúmenes necesarios. El objetivo principal del uso de enzimas exógenas se concentra en la solución de tres grandes aspectos: el ácido fítico, los carbohidratos estructurales (fibra vegetal) y los factores antinutricionales (Forsberg *et al.*, 2000).

2.4.1 Pruebas de digestibilidad

Los rumiantes juegan un papel importante convirtiendo productos de la plantas en alimentos de alta calidad para los humanos. Los productos utilizados en nutrición animal incluyen granos, forraje y ensilados de cultivos, pastos, residuos de cultivos y una amplia variedad de bio-productos.

Se han desarrollado ensayos biológicos propuestos para los rumiantes, que pueden ser más indicativos del valor de un preparado enzimático. Estos métodos implican generalmente la incubación *in vitro* de las enzimas y los forrajes con contenido ruminal, midiendo la desaparición de la materia seca (sustratos) representando lo consumido por el animal (Varel *et al.*, 1993). Por otra parte, la producción de gas por el cultivo se usa como una indicación de la digestión (Iwaasa *et al.*, 1998). Este procedimiento puede proporcionar información sobre el grado en que las enzimas exógenas complementan la actividad digestiva de los microorganismos ruminales.

Burroughs *et al.*, (1960); Rovics y Ely, (1962), evaluaron el empleo de enzimas exógenas en rumiantes, pero las respuestas fueron variables. Además, la producción de enzimas exógenas no era económicamente factible para aplicar estos preparativos en las concentraciones necesarias de obtener una respuesta positiva de animal. Recientemente, reducciones en los gastos de fermentación, junto con enzimas más activas y mejor definidas, han incitado a investigadores a reexaminar el papel de enzimas exógenas en producción rumiantes (Chen *et al.*, 1995; Beauchemin *et al.*, 1997).

Varios estudios han intentado definir los modos posibles de acción de estos aditivos (Feng *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1998). Las enzimas exógenas podrían ejercer varios efectos, tanto en la flora gastrointestinal como sobre los rumiantes. Es sumamente probable, por lo tanto, que respuestas fisiológicas ocasionadas por las enzimas exógenas son de origen multifactorial.

Sin embargo, la extrapolación de la información generada de estos procedimientos a situaciones *in vivo* es limitada, por las variaciones en la composición microbiana de los inóculos de animales donantes, por diferencias en el crecimiento de las poblaciones microbianas en el sistema *in vitro* frente al rumen y por la acumulación de productos finales que alteran la actividad enzimática. Además, estos ensayos no consideran el impacto posible de las enzimas exógenas sobre los parámetros biológicos, tales como consumo voluntario del alimento, la tasa de pasaje o la digestión ruminal del nutriente.

3. Justificación

Los materiales de desecho con potencial de bioconversión, son abundantes y contienen una alta proporción de lignocelulosa, principalmente celulosa (40-60 %), hemicelulosa (20-30 %) y lignina (15-30 %) (Dekker, 1983). La acumulación de biomásas en grandes cantidades provoca un deterioro ambiental y genera pérdidas de materiales con potencial biotecnológico para la producción de enzimas.

En México, se generan 191 millones de toneladas anuales rastrojo de maíz (Sánchez, 2009). La alta disponibilidad lo convierten en un recurso importante en la alimentación de rumiantes, sin embargo, su baja digestibilidad y su bajo contenido de proteína comprometen su uso eficiente. El utilizar basidiomicetos de pudrición blanca sobre rastrojo de maíz, se convierte en una alternativa para obtener y aplicar enzimas lignocelulolíticas. *Fomes* sp. EUM1 se caracteriza por producir celulasas, xilanasas y lacasas en forma simultánea, además es un hongo termotolerante. Así por ejemplo, los sustratos ricos en lignina, como los forrajes, serán modificados preferencialmente por extractos en los que estén presentes las lacasas.

El efecto con extractos específicos y estables, se basa en que estas enzimas expondrán los sitios de unión a carbohidratos que servirán de anclaje a los microorganismos ruminales para continuar la degradación de las fibras (Blake *et al.*, 2006). Por lo que es necesario estudiar la eficiencia de un extracto basado en las propiedades lignocelulolíticas de *Fomes* sp. EUM1 para el tratamiento de rastrojo de maíz, con implicación en el uso de un forraje para la alimentación de rumiantes.

4. Hipótesis

El uso de rastrojo de maíz con salvado de trigo como sustrato favorecerá la producción de enzimas lignocelulolíticas por el hongo *Fomes* sp. EUM1.

La eficiencia de la degradación de la pared celular del rastrojo de maíz se puede mejorar usando extractos fibrolíticos exógenos producidos sobre el mismo sustrato, obteniendo beneficios en la respuesta productiva de corderos.

5. Objetivos

Objetivo general

- Producción de extractos crudos enzimáticos utilizando el hongo termololerante *Fomes* sp. EUM1.

Objetivos específicos

- Propagación y conservación de *Fomes* sp. EUM1
- Determinar la actividad enzimática de extractos enzimáticos producidos sobre diferentes subproductos agrícolas.
- Realizar cinéticas de cultivo sobre rastrojo de maíz y su mezcla con salvado de trigo para evaluar la producción y estabilidad de los extractos enzimáticos.
- Determinar el efecto de los ECE de *Fomes* sp. EUM1 en la producción de gas *in vitro* y digestibilidad de la materia seca de diferentes forrajes.
- Evaluar la respuesta productiva, digestibilidad y variables ruminales de ovinos alimentados con rastrojo de maíz.

6. Metodología

6.1. Microorganismo

En el desarrollo de este estudio se utilizó el hongo *Fomes* sp. EUM1 de la colección del laboratorio de Enzimología y Biología Molecular de hongos filamentosos de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. Este basidiomiceto se aisló de residuos de la madera en el Estado de Yucatán. A partir de un grupo de seis basidiomicetos, *Fomes* sp. EUM1 presentó los halos más grandes de oxidación del ABTS (2,2,-azinobis(3 – etilbenzotiazolina – ácido sulfónico) en dos días de cultivo a 40 °C, como indicador de la producción extracelular de lacasas (Medina, 2003). Recientemente, Ordaz *et al.*, (2012) lo identificaron mediante técnicas de biología molecular como un basidiomiceto termotolerante, reportando un 90% de identidad con el género *Fomes* (GenBank de HM136871).

6.2. Propagación y conservación

Para su conservación, el microorganismo se propagó en cajas Petri con extracto de malta (40 g L⁻¹), extracto de levadura (3 g L⁻¹) y agar bacteriológico (15 g L⁻¹) (Schlosser *et al.*, 1997). El medio de cultivo se esterilizó a 15 lb pulg⁻² a 121 °C durante 15 min. En condiciones de esterilidad, *Fomes* sp. EUM1 se propagó en cajas Petri a 35 °C. La conservación se realizó en tiras de papel filtro estériles (0.5 x 1.5 cm), de acuerdo a lo recomendado por Ordaz (2008). El micelio creció sobre las tiras de papel y en condiciones de esterilidad se retiró y colocaron en viales que tenían 5

mL de agua destilada estéril, se cerraron con tapón de rosca y se sellaron con papel parafilm. Los viales se almacenaron a temperatura ambiente en un lugar seco.

6.3. Cultivo superficial de *Fomes* sp. EUM1

La estrategia experimental consistió en evaluar en cultivo superficial a 13 subproductos agrícolas para el crecimiento de *Fomes* sp. EUM1. Los subproductos agrícolas que se utilizaron se dividieron en tres grupos, primero: rastrojo de maíz (RM); paja de trigo (PT); paja de cebada (PC); tallo de alfalfa (TA); rastrojo de leguminosa (RL); segundo: paja de trigo con pulpa de tomate (PTM); paja de trigo con pulpa de tomate y remolacha (PTMR); ensilado de paja de trigo y tomate (ET); ensilado de paja de trigo, tomate y remolacha (ER); y tercero: alperujo de uva (AU); orujo de oliva 1 (OO1); orujo de oliva 2 (OO2); harina de girasol (HG). La diferencia entre el OO1 y el OO2 es el lugar de muestreo, el primero corresponde al alperujo ya secado por métodos naturales y el segundo se obtuvo del estanque (húmedo). Todos los subproductos propuestos se secaron (60 °C por 24 h), se tamizaron y molieron a tamaño de partícula de 1 mm.

Se utilizaron cajas Petri para predecir los resultados bajo diferentes sustratos de crecimiento y lograr establecer estrategias globales para el escalamiento. Se pesaron 200 g L⁻¹ de cada subproducto agrícola, se agregó agua destilada y se mantuvo en agitación a 70 °C durante 1 hora. Los sustratos se combinaron con agar bacteriológico (15 g L⁻¹), se esterilizaron a 121 °C, 25 min y vertieron en cajas Petri para ser inoculadas con un disco de agar (0.6 cm) procedente de un cultivo de 7 días. Después, el crecimiento radial se determinó en cada una de las mezclas que

incubaron durante 7 días a 35 °C. En ningún tratamiento los medios se enriquecieron para favorecer el crecimiento, sólo en AU se preparó el medio de cultivo con amortiguador de citrato de sodio (25 mM, pH 5.3).

6.4. Longitud de crecimiento y obtención del extracto crudo enzimático

Se midió la longitud promedio de crecimiento micelial de la colonia (Vernier Caliper) después de 7 días de cultivo, usando cinco repeticiones. El extracto crudo enzimático (ECE) de cada caja Petri se obtuvo haciendo cortes longitudinales al agar invadido con micelio, se colocó en un vaso de precipitado y se agregaron 100 mL de agua destilada. Esta preparación se mantuvo en baño de hielo con agitación magnética durante 1 h (Martínez, 2011). Posteriormente, el contenido de cada matraz se filtró (papel Whatman No.40), y se centrifugó a 9 600 x *g* durante 10 minutos. El sobrenadante recuperado se consideró como ECE y se utilizó para medir las actividades enzimáticas.

6.5. Determinación de las actividades enzimáticas

Celulasas. La actividad celulolítica se midió a los 7 días de cultivo. Se utilizó el método descrito por Miller *et al.*, (1960), el cual se basa en la cuantificación indirecta de azúcares reductores, como la glucosa, que reaccionan con el reactivo 3,5-dinitrosalicílico (DNS) reduciéndolo al ácido 3-amino-5-nitrosalicílico de color rojo oscuro; cuya presencia puede detectarse al medir la absorbancia a una longitud de onda de 640 nm (Chaplin, 1986). Se utilizó como sustrato una solución de carboximetilcelulosa (Sigma-Aldrich) al 1%, disuelta en amortiguador de citrato de sodio (50 mM, pH 5.0). Se realizó una curva estándar con una solución de glucosa

10 mM (0.18 g/100 mL) disuelta en amortiguador de citrato de sodio (50 mM y pH 5.0).

En tubos de ensaye por duplicado se llevó a cabo la reacción para la determinación de celulasas. El volumen de la mezcla de reacción fue de 1 mL (0.8 mL de carboximetilcelulosa y 0.2 mL del ECE). La reacción se realizó a 50 °C durante 20 min, posteriormente se adicionó 1.5 mL del reactivo DNS. Se usaron blancos de muestra, los cuales llevan el mismo procedimiento, solo que el ECE se agrega después del reactivo DNS. El volumen total de reacción se agitó manualmente, los tubos se colocaron en agua en ebullición por 20 minutos. Finalmente, los tubos se colocaron en agua fría hasta alcanzar la temperatura ambiente. Las lecturas se realizaron en celdas de plástico en un espectrofotómetro (UNICAM HELIOS) a 640 nm. Una unidad internacional (UI) de enzima se define como la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de azúcar reductor (glucosa) por min a 50 °C.

Xilanasas. La actividad de xilanasas se midió por el método del DNS (Miller *et al*, 1960), con modificaciones de Loera y Córdoba (2003) descritas a continuación: se utilizó como sustrato una solución de xilano de abedul (Sigma-Aldrich) al 0.5%, el cual fue disuelto en amortiguador de citrato de sodio (50 mM, pH 5.3). Se realizó una curva estándar con solución de xilosa a una concentración final de 10 mM (0.15 g/100 mL) disuelta en buffer de citratos (50 mM, pH 5.3).

La reacción se realizó en tubos de ensaye por duplicado. El volumen de la mezcla de reacción fue de 1 mL, que contenía 0.8 mL del sustrato y 0.2 mL del ECE. Se incubó

por 5 min a 50 °C; enseguida se le agregó 1.5 mL del reactivo DNS. Al blanco de muestra se le agregó después del DNS la muestra del ECE. Las muestras se llevaron a hervir durante 5 min, para desarrollar color, posteriormente se colocaron en agua fría. Finalmente, se midió la absorbancia a una longitud onda de 640 nm. Una unidad internacional (UI) se define como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 μmol de azúcar reductor (D-xilosa) por minuto a 50 °C (Qinnghe *et al.*, 2004).

Lacasas. La actividad de esta enzima se evaluó midiendo la oxidación del ácido 2,2-azinobis-3-etilbencentiazolinasulfónico (ABTS). El reactivo ABTS ($\epsilon_{420} = 36\ 000\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), se preparó a una concentración de 0.1 M disuelto en amortiguador de citratos (50 mM, pH 5.0). Esta solución se colocó en un frasco color ámbar y se cubrió con papel aluminio, hasta por 10 días. Los tubos de reacción se prepararon con 500 μL de ECE y se incubaron en baño de agua a 40 °C durante 1 minuto. Al momento de la lectura se adicionaron 500 μL del reactivo ABTS en cada muestra para dar un volumen total de 1 mL en una dilución 1:1. Los tubos se agitaron con un vórtex y la absorbancia se midió a 420 nm durante 90 segundos, registrando la absorbancia en intervalos de 10 segundos. Una unidad internacional (UI) se definió como la cantidad de enzima que produce 1 μmol de sustrato oxidado por minuto bajo las condiciones de reacción (Bourbonnais *et al.*, 1997).

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza de una vía para comparar la actividad enzimática en los diferentes sustratos (pajas y rastrojos, pajas y ensilados y subproductos agrícolas), empleándose la prueba de Tukey para comparar las medias en los casos donde se apreciaron diferencias significativas, previa comprobación de la homogeneidad de varianza. En los procesamientos estadístico se empleó el paquete SPSS ver. 15.0.

6.6. Producción de inóculo y cultivo en medio sólido (CMS)

La incubación de *Fomes* sp. EUM1 se realizó utilizando las mismas condiciones de cultivo (Sección 6.2). La propagación se realizó colocando en el centro de la caja un disco de agar (\varnothing 0.6 cm) con micelio joven incubando durante 7 días a 35 °C, con esto, se obtuvo el inóculo que posteriormente se utilizó para realizar las incubaciones del hongo en cultivo en medio sólido (CMS).

De acuerdo a los resultados obtenidos en la evaluación de sustratos se utilizó rastrojo de maíz para el cultivo en medio sólido de *Fomes* sp. EUM1. El rastrojo fue previamente secado, molido, tamizado y se midió el contenido de humedad (6.5 %). Se utilizó una mezcla de tamaño de partículas (4.06, 2.52 y 0.61), con el objetivo de obtener diversidad de fracciones que induzcan el complejo sistema enzimático (Membrillo *et al.*, 2008). Se evaluaron dos sustratos teniendo como unidad experimental matraces Erlenmeyer de 250 mL: el rastrojo de maíz (100 %); y el rastrojo de maíz con salvado, en proporción 80:20. El salvado de trigo se agregó

debido a su amplio uso en las fermentaciones en cultivo sólido, además de que Méndez (2010) mostró que se incrementa la producción de lacasas hasta en un 100%. Al contenido de cada matraz (3 g de sustrato) se le agregaron 8 mL de agua destilada, la cual se esparció en todo el sustrato homogenizando el contenido a una humedad inicial del 80%. Posteriormente, el sustrato se esterilizó a 15 lb plg^{-2} a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ por 30 min.

La siembra se realizó en condiciones de esterilidad. El inóculo fue una suspensión de micelio de *Fomes* sp. EUM1 (5 discos de agar (Ø 0.6 cm) en 5 mL de agua destilada estéril, de un cultivo de 7 d. Los matraces inoculados se incubaron 8 días a $35 \text{ }^\circ\text{C}$. En el interior de la incubadora se colocó un recipiente con agua destilada para reducir las pérdidas excesivas por evaporación. Los puntos experimentales de las cinéticas de producción se calcularon muestreando al azar por triplicado los matraces en incubación.

6.7 Extracción de enzimas del cultivo en medio sólido

La extracción se realizó de acuerdo a lo sugerido por Ordaz (2008). En un baño de hielo se agregaron a cada matraz 70 mL de agua destilada con agitación magnética durante 30 minutos. Posteriormente, el contenido de cada matraz se filtró con una bomba de vacío (papel filtro Whatman No. 1). El filtrado se centrifugó a $15,000 \times g$ durante 15 min a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. El sobrenadante recuperado se consideró como extracto crudo enzimático (ECE), y se utilizó para medir las actividades enzimáticas, siguiendo la metodología anteriormente descrita. Las lecturas de absorbancia se realizaron en el espectrofotómetro DU649 (BECKMAN).

6.8. Estabilidad enzimática

Se estableció la prueba de estabilidad de enzimas lignocelulolíticas obtenidas de un cultivo de 6 d de *Fomes* sp. EUM1 sobre dos sustratos: rastrojo de maíz (Ext Rm) y rastrojo de maíz con salvado de trigo (Ext Rm:St). De los cultivos en medio sólido se seleccionaron matraces al azar para determinar su actividad enzimática (sección 6.5). La extracción de enzimas se realizó con amortiguador de citrato de sodio (50 mM, pH 6). Realizado lo anterior, el ECE se mezcló (1:1) con una solución amortiguadora de citratos (50 mM, pH 6), esta suspensión se colocó en tubos Eppendorf de 1.5 mL, se sellaron con papel parafilm y se incubaron en baño de agua a 39 °C (Colombatto y Beauchemin 2003; Ramírez *et al.*, 2005; Membrillo, 2008). Los tiempos de incubación de la cinética fueron de 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 12, 18 y 24 h. Los datos se ajustaron a un modelo de decaimiento de primer orden y la estabilidad se determinó mediante el tiempo de vida media ($t_{1/2}$) y la constante de inactivación (k) de los extractos enzimáticos.

$$A = A_0 e^{-kt}$$

$$t_{\frac{1}{2}} = \frac{\ln 0.5}{-k}, \text{ donde } A = 1/2 A_0$$

6.9. Evaluación *in vitro* de extractos crudos enzimáticos

A los ECE se les midieron los niveles de actividad enzimática (Miller *et al.*, 1960; Bourbonnais *et al.*, 1997), con los datos anteriores se establecieron cuatro tratamientos (Cuadro 1) que se homogenizaron a la actividad xilanólica del producto comercial Fibrozyme®, el cual es reportado con alta actividad xilanólica (Pinos *et*

al., 2002). Es conveniente mencionar que este producto enzimático fibrolítico exógeno contiene un conjunto de celulasas, hemicelulasas y proteasas que se obtienen mediante la fermentación controlada de *Trichoderma viride* y *Aspergillus niger*. Posee un alto grado de glucosilación y su actividad xilanásica es de 100 UI g⁻¹ (Tricarico *et al.*, 1998), mientras que, los ECE utilizados del basidiomiceto *Fomes* sp. EUM1 se obtuvieron de un cultivo de 6 días (pico de máxima actividad de lacasas).

La estrategia experimental consistió en evaluar el efecto de las enzimas lignocelulolíticas previo al consumo del alimento por los rumiantes. Se utilizaron tres forrajes: heno de alfalfa, rastrojo de maíz y bagazo de caña. Las muestras se secaron, molieron y tamizaron a tamaño de partícula <1 mm. A continuación, los forrajes se hidrataron durante 22 horas con los ECE, antes de iniciar la cinética de producción de gas *in vitro*. Se agregó la cantidad de ECE (Cuadro 1) y se aforó a 10 mL con agua destilada del volumen total en todos los forrajes para asegurar la hidratación completa del sustrato.

Cuadro 1. Actividad y estandarización de los tratamientos a valores de actividad xilanólítica.

Tratamiento	Xilanasas (UI mL ⁻¹)	mL g ⁻¹ de sustrato
Testigo	-	0
Fibrozyme®	14.8	1
Ext Rm	2.8	5.3
Ext Rm:St	2.0	7.4

Ext RM: extracto de rastrojo de maíz; Ext Rm:St: extracto de rastrojo de maíz con salvado de trigo.

6.10. Producción de gas *in vitro*

Se utilizó la técnica de producción de gas *in vitro* propuesta por Theodorou *et al.*, (1994). Después del pre tratamiento enzimático en los sustratos, se colocaron 0.5 g de muestra en frascos de vidrio ámbar (125 mL), agregando 90 mL de inóculo ruminal estandarizado con un flujo continuo de CO₂, las botellas serológicas se cerraron herméticamente con septos y arillos metálicos. Los frascos se colocaron en un baño de agua a 39 ° C, la presión de gas originada por la fermentación del sustrato se registro a las 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24, 30, 36, 42, 48, 60 y 72 h de incubación mediante un manómetro manual (kg cm⁻²), igualando a cero la presión después de cada lectura. Las lecturas de presión (kg cm⁻²) se transformaron a volumen de gas (mL) mediante la ecuación de regresión $Y=X/0.0238$; donde Y y X representan el volumen de gas y la presión, respectivamente. Esta relación entre la presión y el volumen de gas se obtuvo inyectando un volumen de gas conocido dentro de botellas serológicas de 100 mL y registrar la presión generada por dicho volumen. Las variables de la cinética de producción de gas: volumen máximo de gas producido, fase de retardo y tasa de producción de gas se estimaron utilizando el modelo logístico propuesto por Schofield y Pell (1995):

$$Va = \frac{V \max}{(1 + e^{2-4S(t-L)})}; \quad \text{donde:}$$

Va=volumen acumulado

Vmax =volumen máximo de gas (mL g⁻¹ MS)

S= tasa de producción de gas (mL h⁻¹)

L =fase de retardo (h)

t = tiempo

El inóculo ruminal se obtuvo de dos borregos (53 kg \pm 6.8) de peso vivo, con cánula ruminal. Antes de alimentarlos se extrajeron 400 mL de líquido ruminal a cada animal, mediante una sonda. El líquido se mezcló y se filtró a través de cuatro capas de gasa. El fluido libre de partículas se mezcló con la solución mineral reductora 1:9 (v:v) a 39 °C bajo burbujeo constante de CO₂, obteniendo así el inóculo ruminal estandarizado. La solución mineral reducida contenía por litro de solución: 4 g de Ca₂CO₃, 0.45 g de K₂HPO₄, 0.45 g de KH₂PO₄, 0.45 g de (NH₄)₂SO₄, 0.90 g de NaCl, 0.18 g de MgSO₄, 0.07 g de CaCl₂, 50 mL de agua destilada, 2 mL de NaOH (1N), 0.5 g de NaSO₄, 0.5 g de L-Cisteína y 1 gota de rezarsurina. Al término de la cinética de producción de gas el contenido de los frascos se filtró (papel filtro Whatman 10 μ m), se secó a 60 °C por 24 h y se pesó la materia seca residual para calcular la digestibilidad *in vitro* de la materia seca.

Análisis estadístico

Los resultados fueron evaluados estadísticamente por el procedimiento de GLM (General Lineal Model) y prueba de comparación de medias por el método de Tukey. Se utilizó el paquete estadístico SAS, versión 9.0 (Steel et al., 1997).

6.11. Producción de extractos lignocelulolíticos, pruebas *in vivo*

Los extractos crudos enzimáticos se obtuvieron mediante el cultivo de *Fomes* sp. EUM1 en rastrojo de maíz (2.4 g) con salvado de trigo (0.6 g), Ext Rm:St. Los cultivos se incubaron a 35 °C con una humedad inicial del 80%. El tiempo de

fermentación fue de 6 días. Los extractos se obtuvieron añadiendo 100 mL de agua destilada (pH 6.5) en agitación constante durante 20 min. Posteriormente, se filtraron a través de papel Whatman® (Ø 1 mm) y se centrifugaron (15,000 x g durante 15 min a 4 °C). El sobrenadante se recuperó como extracto enzimático y se utilizó para hacer las determinaciones enzimáticas como anteriormente se describió (Da Silva *et al.*, 2005).

6.12 Pruebas *in vivo*

El experimento se realizó según las regulaciones en el Derecho de Protección de Animales promulgado en el Estado de México y se realizó en el municipio de Jilotepec, Estado de México. Se utilizaron 18 corderos Suffolk x criollo con peso vivo inicial de 20 kg \pm 0.5. Los corderos se colocaron en jaulas individuales (2 m²) con piso de concreto. Se vacunaron (Bacterin Polivalent). Después de un periodo de adaptación a la dieta de 21 días, los animales se pesaron (peso inicial del experimento) y se desparasitaron (Ivomec).

Los tratamientos consistieron en tres dosis del extracto crudo enzimático por kg de materia seca de rastrojo de maíz: 0, 60 y 120 mL. El Ext Rm:St se diluyó con agua a un volumen final de 500 mL y se asperjó al forraje 24 h antes de ofrecerlo a los corderos (Álvarez *et al.*, 2009). Al grupo testigo se le adicionó solo agua destilada.

La composición de la dieta se muestra en el Cuadro 1. El alimento se ofreció diariamente a las 09:00 y 17:00 horas. Los corderos tuvieron acceso libre al alimento y al agua. El alimento rechazado se colectó y pesó diariamente para garantizar 100 g

de rechazo por kg de la cantidad de alimento ofrecido por animal.

La composición de la dieta en las investigaciones de comportamiento animal debe de cumplir con los requerimientos de energía metabolizable necesaria para los animales de estudio, a este aspecto la dieta se formuló de acuerdo a lo establecido por el National Research Council (NRC, 1999) para corderos al destete. El Ext Rm:St no modificó la composición química de la dieta.

Cuadro 2. Composición química y dieta basal de los ingredientes (g kg⁻¹ MS).

Ingredientes	mL de ECE kg ⁻¹ MS		
	0	60	120
Rastrojo de maíz	300	300	300
Heno de alfalfa	300	300	300
Concentrado*	400	400	400
Composición química (g kg ⁻¹ MS)			
Materia seca	928	929	930
Proteína Cruda	145	142	141
Fibra detergente neutro	570	586	585
Fibra detergente ácido	339	342	333
Energía metabolizable (Mcal kg ⁻¹)	1.8	2.1	1.8

*Producto comercial 13% Proteína cruda. ECE, extracto crudo enzimático

Los corderos se pesaron cada 14 días. La recolección de heces y alimento se realizó

a los 30 días. La materia seca, la materia orgánica y el contenido total de nitrógeno se analizaron de acuerdo a la AOAC (1999). La fibra detergente neutro (aNDF) y fibra detergente ácida (ADF) se analizaron a acuerdo a Van Soest *et al.*, (1991). Para el análisis de las fibras se utilizó el analizador de fibra Ankom (Ankom Technology Corp., NY). AL final del experimento (58 d) se tomaron muestras de líquido ruminal.

6.13 Obtención del líquido ruminal, medición de ácidos grasos volátiles (AGV) y nitrógeno amoniacal (N-NH₃)

El líquido ruminal se colectó por sonda esofágica 4 h después de alimentarlos. Se filtró a través de 4 capas de gasa e inmediatamente se midió el pH (pHmeter®), el líquido ruminal filtrado se subdividió en dos fracciones, la primera para la determinación de AGV por cromatografía de gases (Erwin *et al.*, 1961), donde se fijaron con ácido metafosfórico al 5% en proporción líquido ruminal: ácido de 4:1; la segunda para la determinación de actividad enzimática de acuerdo con la metodología antes descrita. Las muestras se congelaron (-10 °C) inmediatamente hasta su posterior procesamiento.

Para conocer el perfil de AGV's, las muestras se centrifugaron a 18 100 x g durante 20 min. Del sobrenadante de cada muestra se tomó 1 µL y se inyectó en un cromatógrafo de gases (Perkin Elmer, modelo Clarus 500) con columna capilar (Elite PFAP) (Erwin *et al.*, 1961). Se usó H₂ como gas acarreador a un flujo de 5.5 mL min⁻¹ la temperatura del inyector y detector fue de 250 °C, la del horno de 80 °C durante 1 min, con incrementos de 20 °C por min hasta alcanzar 140 °C (Kung y Hession, 1995). Para medir la concentración de N-NH₃, se tomaron 20 µL del mismo

sobrenadante y se vertieron en tubos de 10 mL, adicionando 1 mL de fenol (10%) y 1 mL de hipoclorito de sodio (5%), se incubaron en baño de agua a 38 °C por 30 min. La absorbancia se leyó con un espectrofotómetro (Varian, modelo CARY I-E) a 630 nm (McCollough, 1967).

6.14. Determinaciones enzimáticas del líquido ruminal

Las muestras de líquido ruminal se descongelaron y colocaron en un sonicador durante dos lapsos de 10 minutos por 5 de reposo; posteriormente se agitaron manualmente. La muestra sonicada se centrifugó a 15,000 x g durante 15 min a 4 °C (Hristov *et al.*, 2008). El extracto obtenido se consideró como extracto enzimático ruminal y se le midió la actividad enzimática como se indicó en la sección 6.5.

6.15. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados con un diseño completamente aleatorio usando el procedimiento de GLM (General Lineal Model), el peso inicial de los corderos se uso como covariable, la comparación de medias se realizó con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). También se evaluó el efecto lineal y cuadrático del nivel de enzima con el paquete estadístico SAS versión 9, (Steel *et al.*, 1997).

7. Resultados y discusión

7.1. Producción de enzimas lignocelulolíticas en cultivo superficial

En diferentes procesos industriales se utiliza el cultivo superficial debido a que tiene la ventaja de ser simple en su operación, económico y menos sensible a las variaciones ambientales; además de que puede usarse como criterio de selección. Para buscar cepas que produzcan más enzimas, entre otros metabolitos. Sin embargo, las bajas producciones tienden a volver obsoleta esta técnica de cultivo (García *et al.*, 2003).

Se observó que *Fomes* sp. EUM1 fue capaz de crecer y producir enzimas lignocelulolíticas (celulasas, xilanasas y lacasas) en un rango amplio de pH (4.5 a 7.4). Además de ser un microorganismo termotolerante (Ordaz *et al.*, 2012) con características deseables para diferentes procesos biotecnológicos.

7.1.3. Rastrojo y pajas de cereales

En el Cuadro 3 se muestran los datos obtenidos para el uso de pajas y rastrojos como sustrato para crecer a *Fomes* sp. EUM1. El crecimiento del hongo en rastrojo de maíz, la paja de trigo, la paja de cebada y el tallo de alfalfa fue similar ($P > 0.05$), sólo el rastrojo de leguminosa presentó el menor valor de longitud de crecimiento (4.74 cm), mostrando diferencia entre los sustratos evaluados ($P < 0.05$). Esto pudo estar originado por el pH inicial en el cual se desarrolló el cultivo o bien por la composición química del rastrojo.

A pesar de que no hubo diferencias significativas en la longitud final del diámetro de crecimiento, es posible que el uso de diferentes sustratos modifique la velocidad de crecimiento. Por ejemplo, Ordaz (2008) reporta que la velocidad de crecimiento de *Fomes* sp. EUM1 fue 67% superior sobre rastrojo de maíz que sobre mezclas paja de avena.

Cuadro 3. Actividad enzimática de *Fomes* sp. EUM1 a los 7 días de crecimiento cultivado en caja Petri sobre diferentes pajas y rastrojos.

Subproducto	pH	Diámetro de la colonia (cm)	Actividad enzimática UI mL ⁻¹		
			Celulasas	Xilanasas	Lacasas
RM	7.2	6.2 ± 0.96 ^a	18.25 ± 1.81 ^a	17.5 ± 1.60 ^b	0.9 ± 0.1 ^a
PT	5.4	7.4 ± 0.18 ^a	9.65 ± 2.38 ^b	12.5 ± 2.00 ^c	1.1 ± 0.2 ^a
PC	6.3	5.5 ± 2.9 ^{ab}	3.3 ± 0.37 ^c	26.6 ± 3.32 ^a	0.4 ± 0.06 ^b
TA	5.9	7.3 ± 0.37 ^a	9.2 ± 1.72 ^b	10.1 ± 0.92 ^{c,d}	0.4 ± 0.08 ^b
RL	7.4	4.7 ± 0.77 ^b	11.6 ± 0.75 ^b	7.9 ± 1.60 ^d	0.5 ± 0.1 ^b

Letras diferentes en el superíndice de la mismas columna indican diferencias estadísticas ($P < 0.05$). RM: rastrojo de maíz; PT: paja de trigo; PC: paja de cebada; TA: tallo de alfalfa; RL: rastrojo de leguminosa.

Por otra parte, Quiroz-Castañeda *et al.*, (2011) reportan que al crecer a los hongos *Bjerkandera adusta* y *Pycnoporus sanguineus* en diferentes sustratos (aserrín, paja de trigo, cascarilla de arroz, cáscara de semilla de jatrofa y rastrojo de maíz) no se modificó el diámetro de crecimiento, la cual fue aproximadamente de 9 cm en cada

caso, pero sí se modifica la velocidad de crecimiento. Además encontraron que *Bjerkandera adusta* crece más rápido en rastrojo de maíz (1.2 veces) que en paja de trigo, mientras que para *Pycnoporus sanguineus* sucede lo contrario.

El manejo de diferentes sustratos para el crecimiento de *Fomes* sp. EUM1 ha repercutido en la producción diferencial de enzimas lignocelulolíticas. Después de siete días de crecimiento se midió la actividad de celulasas, xilanasas y lacasas. Los resultados obtenidos muestran que la mayor producción de enzimas celulólicas fue encontrada sobre rastrojo de maíz (18.2 UI mL^{-1}).

La paja de cebada presentó la menor actividad celulólica ($P < 0.05$), pero la longitud de crecimiento miceliar entre ambos sustratos no cambió. Contrariamente a la actividad de celulasas, la máxima actividad xilanólica de *Fomes* sp. EUM1 (Cuadro 3) mostró que la paja de cebada alcanzó 26.58 UI mL^{-1} , presentando diferencias significativas con los demás sustratos. Se observó que la producción de xilanasas en rastrojo de maíz fue 2 veces superior al rastrojo de leguminosa.

Para las xilanasas se observa que el tallo de alfalfa y el rastrojo de leguminosa (Orden: Leguminosas) muestran la menor actividad, lo cual puede estar relacionado con el menor contenido de hemicelulosa y lignina. Por lo que se puede suponer que el pico máximo de esta actividad se haya realizado dentro de los primeros días de cultivo.

Para la actividad lacasas de *Fomes* sp. EUM1 la mayor producción se obtuvo con paja de trigo y el rastrojo de maíz, con una nivel de actividad de 1.05 y 0.9 UI mL^{-1} ,

respectivamente, mostrando diferencias con respecto al resto de los sustratos evaluados. Por lo que, el uso de *Fomes* sp. EUM1 muestra versatilidad sobre diferentes sustratos.

Estos resultados muestran que no hay una relación entre la producción de enzimas lignocelulolíticas respecto al uso de algún sustrato, y que también depende de la presencia de algún compuesto inductor o bien si el sustrato fue sometido a un procedimiento adicional para lo cual también se trabajó con sustratos que fueron previamente ensilados.

7.1.2. Mezclas de pajas y ensilados

Los niveles de actividad enzimática alcanzados en los sustratos mezclados o previamente ensilados se observan en el Cuadro 4. La longitud de crecimiento no cambió ($P > 0.05$) entre tratamientos. En lo que se refiere a las actividad lignocelulolítica, el sustrato PTMR (paja de trigo: tomate: remolacha) presentó la mayor actividad de celulasas (15.4 UI mL^{-1}) así como de xilanasas (28.7 UI mL^{-1}), siendo superior ($P < 0.05$) a los otros sustratos.

Por otra parte, la mayor actividad de lacasas (0.6 UI mL^{-1}) se encontró al utilizar el ensilado de la mezcla de paja de trigo: tomate: remolacha (ER). Este valor fue 6.5 veces mayor al encontrado para el mismo sustrato, pero sin ensilar (PTMR). En cambio, la actividad de lacasas en el sustrato PTM (paja de trigo: tomate) y el mismo sustrato ensilado (ET) fue similar (0.4 UI mL^{-1}).

Cuadro 4. Actividad enzimática de *Fomes* sp. EUM1 a los 7 días de crecimiento cultivado en caja Petri sobre diferentes mezclas de pajas y ensilados.

Subproducto	pH	Diámetro de la colonia (cm)	Actividad enzimática UI mL ⁻¹		
			Celulasas	Xilanasas	Lacasas
PTM	4.8	7.6 ± 0.32 ^a	8.25 ± 2.14 ^b	9.30 ± 1.22 ^{b,c}	0.4 ± 0.03 ^b
PTMR	4.5	7.6 ± 0.18 ^a	15.35 ± 1.41 ^a	28.70 ± 3.18 ^a	0.1 ± 0.01 ^c
ET	4.7	7.7 ± 0.21 ^a	3.51 ± 1.26 ^c	11.16 ± 1.59 ^b	0.4 ± 0.05 ^b
ER	5.2	3.8 ± 0.3 ^b	3.43 ± 0.49 ^c	6.91 ± 0.92 ^c	0.6 ± 0.01 ^a

Letras diferentes en el superíndice de la mismas columna indican diferencias estadísticas ($P < 0.05$).

PTM: paja de trigo con tomate; PTMR: Paja de trigo con tomate y remolacha; ET: ensilado de PTM; ER, ensilado de PTMR.

En los sustrato ensilados, el ER tuvo 65% mayor actividad de lacasas en comparación con el sustrato correspondiente que no pasó por este proceso (PTMR). Chen *et al.*, (2012) reportan que el proceso de ensilaje de rastrojo de maíz facilita la penetración de lacasas en el complejo lignocelulosa al romper parcialmente la pared celular y dejar expuestos sitios de acción para enzimas lignolíticas, lo cual mejora la degradación de la lignina. Por tanto este proceso puede facilitar la producción de enzimas de interés biotecnológico.

7.1.3 Subproductos agrícolas

En el Cuadro 5 se muestran los niveles de actividad enzimática de *Fomes* sp. EUM1 cultivado en subproductos agrícolas. La longitud de crecimiento fue mayor en los sustratos en los cuales se detectaron todas las enzimas lignocelulolíticas, orujo de oliva 1 y harina de girasol. En estos sustratos la actividad de celulasas no mostró diferencias entre ellos ($P < 0.05$), no obstante, la actividad de xilanasas en la harina de girasol aumentó 75% con respecto al orujo de oliva 1 y más del triple con respecto al orujo de oliva 2.

Cuadro 5. Actividad enzimática de *Fomes* sp. EUM1 cultivado en caja Petri sobre diferentes subproductos agrícolas, a los 7 días de crecimiento.

Subproducto	pH	Diámetro de la colonia (cm)	Actividad enzimática UI mL ⁻¹		
			Celulasas	Xilanasas	Lacasas
OO1	6.6	6.2 ± 0.35 ^a	9.64 ± 3.00	15.15 ± 2.8 ^b	0.10 ± 0.005 ^b
OO 2	5.5	2.8 ± 0.34 ^b	ND	7.70 ± 2.0 ^c	0.13 ± 0.02 ^b
HG	6.4	6.3 ± 0.44 ^a	7.10 ± 1.22	26.58 ± 2.0 ^a	0.53 ± 0.04 ^b
AU	5.3*	5.6 ± 0.37 ^a	ND	ND	1.62 ± 0.15 ^a

Letras diferentes en el superíndice de la mismas columna indican diferencias estadísticas ($P < 0.05$). OO1: alperujo de oliva seco; OO2: alperujo de oliva humedo; HG: harina de girasol; AU: alperujo de uva.

*pH amortiguado con buffer de citratos 25 mM.

Las enzimas ligninolíticas producidas por los hongos de podredumbre blanca tienen un papel muy importante en el proceso de detoxificación del alperujo. Se ha observado una relación estrecha entre el descenso del contenido fenólico y el

aumento de la producción de lacasas y Mn peroxidasa. Asimismo, las enzimas celulasas, pectinasas y xiloglucanasas producidas por los hongos reducen la fitotoxicidad del alperujo (Aranda, 2006).

Al utilizar el alperujo de oliva, Aranda *et al.*, (2006) encontraron que las cepas de *Pycnoporus cinnabarinus* y *Coriolopsis rigida* redujeron el contenido de fenoles en un 73% después de 15 días de cultivo. Estos autores, indicaron que *Pycnoporus cinnabarinus* tiene actividad de lacasas después de 5 días de cultivo, mientras que *Coriolopsis rigida* a los 15 días, lo que sugiere una relación significativa entre la actividad de lacasas y el decremento del contenido de fenoles.

Estudios previos, evaluaron la capacidad del hongo *Pycnoporus coccineus* para secretar lacasas bajo diferentes condiciones de cultivo, evaluaron diferente componentes fenólicos y no fenólicos del alperujo de oliva y reportaron que este subproducto es capaz de aumentar la producción y estabilidad al pH de las lacasas (Jaouani *et al.*, 2005).

Por otra parte, la adición de alperujo de oliva (200 g por oveja al día) en dietas para ovejas lecheras mostró que la calidad de la leche se mejoró debido al aumento en los ácidos grasos insaturados (Mandaluniz *et al.*, 2010). A pesar de que en el alperujo de uva no se detectaron enzimas hidrolíticas, este sustrato indujo la mayor actividad ligninolítica (1.6 UI mL^{-1}), incluso similar a la encontrada en el rastrojo de maíz (Cuadro 3).

Con base en lo anterior, se puede decir que el rastrojo de maíz y la paja de trigo son los sustratos que al inducir mayormente la expresión de enzimas lignocelulolíticas pueden ser utilizados para realizar cinéticas de actividad enzimática en medio sólido. A pesar de que el alperujo de uva también mostró una elevada actividad de las enzimas lacasas, no se logró detectar la actividad de celulasas y xilanasas.

Dada la importancia económica y el volumen generado, así como el impacto ecológico del rastrojo de maíz en la alimentación animal se optó por desarrollar estudios de cinética de producción y estabilidad de extractos crudos enzimáticos producidos con este sustrato.

7.2. Producción de enzimas lignocelulolíticas en cultivo en medio sólido

Esta técnica se utilizó para producción de enzimas lignocelulolíticas por *Fomes* sp. EUM1 sobre rastrojo de maíz, por ser el sustrato que en caja Petri mostró la mayor producción de enzimas celulasas, en comparación con los otros subproductos agroindustriales evaluados. Aunado a esto, la producción de lacasas en este sustrato fue mayor y no mostró diferencias ($P > 0.05$) con respecto a la paja de cebada. Además de que el CMS es un proceso económico y eficiente para la producción de enzimas lignocelulolíticas a partir de hongos (Iwashita, 2002).

Adicionalmente, se evaluó como un segundo tratamiento al rastrojo de maíz suplementado con 20 % de salvado de trigo, debido a que la suplementación con

salvado de trigo mejora tanto el crecimiento micelial del hongo, como la producción de enzimas celulasas y xilanasas (Kapoor *et al.*, 2009).

Se obtuvo el extracto crudo enzimático de los dos sustratos evaluados (Extracto de rastrojo de maíz, Ext Rm; y Extracto de rastrojo de maíz suplementado con salvado de trigo, Ext Rm:St) a los que se les determinó la actividad enzimática de celulasas, xilanasas y lacasas. En el Gráfico 1 se muestra la actividad de celulasas en los dos sustratos evaluados a lo largo de 8 días de cultivo.

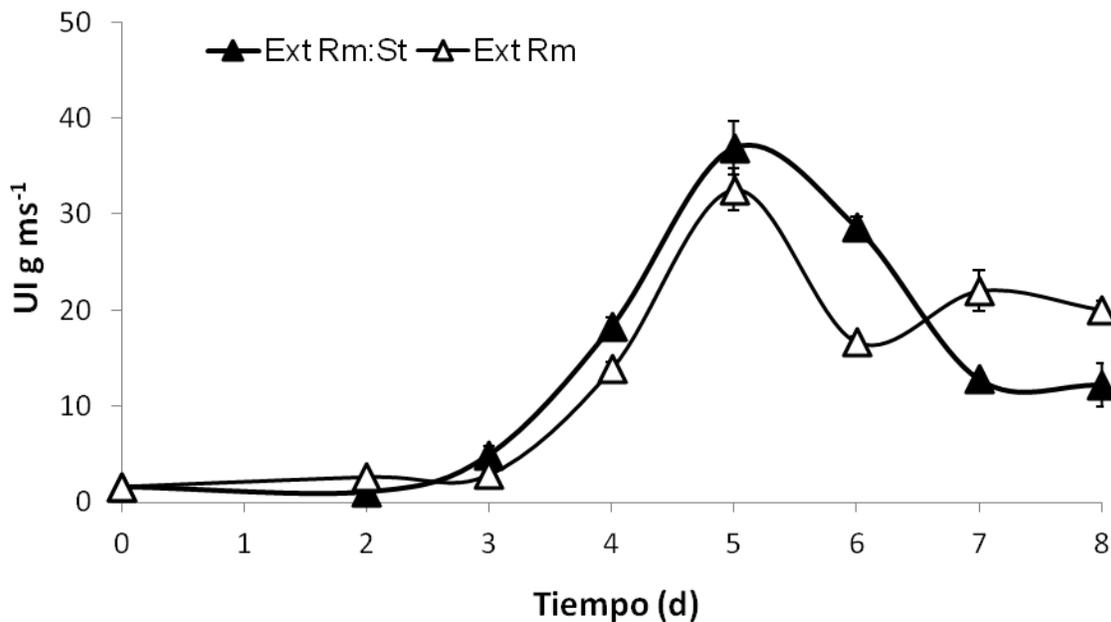


Gráfico 1. Producción de celulasas sobre rastrojo de maíz (Ext Rm) y suplementado con 20% de salvado de trigo (Ext Rm:St).

El Ext Rm de *Fomes* sp. EUM1 alcanzó su producción celulolítica máxima a los 5 días de cultivo (33 UI gMS⁻¹), después de este punto la actividad disminuye en un 40%. Un comportamiento semejante se encontró con el Ext Rm:St, al presentarse el

máximo incremento de actividad (37 UI gMS^{-1}) a los 5 días de cultivo, aunque la producción de enzimas disminuyó 60%, en ambos tratamientos no hubo diferencias significativas entre ellos.

Los resultados obtenidos con rastrojo de maíz coinciden con los encontrados por Ordaz (2008), quien reportó que este basidiomiceto tiene una actividad celulolítica superior a las 30 UI g MS^{-1} a una temperatura de $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Además, al utilizar como sustrato el bagazo de caña para la producción de celulasas, Marquez-Araque *et al.*, (2007) reportaron una producción de 8.5 UI g MS^{-1} , por lo que el uso del rastrojo de maíz incrementa hasta 4 veces la producción de enzimas celulolíticas.

Contrariamente, Kapoor *et al.*, (2009) reportaron que la actividad de celulasas de *Lentinula edodes* se incrementó (73%) en paja de trigo suplementado con 20% de salvado de trigo, en comparación con sólo paja de trigo. En el presente trabajo el uso de rastrojo de maíz con salvado de trigo no incrementó la producción de celulasas en los tiempos evaluados.

En el Gráfico 2 se muestra la actividad de xilanasas en los dos extractos evaluados; (Ext Rm) (Ext Rm:St); a lo largo de 8 días de cultivo. El ECE de *Fomes* sp. EUM1, obtenido a partir del tratamiento rastrojo de maíz alcanzó su pico de producción a los 5 días de cultivo (78 UI gss^{-1}), y a partir de este tiempo disminuye.

De igual manera, se observa que el agregar 20% de salvado de trigo aumentó la actividad xilanolítica (160 UI gss^{-1}) a más del doble, con respecto a la actividad en el

rastrojo de maíz. También se observó que la producción de xilanasas descendió al día 7 y 8 de cultivo en ambos tratamientos.

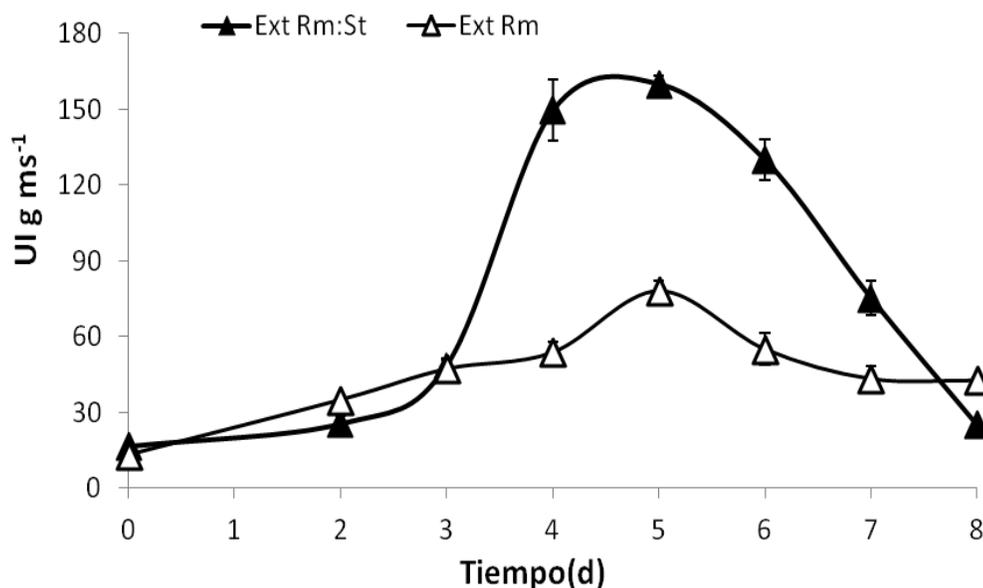


Gráfico 2. Producción de xilanasas sobre rastrojo de maíz (Ext Rm) y suplementada con 20% de salvado de trigo (Ext Rm:St).

Estudios previos con este microorganismo indican que *Fomes* sp. EUM1 alcanza actividades de xilanasas de 147 UI g MS⁻¹ sobre bagazo de caña a los 14 días de cultivo (Márquez-Araque *et al.*, 2007). Estos valores coinciden a los encontrados en esta investigación, sin presentar diferencia en los valores de máxima producción; sin embargo, la productividad de xilanasas llegó a ser 13 veces mayor al emplear el rastrojo de maíz con salvado de trigo como sustrato. De forma semejante, Ordaz (2012) reporta valores de actividad de xilanasas de 150 UI g MS⁻¹ después de seis días de cultivo sobre rastrojo de maíz incubado a 40 °C. Estos resultados concuerdan con el incremento del 75% en la actividad xilanólítica cuando se suplementa la paja de trigo con salvado de trigo (Kapoor *et al.*, 2009).

La actividad de lacasas de *Fomes* sp. EUM1, se presentan en el Gráfico 3. El Ext Rm:St nuevamente produjo la mayor actividad enzimática el día 5 (3 UI g MS⁻¹) hasta el día 7 (3.1 UI g MS⁻¹) en comparación con el Ext Rm. La actividad máxima de las lacasas encontrada al usar sólo rastrojo de maíz sucedió el día 6 (2.2 UI gMS⁻¹) y aumentó para el día 8 (2.68 UI gss⁻¹) aunque fue menor comparado con el Ext Rm:St.

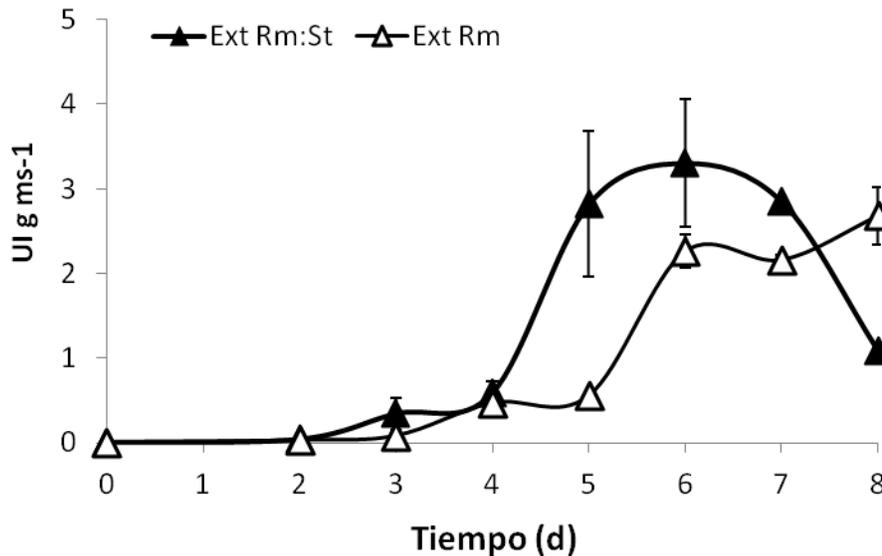


Gráfico 3. Producción de lacasas sobre rastrojo de maíz (Ext Rm) y suplementado con 20% de salvado de trigo (Ext Rm:St).

En relación con la producción de enzimas, Nandakumar *et al.*, (1994) indicaron que el salvado de trigo causa una producción secuencial de enzimas, aspecto que se observa en los días 5 (mayor actividad de xilanasas y celulasas) y 6 (lacasas) de la cinética de producción. Por otra parte, Suguimoto *et al.*, (2001), encontraron que el hongo de *Pleurotus ostreatus* cultivado en una mezcla de bagazo de caña y salvado de trigo (5:1) incrementó la producción de lacasas (3.1 UI g⁻¹) cuando se uso alcohol veratrílico como inductor.

Gassara *et al.*, (2010) mencionan que la producción de lacasas también se puede inducir con CuSO_4 , ya que al utilizar residuos agroindustriales como la pulpa de manzana, con el hongo *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F-1767; la actividad de lacasas se incrementó hasta siete veces al aumentar la concentración de CuSO_4 de 0.5 a 1.5 mmol kg MS^{-1} .

Asimismo, Zhu *et al.*, (2011) reportaron valores de actividad de 45.1 UI g^{-1} , al crecer al *Trametes versicolor* en rastrojo de maíz suplementado con glucosa (9 mg/g) como fuente de carbono de fácil acceso, cultivando al 80% de humedad; sin embargo, en cuanto a la producción de xilanasas y celulasas sólo alcanzaron 8.2 UI g^{-1} y 4.3 UI g^{-1} , respectivamente.

Dinis *et al.*, (2009) evaluaron el perfil de producción de enzimas lignocelulolíticas de cuatro hongos: *Trametes versicolor*, *Bjerkandera adusta*, *Ganoderma applanatum* y *Phlebia rufa*. Los hongos se cultivaron en paja de trigo y los resultados muestran, en cada hongo, un perfil diferente en cuanto a la producción de enzimas celulasas, xilanasas, lacasas, así como otras enzimas con capacidad ligninolítica detectada al utilizar al hongo *Bjerkandera adusta*. La mayor actividad de lacasas se observó a los 7 días de cultivo; sin embargo, la actividad obtenida por *Ganoderma applanatum* fue 69% mayor en comparación con la actividad obtenida por *Trametes versicolor*. En el presente estudio la mayor actividad enzimática se obtuvo los 6 días de cultivo en ambos tratamientos, aunque la producción de lacasas aumentó desde el día 5 y se mantuvo sin diferencias hasta el día 7 en el Ext Rm:St.

Zhu *et al.*, (2011) encontraron que al tratar el rastrojo de maíz con *Trametes versicolor*, la máxima pérdida de lignina está correlacionada con el contenido de humedad; puesto que la degradación de la lignina es un proceso aerobio. La máxima actividad ligninolítica ocurre con un 80% de humedad, lo que permite que exista oxígeno suficiente para el crecimiento del hongo, la síntesis de enzimas y las reacciones oxidativas de la degradación de lignina.

Con base en los resultados anteriores, se observó que al suplementar al rastrojo de maíz con salvado de trigo se provocó un adelanto de 24 horas en la producción de enzimas con actividad de xilanasas y lacasas, principalmente. Además se confirma que la expresión de enzimas lignocelulolíticas depende del tipo y naturaleza del microorganismo, del sustrato, de las condiciones de humedad, del pH y de la presencia de sales o enriquecimiento del medio de cultivo o del uso de compuestos inductores.

Para descartar que los cambios en la actividad de las diferentes enzimas determinadas se debieran a cambios en el pH, éste se midió durante los 8 días de cultivo de *Fomes* sp. EUM1 en ambos sustratos. El pH en el cultivo (Gráfico 4) tuvo perfiles de poca variación, pH de 5.5, para ambos tratamientos hasta los 7 d de cultivo; sin embargo, se elevó a un valor máximo de 7.1 y 6.4, para el Ext Rm:St y Ext Rm, respectivamente (8 d), coincidiendo con la caída de las actividades enzimáticas.

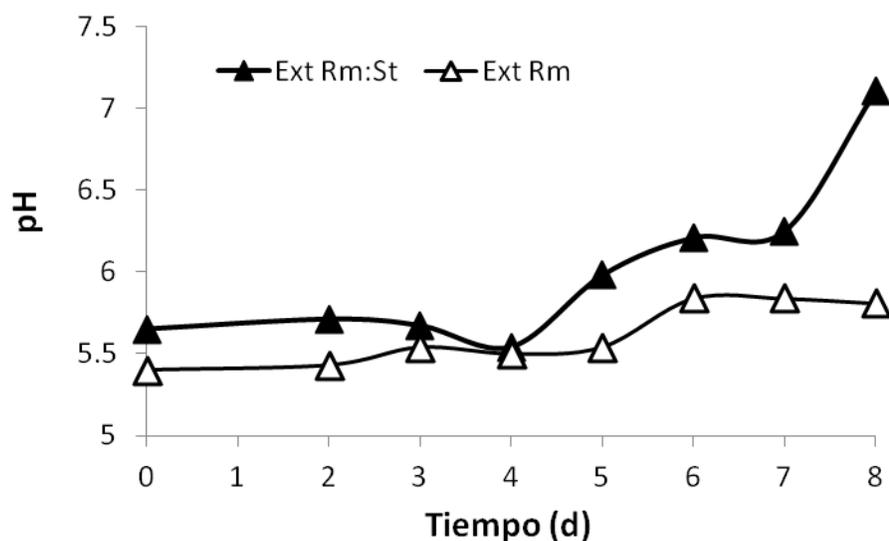


Gráfico 4. pH de extractos de rastrojo de maíz (Ext Rm) y rastrojo de maíz con salvado de trigo (Ext Rm:St).

Sin embargo, es importante notar que las mayores variaciones en las producciones enzimáticas se presentaron entre los cultivos en tiempos donde los valores de pH no eran sustancialmente distintos, es decir, dichas diferencias en actividades enzimáticas se explican por la presencia del salvado de trigo, más que por variaciones en el pH del cultivo.

El decremento de la actividad de las enzimas lignocelulolíticas evaluadas a los 7 y 8 días, coincide con el incremento de pH en el medio (Gráfico 4), esto puede indicar una hidrólisis proteolítica, ya que hay reportes que indican una producción simultánea de enzimas lignocelulolíticas y de proteasas (Xiaoping *et al.*, 2008; Ordaz, 2012). Cabaleiro *et al.*, (2002) encontraron que *P. chrysosporium* secreta enzimas proteolíticas, principalmente durante el metabolismo primario, mientras que *P. radiata* produce enzimas proteolíticas al iniciar el metabolismo secundario. De tal forma,

cuando mayor es la concentración de las proteasas en el medio de cultivo, más irregulares los perfiles de las enzimas ligninolíticas (Ordaz, 2012).

Los resultados obtenidos muestran que la actividad de celulasas, xilanasas y lacasas aumentó a los 5 y 6 días de cultivo, principalmente. Esto puede ser de gran importancia si se desea aprovechar estos extractos enzimáticos en la alimentación animal, ya que la acción conjunta de las enzimas exógenas mejoraría la digestibilidad de los forrajes, al hidrolizar los polímeros estructurales, principalmente de la lignina, la cual limita el aprovechamiento de los alimentos. En este sentido, los productos comerciales con actividad fibrolítica son incapaces de actuar en la lignina porque contienen mayoritariamente celulasas y xilanasas (Beauchemin *et al.*, 2004). Entonces, estudios previos que agregaron hongos de podredumbre blanca, como *T. versicolor* (Zhu *et al.*, 2011), *P. trufa* (Dinis *et al.*, 2009), *P. chrysosporium* (Sharma y Arora, 2010) y *Fomes* sp. EUM 1 (Villegas-Castañeda *et al.*, 2010; Márquez-Araque *et al.*, 2009), entre otros, mejoraron la degradación de la lignina entre un 2 y 65 %, dependiendo de la cepa esto puede variar.

7.2.1. Cinética de estabilidad de enzimas lignocelulolíticas

Los factores responsables de la estabilidad enzimática son varios; sin embargo, no existen reglas generales para la predicción de la estabilidad de proteínas (Almog *et al.*, 2003). En condiciones fisiológicas normales las proteínas se encuentran en su forma más estable (nativa). Sin embargo, con los cambios drásticos de temperatura, pH y la presencia de agentes desnaturizantes en el medio, las proteínas pueden ser susceptibles a la desnaturización. La estabilización estructural se puede

comprender si se entienden los mecanismos moleculares que impactan directamente a esta propiedad.

Entre los factores que contribuyen a la estabilidad se encuentran los puentes de hidrogeno, el empacamiento hidrofóbico, la exposición de la estructura secundaria, el incremento de residuos de prolina, la disminución de residuos termolábiles, el aumento en el área superficial polar, la interacción entre proteínas, la remoción de residuos sensibles a la oxidación o desanimación y el aumento de puentes salinos e interacciones electrostáticas (Nosoh y Sekiguchi, 1990; Kumar *et al.*, 2000).

Se observa en el Gráfico 5 los valores de actividad residual con respecto al tiempo para las enzimas celulasas de los extractos enzimáticos del día 6 de cultivo con el sustrato rastrojo de maíz (Ext Rm) y rastrojo de maíz con salvado de trigo (Ext Rm:St). Para el Ext Rm:St el $t_{1/2}$ fue de 5.86 h y la velocidad de inactivación (k) de -0.197 h ($R^2= 0.96$), mientras que para el Ext Rm:St, el $t_{1/2}$ fue de 4.94 h con una k de -0.233 h ($R^2= 0.98$). Los perfiles de estabilidad de celulasas no presentaron diferencias ($P>0.05$) para ambos extractos evaluados.

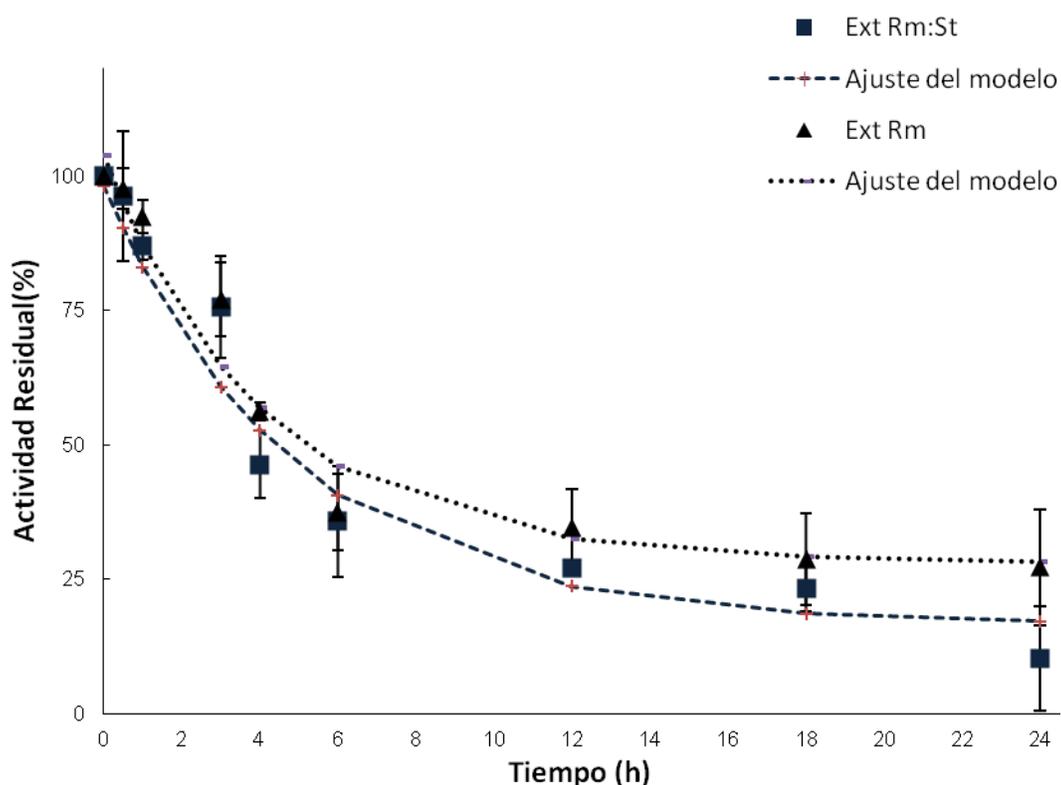


Gráfico 5. Estabilidad de celulasas incubadas a 39 °C a pH 7, del extracto enzimático obtenido de *Fomes* sp. EUM1 sobre rastrojo de maíz (Ext Rm) y rastrojo de maíz suplementado con 20 % de salvado de trigo (Ext Rm:St).

En el Gráfico 6 se observan los perfiles de actividad con respecto al tiempo para las xilanasas, donde el extracto obtenido de rastrojo de maíz tuvo un valor de $t_{1/2}$ de 4.1 h y una k de -0.26 h, con un R^2 de 0.94, mientras que al suplementar con salvado de trigo el $t_{1/2}$ fue de 4.76 h con una k de -0.321 h y un R^2 de 0.80.

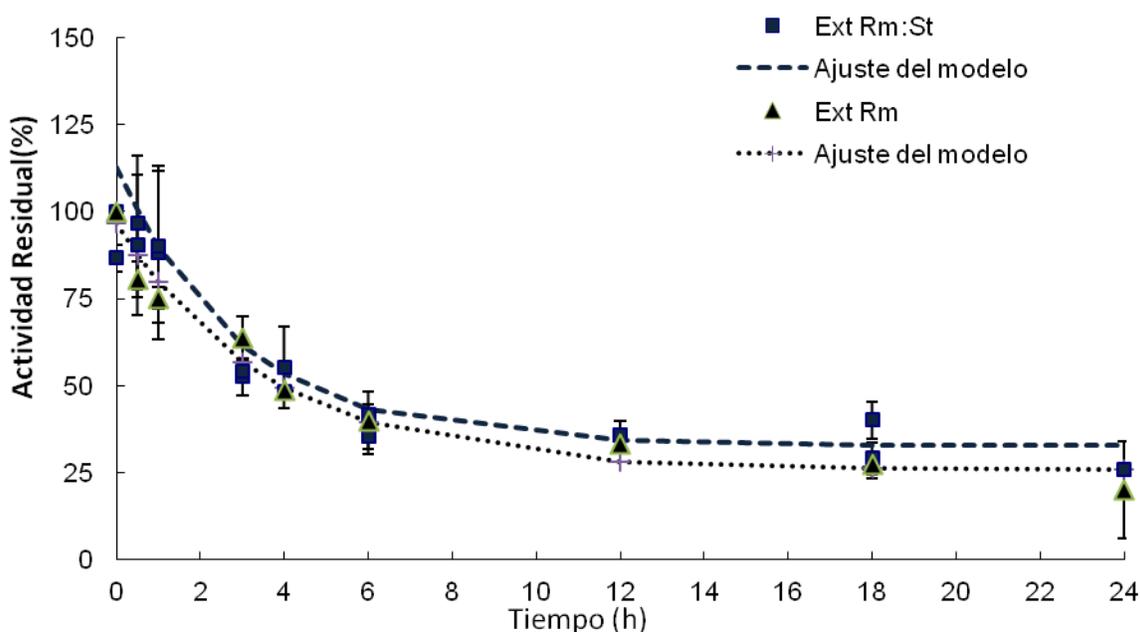


Gráfico 6. Estabilidad de xilanasas incubadas a 39 °C a pH 7, del extracto enzimático obtenido de *Fomes* sp. EUM1 sobre rastrojo de maíz (Ext Rm) y rastrojo de maíz suplementado con 20 % de salvado de trigo (Ext Rm:St).

La estabilidad de celulasas y xilanasas producidas por *Fomes* sp. EUM1 en el presente estudio las exhiben como alternativas en su uso en la nutrición animal debido a su tiempo de vida media alcanzado coincide a lo reportado por Pinos *et al.*, (2002) y Ramírez *et al.*, (2005), para el producto Fibrozyme (5.7 y 4.02 h, respectivamente). Otro aspecto favorable es que las enzimas exógenas se agregan a los forrajes usualmente en forma líquida antes de ofrecerlo al animal, por lo que el hacer una previa incubación podría contribuir en su estabilidad por la formación del complejo enzima-sustrato, debido a que el contacto previo de la enzima con el sustrato aparentemente favorece el efecto de la enzima (McAllister *et al.*, 1999).

Por otra parte, Morgavi *et al.*, (2000) reportaron que las enzimas hidrolíticas de *Aspergillus niger* son estables por 6 h en líquido ruminal; sin embargo, estudios relacionados con el pre tratamiento de forrajes que incluyan el aporte de las lacasas de los extractos de *Fomes* sp. EUM1 (Marquez-Araque *et al.*, 2009), son pocos. El efecto de los ECE agregados en la nutrición animal depende en gran medida de la fuente de enzima y de la estabilidad del ECE (Hristov *et al.*, 1998).

En el Gráfico 7 se muestra la actividad residual de los extractos enzimáticos para la actividad de lacasas fue de 12.08 h, con una k de -0.061 h y una R^2 de 0.90 para el Ext Rm; mientras que para el Ext Rm:St fue de 26.64 h, con una velocidad de decaimiento de -0.021 h ($R^2= 0.87$). Se observa que el $t_{1/2}$ de lacasas para el Ext Rm:St fue 50 % mayor e comparación son solo rastrojo de maíz. Esto probablemente se debió a alguna isoenzima que además de aumentar la actividad (Gráfico 3) le confirió mayor estabilidad. Estos resultados coinciden a lo reportado para *Fomes sclerdermeus* cultivado sobre salvado de trigo (Papinutti *et al.*, 2008), donde se conserva el 75% de la actividad en 24 h (pH de 6 a 40°C).

Estudios previos han demostrado que las lacasas pueden liberar iones de cobre a altas temperaturas. De tal manera que el agotamiento de los iones de cobre no sólo inactiva la enzima, sino también, desacopla los dominios de la proteína; sin embargo es un proceso reversible (Koroleva *et al.*, 2001).

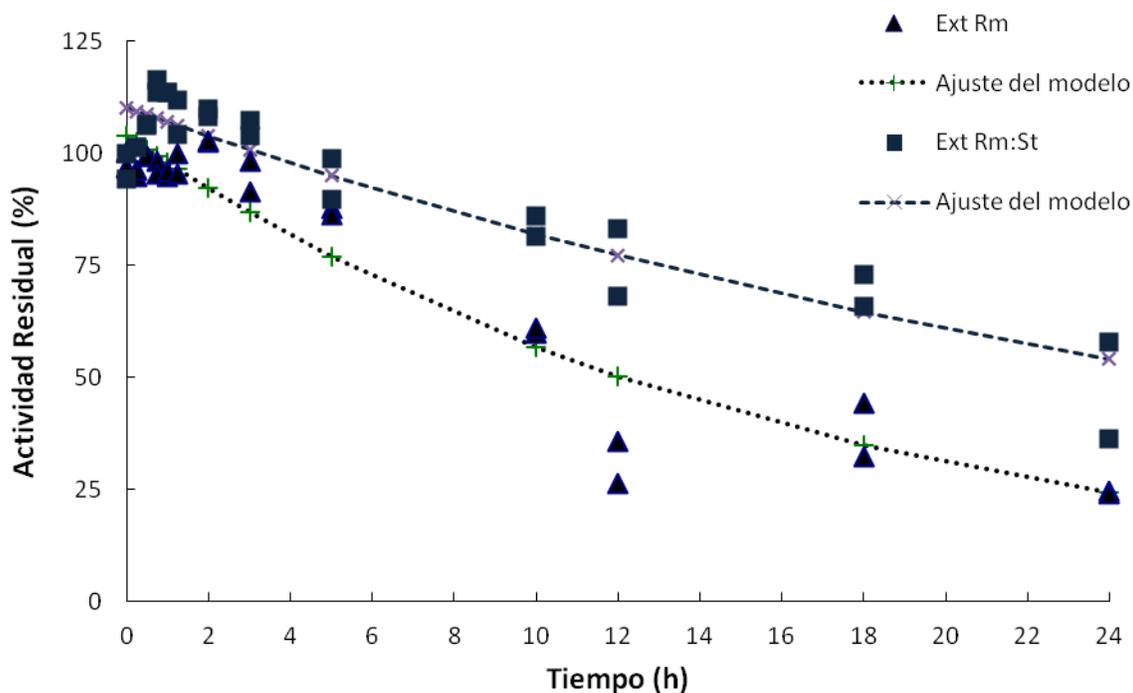


Gráfico 7. Estabilidad de lacasas incubadas a 39 °C a pH 7, del extracto enzimático obtenido de *Fomes* sp. EUM1 sobre rastrojo de maíz (Ext Rm) y rastrojo de maíz suplementado con 20 % de salvado de trigo (Ext Rm:St).

Chefetz *et al.*, (1998) reportaron que la vida media de las lacasas producidas por el hongo termófilo *Chaetomium thermophilum* fue de 24 h a 40 °C, y disminuyó a 12 h al incrementar la temperatura de cultivo a 50 °C. Hay reportes que indican la posibilidad de estabilizar a las proteínas por la adición de solutos de bajo peso molecular; compuestos como azúcares (Baptista *et al.*, 2000), polioles (Costa *et al.*, 2002) y sales (Baptista *et al.*, 2000) pueden aumentar la estabilidad térmica de las enzimas. En particular, el papel de polioles en la estabilización de las enzimas está relacionado con la capacidad de estas moléculas de captar moléculas de agua, creando un estado de competencia con la proteína por el agua presente, lo que

conduce a su desnaturalización (Costa *et al.*, 2002). Por lo tanto, la inactivación de las lacasas ocurre a través de al menos dos eventos: la falta de un compuesto que disminuya la hidratación, y el agotamiento de los iones de cobre.

El tiempo de vida media en los ECE de *Fomes* sp. EUM1 sugieren su evaluación sobre forrajes debido a que las enzimas fibrolíticas exógenas tienen un efecto en el sustrato con o sin líquido ruminal durante las primeras 12 h (Pinos-Rodríguez *et al.*, 2002).

7.3 Producción de gas y digestibilidad *in vitro*

Predecir el potencial de las enzimas exógenas para aumentar la degradación de la pared celular en el rumen con base en su caracterización bioquímica no ha sido posible (Colombatto *et al.*, 2003). Por lo que es necesario evaluar los extractos mediante la experimentos *in vitro*. La técnica de producción de gas predice la fermentación ruminal de los carbohidratos solubles y estructurales de los alimentos utilizados en la dieta de animales. Otra ventaja es que los métodos *in vitro* son menos costosos, requieren menos tiempo, y permiten un mayor control de las condiciones experimentales.

7.3.1 Tasa fraccional de producción de gas de rastrojo de maíz

En el Gráfico 8 se muestra, el perfil de la tasa fraccional de producción de gas del rastrojo de maíz, utilizado como forraje. El uso del Ext Rm y del Ext Rm:St aumentó la producción de gas a las 9 h de incubación (7.6 y $8 \text{ mL g}^{-1} \text{ h}^{-1}$), respectivamente. Mientras que el testigo sólo alcanzó $5.5 \text{ mL g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ($P < 0.05$).

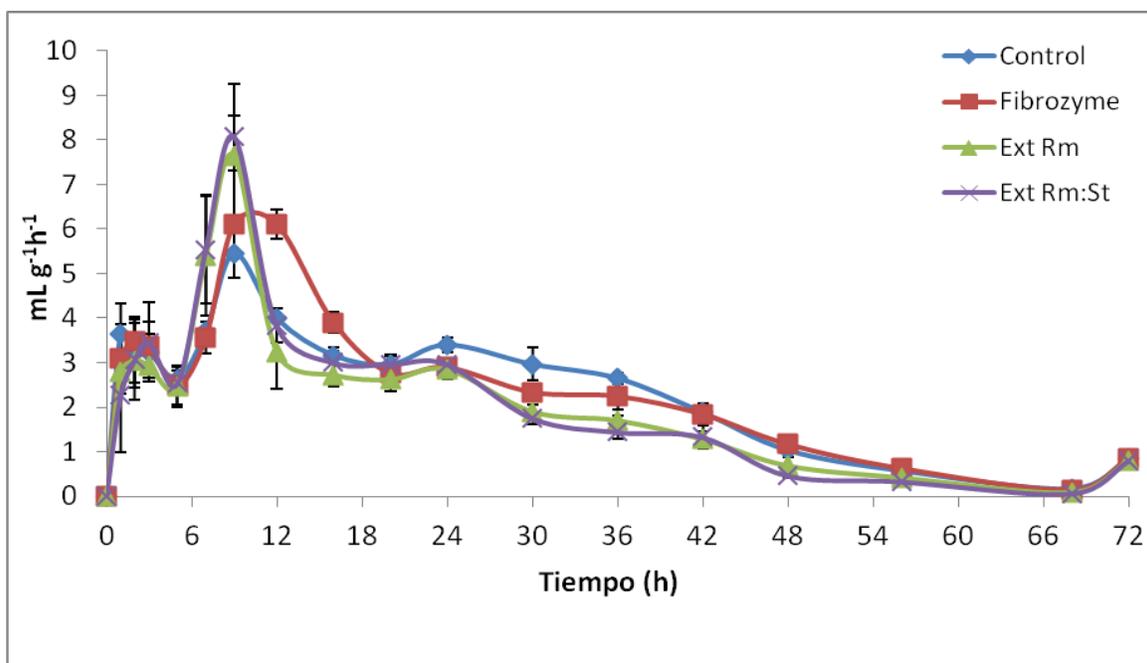


Gráfico 8. Tasa fraccional de producción de gas *in vitro* del rastrojo de maíz con diferentes extractos enzimáticos. Ext RM, extracto de rastrojo de maíz; Ext Rm:St, extracto de rastrojo de maíz con salvado de trigo.

La adición del producto Fibrozyme® a los forrajes no afectó ($P > 0.05$) la producción de gas comparado con la adición de los extractos de *Fomes* sp. EUM1, sin embargo, su tasa fraccional de producción de gas fue menor, esto puede indicar especificidad de las enzimas producidas por *Fomes* sp. EUM1, con relación al sustrato del cual se produjeron (rastrojo de maíz). Como se mostró en esta investigación la producción de las xilanasas y lacasas mediante cultivo en estado sólido empleando el rastrojo de maíz, aumentó al incorporar 20% de salvado de trigo al rastrojo de maíz sin afectar su estabilidad, aunado a esto, podemos observar que los extractos enzimáticos presentan un efecto positivo en la tasa fraccional de producción de gas.

Entre los factores involucrados en el efecto de las enzimas fibrolíticas exógenas están la dosis de enzimas (Colombatto *et al.*, 2007) y el tipo de dieta (Pinos-Rodríguez *et al.*, 2008). Al respecto, Almaraz *et al.*, (2010) obtuvieron líquido ruminal de corderos alimentados en una dieta alta en concentrado (70%) y mostraron que la producción de gas presenta un efecto lineal al utilizar diferentes dosis de extractos enzimáticos (xilanasas). Esto sugiere que la dosis de enzima puede afectar favorablemente la producción de gas y la digestibilidad *in vitro* de la materia seca. En este estudio, a pesar de que los extractos de *Fomes* sp. EUM1 fueron evaluados a una sola concentración, se mejoró la producción de gas en las primeras horas de la incubación.

Por otra parte, Rodrigues *et al.*, (2008) usaron extractos enzimáticos de *Trametes versicolor* (Basidiomiceto) originados a partir de cultivo líquido y reportaron que la tasa fraccional de producción de gas aumentó después de 20 h de incubación en paja de trigo, por consecuencia se mejoraron las variables de cinética ruminal debido a que los extractos enzimáticos incrementaron la disponibilidad de carbohidratos fermentables (27 hasta 40%). Lo que podemos observar en este estudio, los extractos enzimáticos del hongo *Fomes* sp. EUM1 presentaron un incremento con respecto al control de 38 y 45% para el Ext Rm y Ext Rm:St, respectivamente, dentro de las primeras 10 h.

Villegas-Castañeda *et al.*, (2010) encontraron que al cultivar la paja de sorgo con *Fomes* sp. EUM1, el tratamiento fúngico disminuyó la producción de gas ($P > 0.05$). Debido a que los hongos de la pudrición blanca consumieron los nutrientes de la paja

durante su crecimiento y produjeron otros metabolitos durante su desarrollo, es decir, consumieron los carbohidratos solubles antes de degradar lignina (Krause *et al.*, 2003). Lo anterior sugiere que las preparaciones enzimáticas con actividad de xilanasas y de celulasas deberían favorecer la de degradación inicial del sustrato, pero estos efectos se reducen a medida que aumenta el tiempo de fermentación (Giraldo *et al.*, 2007; Nserko *et al.*, 2000) efecto que se observó en la cinética de fermentación del rastrojo de maíz.

En pruebas *in vitro* utilizando líquido ruminal de cabras se mostró que los extractos enzimáticos (celulasas y xilanasas) incrementaron la tasa de producción de gas en la paja de arroz, paja de trigo, rastrojo de maíz y rastrojo de maíz ensilado. Este efecto lineal positivo encontrado en el rastrojo de maíz se favoreció por la combinación de extractos enzimáticos adicionado con levaduras y por el nivel de enzima suplementada (Tang *et al.*, 2008).

Beauchemin *et al.*, (2008) reportaron el efecto de 23 diferentes productos enzimáticos y encontraron mediante regresión lineal que el incremento en la producción de gas no está asociado con actividades enzimáticas individuales, mencionan que la producción de gas se ve afectada negativamente al agregar altos niveles de xilanasas, lo que representa un detrimento de la fermentación ruminal, esto se correlaciona con la importancia de evaluar diferentes cocteles o extractos crudos enzimáticos, estableciendo la dosis enzimática precisa sobre un forraje en particular.

Al respecto, Jalilvand *et al.*, (2008) reportaron que la adición de enzimas en ensilados de maíz no cambio, al utilizar liquido ruminal de novillos, la cinética de fermentación no presentó efectos en la producción de gas *in vitro*, sin embargo, la adición de enzimas en la paja de trigo presentó un efecto significativo, resultando en tiempos de retardo cortos y cambios en las curvas de producción de gas. De hecho se incremento la tasas fraccional de gas entre las 6 y 12 h con el nivel de enzima bajo (3 g kg⁻¹ MS), mientras que esta tasa de producción se reduce cuando la enzima se aplicó a un nivel mayor. Estos resultados sugieren que el agregar enzimas afectará la fermentación en función de la fuente enzimática utilizada, del contenido de fibra y la composición de los polisacáridos del forraje.

7.3.2. Tasa fraccional de producción de gas de bagazo de caña

Por otra parte, el bagazo de caña es un recurso forrajero abundante en el trópico mexicano pero presenta de inconveniente su contenido escaso de proteína y baja digestibilidad, debido a que sus paredes celulares tienen un alto contenido de hemicelulosa, celulosa y lignina (Cano *et al.*, 2003). En el Gráfico 9 se observa que la adición de los ECE presentó un efecto positivo desde las 6 h de incubación en la tasa fraccional de producción de gas del bagazo de caña, para todos los tratamientos. Se presentó un pico inicial a la primera hora de fermentación, siendo de 1.9, 1.2, 2.1 y 1.7 mL g⁻¹ h⁻¹ para Fibrozyme, Ext Rm, Ext Rm:St y el testigo, respectivamente, esto es debido a que este forraje presenta carbohidratos solubles fácilmente fermentables.

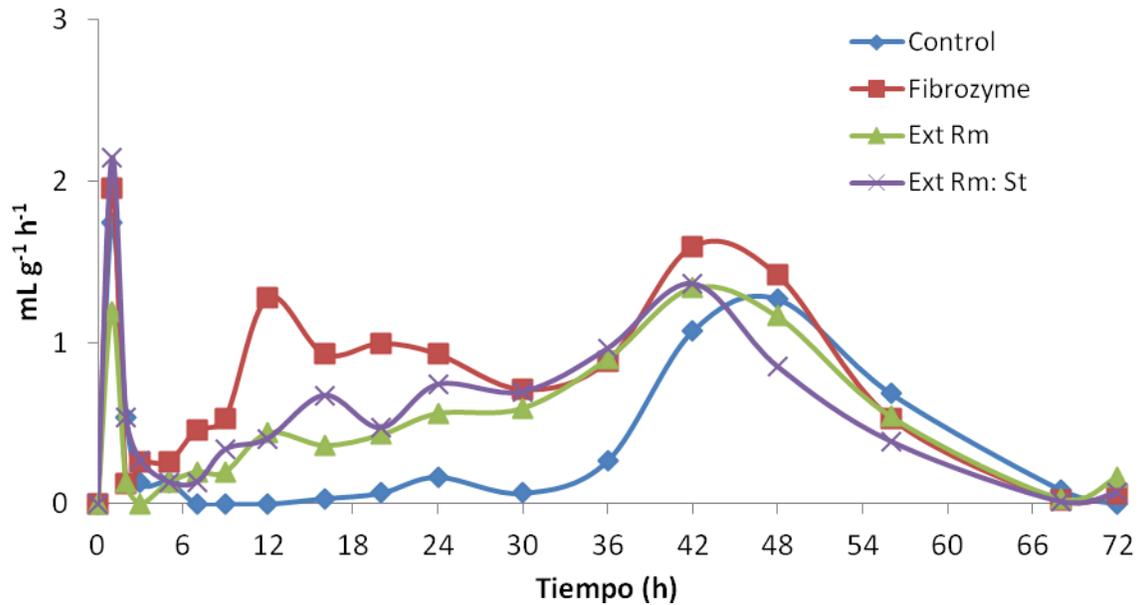


Gráfico 9. Tasa fraccional de producción de gas *in vitro* del bagazo de caña con diferentes extractos enzimáticos. Ext RM (extracto de rastrojo de maíz); Ext Rm:St (extracto de rastrojo de maíz con salvado de trigo).

La producción de gas desciende en todos los tratamientos sin presentar diferencias en el tiempo (2 a 7 h). Siguiendo con la cinética de producción de gas, el tratamiento con Fibrozyme alcanzó a las 12 h una producción de gas de 1.2 mL g⁻¹ h⁻¹. Ambos tratamientos (Ext Rm y Ext Rm:St) también aumentaron la producción de gas (0.40 mL g⁻¹ h⁻¹) en el mismo tiempo (12 h), presentado diferencias con respecto al control ($P < 0.05$). El tratamiento control solo alcanzó el volumen de gas producido de los tratamientos con extractos hasta las 42 h. Lo cual también indica el efecto positivo alcanzado al reducir la fase lag para este forraje. Para todos los tratamientos a las 48 h comenzó a disminuir la producción de gas.

A pesar de que la tasa de producción de gas mostró una respuesta positiva a la incorporación de los ECE de *Fomes* sp. EUM1, los valores fueron 5 veces menores a los reportados por Peláez *et al.*, (2011), quienes al realizar una fermentación en estado sólido con el hongo *Pleurotus ostreatus* sobre bagazo de caña encontraron que la producción de gas se ve favorecida, lo cual fue atribuido a la acción de las enzimas producidas durante su crecimiento en el bagazo, es necesario mencionar que el cultivo del hongo en el bagazo de caña se complementa con un proceso de ensilaje, el cual incrementó los ácidos orgánicos y flora microbiana que promovieron una mayor disponibilidad de carbohidratos estructurales y solubles en la pared celular del material ensilado.

El efecto de los extractos enzimáticos dependió de la fuente de enzimas (extracto de *Fomes* sp. EUM1 o Fibrozyme) y del sustrato en el que se utilizaron. Aunado a lo anterior se ha reportado que el efecto de la adición de los extractos enzimáticos estará también en función de la fuente de inóculo, al respecto, González-García *et al.*, (2009) reportaron que el promedio en la producción de gas aumenta al utilizar inóculo ruminal de cabras comparado con el inóculo ruminal de vacas en lactancia, manifestando que en ambos líquidos ruminales la producción de gas se ve favorecida con proporciones altas en forraje (100:0 o 70:30) suplementadas con enzimas.

Aranda (2000), utilizó enzimas fibrolíticas (xilanasas y celulasas) en estudios *in vitro* y mostró un incremento de más del 3% en la digestibilidad de la materia seca en caña de azúcar, mostrando que hay un mayor crecimiento microbiano al adicionar

estas enzimas, probablemente debido a que después del tratamiento enzimático se originan nuevos dominios de unión a los carbohidratos.

7.3.3. Tasa fraccional de producción de gas de heno de alfalfa

La alfalfa es un forraje utilizado con frecuencia en la alimentación del ganado lechero en muchos países, continuamente se evalúa el potencial de este alimento para mejorar su utilización mediante el uso de enzimas exógenas. En este estudio el heno de alfalfa no presentó diferencias entre los tratamientos las primeras 6 h de incubación (Gráfico 10). La adición de Fibrozyme y de los ECE aumento la tasa de producción de gas entre las 6 y 12 h de incubación. Los ECE originados a partir de *Fomes* sp. EUM1, también presentaron diferencias favorables en la producción de gas con respecto al testigo.

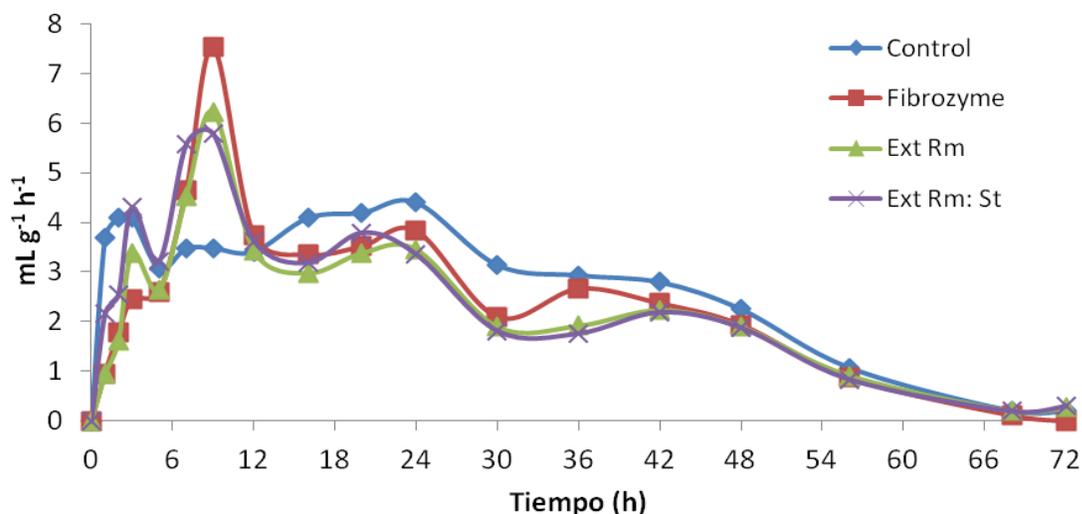


Gráfico 10. Tasa fraccional de producción de gas *in vitro* de heno de alfalfa con diferentes extractos enzimáticos. Ext Rm (extracto de rastrojo de maíz); Ext Rm:St (extracto de rastrojo de maíz con salvado de trigo).

En la cinética de producción de gas, con líquido ruminal de borregos con una dieta forraje concentrado (60:40), Mesgaran *et al.*, (2009) mostraron que la adición de una mezcla de celulasas, xilanasas, beta-glucanasas, alfa-amilasas, pectinasas, fitasas, proteasas y lipasas presentan un incremento en la producción de gas *in vitro* en el heno de alfalfa, estos autores sugieren que las enzimas exógenas trabajan de manera sinérgica con las enzimas de los microorganismos ruminales, durante la degradación de la fibra.

Diversos estudios muestran que la adición de extractos enzimáticos (endoglucanasas, xilanasas y proteasas) incrementa la producción de gas y la digestibilidad de la materia seca en diferentes tiempos de incubación (Eun y Beauchemin 2007). De acuerdo a lo anterior los extractos obtenidos a partir de *Fomes* sp. EUM1 podrían usarse en la alimentación de rumiantes, debido al efecto positivo sobre los diferentes subproductos agrícolas utilizados en el presente estudio. Sin embargo, el periodo adecuado para ver el efecto de enzimas fibrolíticas exógenas sobre los forrajes es durante las primeras 24 h de incubación (Eun y Beauchemin 2007).

7.3.4 Digestibilidad *in vitro* de la materia seca de los forrajes

El volumen máximo de gas acumulado (V_{max}) en la fermentación de los alimentos, el cual está relacionada con la cantidad, disponibilidad y composición química del sustrato. En el Cuadro 6 se observa en el rastrojo de maíz que el producto comercial y el control sin enzimas llegan a un V_{max} de 140 y 139 mL $g^{-1}h^{-1}$, respectivamente, presentando diferencias a favor cercanas al 15% con respecto a los tratamientos originados de *Fomes* sp EUM1 (Ext Rm y Ext Rm:St). Sin embargo, la digestibilidad

del rastrojo de maíz aumentó para Fibrozyme, Ext Rm y Ext Rm:St en un 12, 17 y 21% con la incorporación de enzimas, respectivamente, con respecto al control. La interpretación de estos resultados se apoya en lo reportado por Eun y Beauchemin (2007) quienes indicaron que la degradación de los sustratos es proporcional a la cantidad de endoglucanasas utilizadas.

Hay trabajos previos que mostraron que con celulasas de *Trichoderma reesei* se aumentan los sitios de dominio de unión a la celulosa (Avicel), pero no son accesible para otros sistemas celulolíticos de hongos, como *Myrothecium verrucaria* (Abdul *et al.*, 2006). Resultados similares fueron reportados por Morgavi *et al.*, (2004) quienes observaron que la aplicación de extractos fibrolíticos exógenos de *Trichoderma* promueven la adhesión de *Fibrobacter succinogenes* S85, incrementando la degradación de ensilaje de maíz y heno de alfalfa pero no el de la celulosa pura. Esto sugiere que los extractos que se originaron del rastrojo de maíz presentan un sistema enzimático específico mayor sobre la digestibilidad de la materia seca, con respecto al producto comercial, el cual se originó por otras especies de hongos (*Trichoderma* y *Aspergillus*), y el tratamiento sin enzimas (control).

Por otra parte, al optimizar la producción de xilanasas de *Aspergillus niger* GS1 en cultivo en estado sólido (reactores de columna), las enzimas producidas fueron evaluadas en el rastrojo de maíz, encontrando que al utilizar inóculo ruminal de terneras de la raza Holstein (18 meses), se incrementa la digestibilidad *in vitro* del rastrojo de maíz, este efecto se ve determinado por el tiempo previo de contacto de

la enzima con el rastrojo de maíz (12 h), incrementándose en un 9 y 10% a las 48 y 72 h, respectivamente (Regalado *et al.*, 2010).

Cuadro 6. Producción de gas *in vitro* y evaluación de la DIVMS de forrajes con diferentes extractos enzimáticos.

Forraje	Tratamiento	<i>Vmax</i>				DIVMS (%)
		(mL g ⁻¹ MS)	L (h)	S (mL h ⁻¹)		
Heno de alfalfa	Control	179.4 ± 9.5 ^a	5.3 ± 0.1	0.03±0.004	61.9 ± 1.9 ^b	
	Fibrozyme	148.1 ± 11.5 ^b	5.0 ± 1.3	0.03±0.001	63.2 ± 1.3 ^b	
	Ext Rm	135.8 ± 3.7 ^{b,c}	4.4 ± 1.2	0.03±0.001	65.5 ± 1.8 ^a	
	Ext Rm+St	141.0 ± 9.8 ^{b,c}	3.2 ± 0.9	0.03±0.001	61.8 ± 1.4 ^a	
Rastrojo de maíz	Control	140.4 ± 2.1 ^b	4.0 ± 0.9	0.03±0.001	42.3 ± 1.2 ^c	
	Fibrozyme	139.4 ± 2.9 ^b	3.6 ± 0.7	0.03±0.003	47.4 ± 1.2 ^{b,c}	
	Ext Rm	117.0 ± 6.2 ^c	2.7 ± 0.7	0.04±0.005	49.3 ± 1.9 ^b	
	Ext Rm:St	118.5 ± 5.9 ^c	2.9 ± 0.5	0.04±0.003	51.1 ± 1.1 ^b	
Bagazo de caña	Control	29.2 ± 2.6 ^e	24.9 ± 7.8 ^a	0.03± 0.006	15.2 ± 1.6 ^e	
	Fibrozyme	54.4 ± 1.5 ^d	10.5 ± 4.0 ^b	0.02±0.002	33.4 ± 6.1 ^d	
	Ext Rm	39.8 ± 4.4 ^{d,e}	18.2 ± 7.7 ^b	0.03±0.008	30.9 ± 1.8 ^d	
	Ext Rm:St	40.0 ± 3.7 ^{d,e}	16.1 ± 6.8 ^b	0.03±0.009	28.2 ± 0.7 ^d	

Los datos representan el promedio y desviación estándar de tres repeticiones. ^{a-e} Letras distintas por columna muestran diferencias significativas, Tukey (P <0.05). Ext Rm= extracto enzimático obtenido del cultivo en rastrojo de maíz; Ext Rm:St= extracto enzimático obtenido del cultivo de rastrojo de maíz con salvado de trigo; Vmax= Volumen máximo; L= Fase de retardo; S= Pendiente; DIVMS= digestibilidad *in vitro* de la materia seca.

Los trabajos realizados por Tang *et al.*, (2008) encontraron que se mejora la digestibilidad *in vitro* del rastrojo de maíz entre 7 y 25% al utilizar diferentes dosis de enzimas celulasas y xilanasas. Asimismo, en pruebas en *in vitro* utilizando líquido ruminal de vacas en lactancia de alta y baja producción, mostraron que se aumenta 11% la digestibilidad de la fibra en muestras tratadas con Multi-zyme®, con respecto al testigo (Rivera y Zapata, 2006).

De la misma forma, al utilizar celulasas originadas por la bacteria *Cellulomonas flavigena* en cultivo líquido, encontraron que la digestibilidad de la materia seca del rastrojo de maíz se incrementa en un 14%, respecto al testigo sin enzimas (Hernández, 2009). Estos resultados coinciden a lo obtenido en este trabajo, en el cual los extracto enzimáticos de *Fomes* sp. EUM1 (celulasas, xilanasas) incrementaron la digestibilidad del rastrojo de maíz hasta en 21%.

También en el Cuadro 6 se observa para el bagazo de caña la producción de gas acumulado del extracto de Fibrozyme®, el cual alcanzó 54.4 mL g⁻¹h⁻¹, siendo diferente al resto de los tratamientos. Aunque los tratamientos con Ext Rm y Ext Rm:St no presentaron diferencias con respecto al control en el volumen acumulado (39.8, 40.0 y 29.2 mL g⁻¹h⁻¹, respectivamente), tampoco fueron diferentes a Fibrozyme®. Al respecto, Giraldo *et al.*, (2008), proponen que los efectos de las enzimas están influenciados por la naturaleza del sustrato donde es aplicado y además, están involucrados diversos mecanismos de acción que actúan positivamente en la fermentación ruminal, como podría ser el pre tratamiento enzimático.

Por otra parte trabajos previos utilizando hongos de podredumbre blanca encontraron que el tratamiento fúngico sobre paja se sorgo redujo las variables de producción de gas *in vitro*, pero aumenta significativamente la formación de biomasa microbiana, lo cual es importante por su contribución al aporte de proteína y la transformación de nutrientes (Villegas-Castañeda *et al.*, 2010).

El tiempo en el que los microorganismos inician la degradación de los componentes del sustrato se conoce como la fase de retardo o fase lag, en este experimento se muestra que también fue modificada al utilizar ECE (Cuadro 6). Aunque en el rastrojo de maíz y heno de alfalfa no presentaron diferencias ($P > 0.05$), el efecto importante en esta variable se observó en el bagazo de caña, en donde las diferencias se presentaron favorablemente al reducir la fase lag en un 58, 27 y 35%, para Fibrozyme, Ext Rm y Ext Rm:St, respectivamente. Con respecto al control sin enzimas, la velocidad con la que los microorganismos del rumen fermentan los componentes del alimento o tasa de producción de gas (S) no presentó efectos en ningún tratamiento evaluado.

La evaluación de nuevos extractos enzimáticos en forrajes requiere de la comparación con productos comerciales, con eficiencia comprobada. Al respecto, los reportes de actividad enzimática entre productos comerciales varían de acuerdo al tipo de organismo con que se producen. La actividad celulolítica del ECE de *Fomes* sp. EUM1 es similar a la reportada para Fibrozyme (Alltech, Inc., Nicholasville, KY, USA), mientras que la actividad xilanolítica solo es menor en un 24 % a lo reportado para este producto comercial (222 UI) por Ramírez *et al.*, (2005).

La razón de solamente utilizar los extractos enzimáticos se originó a partir del crecimiento de *Fomes* sp. EUM1 directamente en los forrajes, disminuiría la DIVMS como consecuencia del consumo de nutrientes asimilables durante el crecimiento del hongo. En el bagazo de caña, el aporte de extractos lignocelulolíticos exógenos incrementó la digestibilidad significativamente ($P < 0.05$) con respecto al control en un 54, 51 y 46%, para Fibrozyme, Ext Rm y Ext Rm:St, respectivamente. La importancia radica en que el uso directo de las fibras como alimento no produce resultados favorables, considerando el potencial energético y nutricional de estos forrajes (Colombatto *et al.*, 2003).

Hay trabajos previos que han reportado que la producción de gas mejora al incubar forrajes tratados con enzimas exógenas (Colombatto *et al.*, 2003; Carro *et al.*, 2005). Sin embargo, en el presente estudio la producción de gas (Cuadro 6) se redujo en dos de los tres forrajes evaluados, tentativamente, debido a que la adición de nuevos metabolitos fúngicos, como proteína enzimática, no fue importante.

Por otra parte Eun y Beauchemin (2007) al usar diferentes complejos enzimáticos (hidrolasas) de cepas de *Trichoderma longibrachiatum* y *Penicillium funiculosum*, y un complejo enzimático proteolítico (papaína EC 3.4.22.2) mostraron que se incrementa la digestibilidad del ensilaje de maíz (42 y 44%), sin presentar diferencias entre extractos, sin embargo, los valores reportados por estos autores fueron menores a los alcanzados para este trabajo, con los extractos enzimáticos de *Fomes* sp. EUM1 con un 49 y 51% para Ext Rm y Ext Rm:St, respectivamente. Esto no quiere decir que los extractos de *Fomes* sp. EUM1 sean superiores en los niveles de actividad

enzimática a las enzimas comerciales, pero sí que presentaron una mayor especificidad al sustrato del cual se originaron.

En lo referente al heno de alfalfa, Hernández (2009) reportó que con extractos enzimáticos de *Cellulomonas flavigena* producidos en medio líquido se presenta un efecto positivo en el ambiente ruminal y se obtiene incremento del 10% en la digestibilidad del heno de alfalfa a las 48 h de incubación, considerando lo anterior, el extracto exógeno proveniente de *Fomes* sp EUM1, alcanzó incrementar 6% la DIVMS, con respecto al tratamiento testigo, por lo que se mantiene como un extracto con potencial uso en la nutrición de rumiantes.

7.4. Extractos enzimáticos de *Fomes* sp. EUM1 para pruebas *in vivo*

Dentro de las propuestas biotecnológicas para el manejo de subproductos agropecuarios, diferentes investigadores han realizado pruebas *in vitro* para evaluar la potencialidad de los hongos de podredumbre blanca y su incorporación en dietas para rumiantes (Graminha *et al.*, 2008; Peláez *et al.*, 2011; Villegas-Castañeda *et al.*, 2010; D'Ágostini *et al.*, 2011).

Hasta el momento, los resultados han sido positivos y han coincidido en la posibilidad incorporar cultivos fúngicos o extractos enzimáticos en la nutrición animal. A medida que avancen los bioprocesos de los residuos agrícolas en el campo de la biotecnología animal, la utilización de organismos productores de enzimas lignocelulolíticas, como *Fomes* sp. EUM1, serán aplicados, por lo que los ensayos *in vitro* no serán suficientes para evaluar estos extractos enzimáticos. Al momento, se

tiene poca información de trabajos que evalúen el efecto de los extractos crudos enzimáticos de un basidiomiceto en pruebas *in vivo* de comportamiento animal.

A partir de los resultados obtenidos en las pruebas de producción de gas y digestibilidad *in vitro* en este trabajo, reportados anteriormente, se realizó el cultivo en estado sólido de *Fomes* sp. EUM1 solamente en rastrojo de maíz con salvado de trigo (Ext Rm:St), obteniendo el extracto crudo enzimático a los 6 días de cultivo, como se muestra en el Cuadro 7. El criterio para seleccionar el día 6 de la fermentación fue debido a que es el día en que se presentó la mayor actividad para xilanasas (Gráfico 2).

Cuadro 7. Actividades enzimáticas (UI gss⁻¹) del extracto de *Fomes* sp. EUM1.

	Celulasas	Xilanasas	Lacasas
Ext Rm:St	50	169	4

UI gss⁻¹; Unidades Internacionales por gramo de sustrato seco

Ext Rm:St; extracto de Rastrojo de maíz con salvado de trigo

Para las pruebas de comportamiento animal se observa que la actividad enzimática del extracto alcanzó 169 y 50 UI g ms⁻¹ para xilanasas y celulasas, respectivamente. Mientras que la producción de lacasas alcanzó 4 UI gss⁻¹. Los valores de producción alcanzados por celulasas y xilanasas en esta parte del experimento coinciden a lo previamente reportado para este hongo en este mismo sustrato (Gráficos 1 y 2).

En trabajos previos cultivando este hongo en bagazo de caña como medio de cultivo se reportaron valores de actividad de xilanasas de 147 UI gss⁻¹ (Marquez-Araque *et al.*, 2007). Al utilizar como sustrato rastrojo de maíz con salvado de trigo la

producción de xilanasas se incrementó en un 15% comparado con lo obtenido con bagazo de caña.

Del mismo modo, la producción de celulasas llegó a ser 7 veces superior (50 UI gss⁻¹) al utilizar rastrojo de maíz con salvado de trigo, en lugar del bagazo de caña (7 UI gss⁻¹). Sin embargo, el bagazo de caña también es un subproducto que se utiliza en la producción de enzimas lignocelulolíticas por parte de diferentes basidiomicetos (Membrillo, 2008). En lo que respecta a los niveles de producción de lacasas, no presentó diferencias en la producción de esta enzima a lo previamente reportado, solo se observó que se aumentó la productividad al doble al utilizar el rastrojo de maíz con salvado de trigo en comparación con el bagazo de caña.

Hecho lo anterior, y conociendo los niveles de producción enzimática del extracto, se continuo con las pruebas *in vivo*. De la dieta basal propuesta, la cual consistía en heno de alfalfa, rastrojo de maíz y concentrado (Cuadro 2), el Ext Rm:St de *Fomes* sp. EUM1 se incorporó únicamente al rastrojo de maíz, de manera que estuviera en contacto 24 horas antes de ser proporcionado a los corderos.

Esto se realizó debido a que la degradación de la materia seca se incrementa cuando las enzimas son incubadas con el forraje previo a su ingesta por los animales de estudio (Elwakeel *et al.* 2007; Krueger *et al.*, 2008). Al respecto, Yang *et al.* (2004) mencionan que es necesario el tratamiento biológico de las fibras vegetales en condiciones aeróbicas para la formación de radicales hidroxilos, lo cual favorece su

hidrólisis, este efecto está directamente relacionado a la fuente de los extractos enzimáticos y dependerá de su dosificación.

El conocer los valores de actividad enzimática, y el hecho de que la unión de la enzima al sustrato antes de proporcionarlo como alimento al ganado, permite una protección contra la degradación por las proteasas del rumen (Forwood *et al.*, 1990; Beauchemin *et al.*, 2003) además de favorecer la formación de unión al sustrato. Sin embargo, estos efectos benéficos de pre-incubar las enzimas no se observan en todos los ingredientes de las dietas, como en la harina de trigo o la paja de avena (Álvarez *et al.*, 2009).

También, se sugiere que las enzimas utilizadas en la alimentación animal sean una combinación de actividades enzimáticas (Eun y Beauchemin 2007), a esto Wang *et al.*, (2004) recomendaron la utilización de extractos enzimáticos exógenos que mejoran la colonización de las partículas del alimento por las bacterias ruminales, por lo que es conveniente que los preparativos incluyan actividad esterases. Este aspecto puede lograrse utilizando los extractos crudos enzimáticos de *Fomes* sp. EUM1, el cual es capaz de producir diferentes enzimas como celulasas, xilanasas, lacasas, proteasas, Dye Peroxidasas (Márquez-Araque *et al.*, 2007; Ordaz, 2008; Méndez, 2010).

7.4.1. Pruebas de digestibilidad *in vivo*

La adición del Ext Rm:St en la dieta no afectó el consumo total de los alimentos. A pesar de la palatabilidad del forraje debido a sus características olfativas del extracto

el consumo de materia orgánica, materia seca, fibra detergente neutro, fibra detergente ácido y proteína total no presentó diferencias ($P>0.05$) entre tratamientos por efecto de la dosis enzimática (Cuadro 8).

Cuadro 8. Consumo de alimento tratado con diferentes dosis de Ext Rm:St (g día^{-1}), en ovinos.

	mL Ext Rm:St kg^{-1} MS			EE	Valor de P	
	0	60	120		Lineal	Cuadrático
Materia seca	1289	1367	1397	96	0.44	0.83
Materia orgánica	1066	1141	1166	80	0.39	0.80
FDN	731	790	798	55	0.40	0.70
FDA	426	451	458	32	0.48	0.80
Proteína total	198	197	187	14	0.60	0.78

Ext Rm:St, extracto enzimático de rastrojo de maíz con salvado de trigo; FDN, fibra detergente neutro; FDA, fibra detergente ácido; EE, error experimental

En corderos alimentados con paja de trigo, Cruywagen y Goosen (2004) evaluaron el efecto de incorporar diferentes niveles de extractos enzimáticos originados a partir del hongo *Aspergillus terreus* (ABO374) y encontraron que el consumo de nutrientes no se afecta por efecto de los tratamientos enzimáticos.

Por otra parte, Feng *et al.*, (1996) reportaron que el consumo de la materia seca se incrementa por las enzimas fibrolíticas cuando el forraje está seco, lo que indica que

influye el nivel de humedad del forraje. Además la forma de aplicación, por ejemplo por aspersión sobre los forrajes (Krause *et al.*, 1998), que es la manera en la que se agregó a este trabajo, suministrado directamente a los animales (Lewis *et al.*, 1996), o agregado previamente a los alimentos no cambia el consumo de la materia seca (Rode *et al.*, 1999).

Diversos estudios reportan que no se presentan cambios en el consumo de materia seca, pero sí en las variables productivas, como la producción de leche (Yang *et al.*, 1999; Lewis *et al.*, 1996). Esto sugiere que los extractos crudos enzimáticos pueden modificar el patrón de fermentación o favorecer la síntesis de proteína microbiana.

En corderos de la raza Romanov x Suffolk alimentados con una dieta alta en forraje (60%) el consumo de materia seca y de materia orgánica no cambió por la adición de enzimas fibrolíticas comerciales, utilizaron enzimas comerciales y mostraron que utilizando Tween 20 se incrementa la estabilidad y se mejora la unión al sustrato en condiciones de laboratorio, sin embargo no mejoraron la digestibilidad de los nutrientes ni mejoraron el comportamiento productivo de los corderos (McAllister *et al.*, 1999).

Los resultados de Pinos-Rodríguez *et al.*, (2002) y Bernard *et al.*, (2010) indicaron que el consumo de la materia seca se modifica en función del tipo de forraje y de las enzimas utilizadas, pero no por la interacción forraje con enzima. Otro factor que impacta en el consumo es la relación forraje concentrado, estos autores mencionan que una dieta alta en concentrado disminuye el consumo de materia seca (McAllister

et al., 1999; Cruywagen y van Zyl, 2008).

En la Cuadro 9 se observa que la inclusión de extractos enzimáticos tuvo una respuesta lineal ($P=0.08$) a mejorar la ganancia diaria de peso por el uso de enzimas exógenas ($P<0.1$), sin afectar la conversión alimenticia ($P>0.05$). También se observa que la digestibilidad de la materia seca, fibra detergente neutro y fibra detergente ácido presentaron una respuesta cuadrática ($P<0.05$) a la dosis del extracto enzimático.

Cuadro 9. Comportamiento productivo de corderos alimentados con una dieta 60:40 de forraje:concentrado, tratada con Ext Rm:St.

	mL Ext Rm:St kg ⁻¹ MS			EE	Valor de P	
	0	60	120		Lineal	Cuadrático
Peso inicial (kg)	20.0	19.9	20.0	2.06	-	-
Peso final (kg)	32.3	34.1	34.1	2.34	0.58	0.75
GDP (g/d)	211 ^b	244 ^a	243 ^a	0.01	0.08	0.25
CA	6.2	5.6	5.8	0.39	0.52	0.44
	Digestibilidad (%)					
Materia seca	48.9 ^b	58.5 ^a	48.8 ^b	3.4	0.97	0.03
FDNa	42.9 ^b	57.8 ^a	39.0 ^b	3.3	0.41	0.009
FDA	32.9 ^b	48.0 ^a	18.4 ^b	4.2	0.02	0.006
Nitrógeno	54.4	60.6	50.3	3.6	0.42	0.07

^{abc} Medias con diferente literal dentro de la misma fila presentan diferencias ($P<0.05$).

CA, conversión alimenticia; ECE, extracto crudo enzimático GDP, ganancia diaria de peso ($P<0.10$).

Las enzimas fibrolíticas exógenas han mejorado la digestión de la fibra en corderos (Pinos-Rodríguez *et al.*, 2002; Giraldo *et al.*, 2008; Almaraz *et al.*, 2011), pero al incrementar el nivel del concentrado no se presentan efectos benéficos. En corderos alimentados con paja de trigo, salvado de trigo, grano de cebada y harina de soya suplementada con enzimas celulolíticas originadas por *Trichoderma* spp. se alcanza una ganancia diaria de peso de 222 g d⁻¹ (Muwalla *et al.*, 2007), estos autores concluyen que el peso final, la ganancia diaria de peso y la conversión alimenticia no se favorecen por la inclusión de enzimas celulolíticas en dietas con una relación forraje concentrado (25:75), sin embargo, a pesar de ser extractos originados de diferentes microorganismos y utilizar unidades experimentales de diferentes razas, de acuerdo a nuestros resultados, con una dieta con una proporción forraje concentrado de 60:40, las enzimas exógenas de *Fomes* sp. EUM1, presentaron una GDP de 244 g d⁻¹, siendo superior en un 10 % a la alcanzada con dieta alta en concentrado.

Estos resultados están de acuerdo a lo reportado por Cruygawen y Goosen (2004) quienes mostraron que con diferentes dosis de extractos enzimáticos originados a partir de *Aspergillus terreus* var *carneus* (Abo374), se mejora significativamente la ganancia diaria de peso y la conversión alimenticia en corderos alimentados con una mezcla del forraje de paja de trigo y heno de alfalfa, completada con concentrado al 40% de la dieta total.

En carneros de la raza Blackbelly x criollos se evaluó el efecto de la aplicación de productos enzimáticos (Promote, Agribrand, Canadá; BiocellulaseA-20, Loders

Croklaan, Channahon, IL, USA), derivados de *Trichoderma longibratum* y *Aspergillus reesei* con actividad principal de celulasas y xilanasas, reportando que la digestibilidad de nutrientes del heno de pasto guinea (*Panicum maximum* Jacq.) y el peso vivo de los carneros fue 4% mayor con respecto al testigo, para BiocellulaseA-20 y 2.9% para Promote.

El efecto de dos preparaciones enzimáticas con actividad carbohidrolasas en dietas alta en forraje (paja de cebada) no mejoró la ganancia diaria de peso, por el contrario redujo el consumo en un 4%, sin embargo, al utilizar estas mismas enzimas en una dieta alta en concentrado, la ganancia de peso aumentó en un 8% (McAllister *et al.*, 1999). Estos mismos productos enzimáticos a la misma dosis, suplementados en ensilaje de alfalfa mejoraron la conversión alimenticia y la ganancia diaria de peso en bovinos, por lo que nuevamente se manifiesta que el uso de enzimas hidrolíticas se ve afectado por la relación forraje concentrado.

La suplementación con enzimas amilolíticas, proteolíticas y celulolíticas al alimento de los rumiantes mostraron mejorar significativa en la ganancia diaria de peso y la conversión alimenticia. Sin embargo, las enzimas exógenas sólo pueden ser beneficiosas cuando la composición de la alimentación y la preparación de enzima son complementarias, y los efectos máximos se obtienen cuando los aditivos enzimáticos se aplican a la alimentación en forma acuosa. Aumentando el intervalo entre la aplicación de enzimas y la alimentación, esto crea un complejo estable que aumenta la eficacia de la enzima, siendo más beneficiosa que la aplicación directa en el medio ambiente ruminal (Beauchemin y Rode, 1996).

En este estudio, la digestibilidad de la materia seca, fibra detergente neutro y fibra detergente ácido mostraron un efecto cuadrático entre los tratamientos ($P < 0.05$), mejorando la digestibilidad con la dosis enzimática ($60 \text{ mL kg}^{-1} \text{ MS}$). El efecto positivo de los extractos enzimáticos de *Aspergillus niger* y *Trichoderma longibrachiatum* en la digestibilidad de la materia seca y la fibra detergente neutro ha sido reportado por Giraldo *et al.*, (2008), en borregos alimentados con heno de pasto y concentrado.

7.4.2 Variables en líquido ruminal y actividades enzimáticas en rumen

El pH, N NH_3 y la concentración total de AGV en líquido ruminal no se cambiaron por la adición de los extractos enzimáticos (Cuadro 10), sin embargo la proporción de ácido butírico se incrementó en la dosis de $120 \text{ mL kg}^{-1} \text{ MS}$, mostrando un efecto cuadrático ($P < 0.05$). La actividad de celulasas en el líquido ruminal presentó un incremento lineal ($P < 0.05$) en función de la dosis de extracto.

La adición de enzimas no presentó cambios ($P > 0.05$) en pH y N- NH_3 en el rumen (Cuadro 5). Al respecto, Muhamad y Suwandiyastuti, (2005) reportaron que el pH ruminal y la concentración de AGV no se ve afectado por la incorporación de enzimas en paja de cebada, pero sí mejora la digestibilidad de la fibra. A su vez, Álvarez *et al.*, (2009) reportaron que el pH ruminal con enzimas (Fibrozyme y Promote®) aumentó sin variar la concentración de AGV en novillos alimentados con paja de avena, por lo que lo encontrado en este trabajo, las enzimas exógenas no afectaron el metabolismo ruminal y sí mejoraron la digestibilidad de los forrajes.

Cuadro 10. Variables de fermentación y actividades enzimáticas en líquido ruminal de corderos alimentados con una dieta 60:40.

	mL Ext Rm:St kg ⁻¹ MS			EE	Valor P	
	0	60	120		Lineal	Cuadrático
pH	6.5	6.6	6.5	0.18	0.91	0.86
N-NH ₃	8.7	9.6	7.7	1.57	0.67	0.48
AGV (mol/100 mol)						
Acetato	64.8	66.0	65.2	0.72	0.76	0.29
Propionato	21.1	21.9	20.4	0.85	0.54	0.29
Butirato	14.0 ^a	12.2 ^b	14.5 ^a	0.50	0.56	0.004
AGV totales	51.0	52.3	56.8	6.27	0.98	0.86
Actividad enzimática (UI mL ⁻¹)						
Xilanasas	215	203	226	30.36	0.81	0.64
Celulasas	6.4 ^b	11.5 ^a	9.7 ^a	0.88	0.01	0.006

^{abc} Medias con diferente literal dentro de la misma fila presentan diferencias (P<0.05).

Ext Rm:St, extracto de rastrojo de maíz con salvado de trigo; AGV: ácidos grasos volátiles

La concentración de AGV en el líquido ruminal está determinado por un equilibrio entre las tasa de producción y absorción (Leng y Brett, 1966). Para este trabajo la concentración AGV no se modificó, sin embargo los corderos alimentados con enzimas presentaron una respuesta cuadrática (P<0.05) en los niveles de ácido butírico, reduciéndose con la dosis de 60 mL kg⁻¹ materia seca.

Estos resultados coinciden a lo reportado por González-García *et al.*, (2009) al utilizar

Promote® en una dieta alta en forraje (70:30) en cabras, en donde la proporción de butirato se reduce con respecto al control, indicando que en algunos casos la concentración de butirato se puede reducir cuando se utilizan enzimas.

La reducción en la proporción de butirato se podría explicar por cambios en la población de bacterias como *Butyrivibrio fibrisolvens*. También, los protozoarios que sintetizan butirato como *Isotricha prostoma* y *Dasytricha ruminantum* pudieron reducir su población, quizás debido a que la actividad de las enzimas aumentaron la liberación de azúcares solubles que pudieron afectar estos ciliados. La ausencia de protozoarios en el cultivo bacteriano da como resultado niveles más altos de acetato y menores niveles de butirato en corderos alimentados con heno de alfalfa (Luther *et al.*, 1966).

Por otra parte, el ambiente ruminal favoreció la actividad de las poblaciones celulolíticas posiblemente como *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus*, lo cual puede explicar la respuesta cuadrática en la digestión de FDN ($P < 0.009$) y la observada en FDA (Lineal $P < 0.02$ y Cuadrática ($P < 0.006$)) (Cuadro 9). De acuerdo a Giraldo *et al.* (2009), en dietas elaboradas con 70% de forraje la suplementación directa de enzimas tiende a incrementar el número de bacterias celulolíticas con respecto al control después de 4 h de haber sido alimentados.

La actividad enzimática en el líquido ruminal de los corderos control (6.4 UI) fue menor ($P < 0.05$) con respecto a la actividad enzimática de los corderos con tratamiento enzimático se incrementó en un 78 y 50% a las 4 h después de ser

alimentados para las dosis 60 y 120 mL kg⁻¹DM, respectivamente. Hristov *et al.*, (2008) mostraron que al utilizar extractos enzimáticos (amilasas y xilanasas) la actividad CMCase aumenta en un 60% con respecto al control en líquido ruminal de vacas post lactancia.

8. Conclusiones

Con los resultados anteriores se muestra *Fomes* sp. EUM1 es capaz de crecer en cultivo superficial utilizando como fuente de carbono diferentes sustratos en suspensión. Aunado a esto, indujo la producción enzimática dependiendo el sustrato en el cual fue cultivado, se observa que a los siete días de cultivo el rastrojo de maíz tuvo la mayor actividad celulolítica, mientras que la paja de cebada favoreció la actividad de xilanasas ($P < 0.05$). Los mejores sustratos para la producción de lacasas fueron la paja de trigo y el rastrojo de maíz.

La PTMR incrementó la actividad de las enzimas hidrolíticas y deprimió la producción de enzimas lacasas, sin embargo el crecimiento no presentó diferencias en su promedio de crecimiento. La mezcla de paja de trigo con tomate (PTM) redujo los niveles de actividad de lacasas, en comparación con la paja de trigo (PT), mientras que las enzimas hidrolíticas presentaron niveles de actividad similares.

Los diferentes subproductos evaluados se mantienen como alternativa en la producción enzimática, debido a que en todos se observó crecimiento por parte de *Fomes* sp. EUM1 además de inducir la producción de enzimas lignocelulolíticas extracelulares. Sin embargo, será necesario evaluar cinéticas de crecimiento

La producción de enzimas xilanasas se incrementó al doble al suplementar el rastrojo de maíz con 20% de salvado de trigo. La producción de celulasas y lacasas no se modificó por efecto del salvado de trigo ($P > 0.05$). Sin embargo, los extractos

enzimáticos producidos sobre rastrojo de maíz con salvado de trigo incrementaron la estabilidad de las lacasas en un 100%.

Los tratamientos evaluados sobre tres forrajes muestra que las enzimas fibrolíticas obtenidas del extracto de rastrojo de maíz y del extracto de rastrojo de maíz con salvado de trigo (Ext Rm y Ext Rm:St) respectivamente, aceleran la producción de gas. Además de mostraron efecto sobre la DIVMS del rastrojo de maíz y del bagazo de caña comparado con el tratamiento sin enzimas ($P < 0.05$).

En el experimento *in vivo* realizado con corderos Criollos-Suffolk se observó un incremento en la ganancia diaria de peso ($P = 0.08$) al incluir el extracto enzimático de *Fomes* sp. EUM1 al rastrojo de maíz (24 h), mostrando un efecto favorable, al incrementar la actividad celulolítica en el rumen.

Con los resultados anteriores se muestra que los extractos enzimáticos obtenidos de *Fomes* sp. EUM1 son una alternativa para su uso sobre residuos lignocelulósicos, enfocándose al tratamiento previo de los forrajes para su inclusión a la dieta. El aporte de enzimas fibrolíticas lo mantienen como alternativa para su uso en la alimentación animal, debido a que posiblemente aumente los sitios de unión a las fibras por parte de las bacterias ruminales.

9. Perspectivas

En países en vías de desarrollo, como México, el uso de enzimas lignocelulolíticas exógenas es una alternativa que impactaría positivamente en el reciclado de la biomasa vegetal, por lo que es conveniente realizar pruebas *in vivo* con extractos de *Fomes* sp. EUM1, evaluando los procesos productivos, para disminuir las fallas en el proceso de escalamiento.

1. Producir extractos enzimáticos mediante cultivo en medio sólido con nuevos recursos lignocelulósicos utilizando el hongo *Fomes* sp. EUM1.
2. Realizar la caracterización bioquímica de los extractos enzimáticos, con esto generar el conocimiento para su aplicación biotecnológica.
3. Utilizar el sustrato donde creció el hongo, aplicar sin extraer las enzimas, con esto se evalúa algún efecto prebiótico.
4. Producir enzimas (rastreo de maíz), y evaluar su efecto en diferentes especies de rumiantes, por ejemplo, se requiere realizar ensayos con ganado lechero en lactancia.

10. Referencias

- Abdul, A.N.S., Philip J.W., 2006. Role of fragmentation activity in cellulose hydrolysis. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 58: 180-185.
- Almaraz, I., González, S.S., Pinos-Rodríguez, J.M., Miranda, L.A. 2010. Effects of exogenous fibrolytic enzymes on *in sacco* and *in vitro* degradation of diets and on growth performance of lambs. *Italian Journal of Animal Science*. 9(e2): 6 -10.
- Almong, O., González, A., Klein D., Greenblatt, H., Braun, S., Shoham, G. 2003. The 0.93 Å crystal structure of spherulase: a calcium-loaded serine protease from *Bacillus phaericus*. *Journal of Molecular Biology*. 332:1071-1082.
- Álvarez, G., Pinos-Rodríguez, J.M., Herrera, J.G., García, J.C., González, S.S., Bárcena, R. 2009. Effects of exogenous fibrolytic enzymes on ruminal digestibility in steers fed high fiber rations. *Livestock Science*. 121, 150-154.
- Anderson, S.J., Merrill, J.K., Klopfenstein, T.J. 1988. Soybean hulls as an energy supplement for the grazing ruminant. *Journal of Animal Science*, 66: 2959 – 2964.
- AOAC. 1999. *Official Methods of Analysis*, 16 th ed. Association of Official Analytical Chemists. Arlington, VA., USA.
- Aranda, I.E.M. 2000. Utilización de la caña de azúcar en la alimentación de rumiantes. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
- Aranda, Ballesteros E. 2006. Fraccionamiento físico del alpeorajo como base para desarrollar una estrategia biológica con hongos saprobios y arbusculares para la eliminación de su fitotoxicidad. Tesis de Doctorado. Universidad de Granada, Facultad de Ciencias, España. ISBN 84-338-4127-0.
- Aranda, E., Sampedro, I., Ocampo, J.A.,García-Romera, I. 2006. Phenolic removal of olive-mill dry residues by laccase activity of White-rot fungi and its impact on tomato plant growth. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 58: 176 -179.
- Baldrian, P.2006. Fungal laccases.occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews*. 30: 215 – 242.

- Baldrian, P., Gabriel, J., 2003. Lignocellulose degradation by *Pleurotus ostreatus* in the presence of cadmium. *FEMS Microbiology Letters* 220: 235-240.
- Baptista, R.P., Cabral, J.M.S. and Melo, E.P. 2000. Trehalose delays the reversible but not the irreversible thermal denaturation of cutinase. *Biotechnology and Bioengineering*. 70: 699–703.
- Beauchemin, K. A. and Rode, L. M. 1996. Use of feed enzymes in ruminant nutrition. **In:** *Animal Science Research and Development-Meeting the Challenges*. pp 103-131. Rode, L.M. (ed) Minister of Supply and Services Canada, Ottawa. ON.
- Beauchemin, K. A., Jones, S. D. M., Rode, L. M. and Sewalt, V. J. H. 1997. Effects of fibrolytic enzyme in corn or barley diets on performance and carcass characteristics of feedlot cattle. *Canadian Journal of Animal Science* 77, 645-653.
- Beauchemin, K.A., Morgavi, D. P., McAllister, T. A., Yang W. Z. and Rode L. M. 2001. The use of enzymes in ruminant's diets. *Recent Advances in Animal Nutrition* 17: 297-322.
- Beauchemin, K. A., Colombatto, D., Morgavi, D. P., Yang, W. Z. 2003. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. *Journal of Animal Science*. 81 (E.Suppl. 2), E37-E47.
- Beauchemin, K.A., Colombatto D. and Morgavi D.P., 2004. A rationale for the development of feed enzyme products for ruminants. *Canadian Journal of Animal Science* 84(1): 23-35.
- Beauchemin, K.A., Eriksen, L., Norgaard, P., Rode, L.M. 2008. Short communication: Salivary secretion during meals in lactating dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 91: 2007 – 2081.
- Bedford, M. R. 1993. Mode of action of feed enzymes. *Journal of Applied Poultry Research* 2, 85-92.
- Beg, Q.K., Kappor, M., Mahajan, L., Hoondal, G.s. 2001. Microbial xylanases and their industrial applications: review. *Applied and Microbiology and Biotechnology*, 56(3-4): 326 – 338.
- Bernard, J. K., Castro, J. J., Mullis, N. A., Adesogan, A. T., West, J. W., Morantes, G. 2010. Effect of feeding alfalfa hay or Tifton 88 Bermuda grass

haylage with or without a cellulose enzyme on performance of Holstein cows. *Journal of Dairy Science*. 93 (11), 5280-5285.

- Bhat, M.K., Hazlewood, G.P. 2003. Enzymology and other characteristics of cellulases and xylanases. In: Bedford, M.R., Partidge. G.G. (eds). *Enzymes in farm animal nutrition*. 2a ed. CABI International, U.K. pp: 11-59.
- Blake, A.W., McCartney L., Flint J. 2006. Understanding the biological rationale for the diversity of cellulose-directed carbohydrate-binding modules in prokaryotic enzymes. *Journal of Biological Chemistry*. 281: 29321-29329.
- Bourbonnais R., Pice M. G., Freiermuth B., Bodie E. and Borneman S., 1997. Reactivities of various mediators and laccases with Kraft pulp and lignin model compounds. *Applied and Environmental Microbiology* 63 (12): 4627-4632.
- Burroughs, W., Woods, W., Ewing, S. A., Greig, J. and Theurer, B. 1960. Enzyme additions to fattening cattle rations. *Journal of Animal Science* 19, 458-464.
- Cabaleiro, D.R., Couto, S.R., Sanroman, A., Longo, M.A. 2002. Comparison between the protease production ability of ligninolytic fungi cultivated in solid state media. *Process Biochemical*. 37: 1017 - 1023.
- Campbell, W., 1938. The cultural characteristics of the species of *Fomes*. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 65, 31- 69.
- Campos, F.P., Sampaio, A.A.M., Bose, M.L.V., Vieira, P.F., Sarmiento, P., 2004. Evaluation of *in vitro* gas production of roughages and their mixture using the curves subtraction method. *Animal Feed Science and Technology* 116: 161-172.
- Campos-Montiel, R.G., Pimentel-González, D.J., Hernández-Fuentes, A.D., Alfaro-Rodríguez, R.H., Viniegra-González, G., 2008. Influence of fungal cultures on *in vitro* ruminal assays with different substrates. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 7: 215-221.
- Cano, A., Aranda, E.M., Mendoza, G.D., Pérez, M., Ramos, J. 2003. Comportamiento de toretes en pastos tropicales suplementados con caña de azúcar y enzimas fibrolíticas. *Técnica Pecuaria en México*. 41 (2): 153 - 164.

- Carro, M. D., M. J. Ranilla, and M. L. Tejido. 2005. Using an *in vitro* gas production technique to examine feed additives: effects of correcting values for different blanks. *Animal Feed Science and Technology*. 123-124: 173 - 184.
- Chaplin, M.F.1986. Monosaccharidos. *Carbohydrate Analysis. A practical approach*. Press, England. p 1-36
- Chefetz, B., Chen, Y., Hadar, Y. 1998. Purification and characterization of laccase from *Chaetomium thermophilum* and its role in humification. *Applied and Environmental Microbiology*. 64: 3175 - 3179.
- Chen, K. H., Huber, J. T., Simas, J., Theurer, C. B., Yu, P., Chan, S. C., Santos, F., Wu, Z. and Swingle, R. S. 1995. Effect of enzyme treatment or steam-flaking of sorghum grain on lactation and digestion in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 78, 1721-1727.
- Chen, Q., Megan N.M., Scott, M.G., Ming, T. Tom, L.R. 2012. Effects of laccase on lignin depolymerization and enzymatic hydrolysis of ensiled corn stover. *Bioresource Technology*. 117: 186 – 192.
- Classen, H. L., Graham, H., Inborr, J. and Bedford, M. R. 1991. Growing interest in feed enzymes to lead to new products. *Feedstuffs* 63, 22-24.
- Collins, T.; Gerday, C., Feller, G. 2005. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*. 29 (1): 3-23.
- Colombatto, B., Beauchemin, K., 2003. A proposed methodology to standardize the determination of enzymic activities present in enzyme additives used in ruminant diets. *Canadian Journal of Animal Science*. 83: 559-5698.
- Colombatto, D., Fergus, L. M., Mahalingeshwara, K. B., Owen, E. 2003. Use of fibrolytic enzymes to improve the nutritive value of ruminants diets a biochemical and *in vitro* rumen degradation assessment. *Animal. Feed Science and Technology*. 107: 201-209.
- Colombatto, D., Mould, F.L., Bhat, M.K., Owen, E. 2007. Influence of exogenous fibrolytic enzyme level and incubation pH on the *in vitro* ruminal fermentation of alfalfa stems. *Animal Feed Science and Technology*. 137:150-162.

- Coronel, U., Ortega M.E., Mendoza, M.G., Sánchez, M.T., Ayala, J., Becerril, C., 2001. Effect of two strains of *Saccharomyces cerevisiae* on productive performance of heifers. Nutrition Society, England. Julio. Abstract OC103.
- Costa, S.A., Tzanko, T., Carneiro, A.F., Para, A., Gerog, M.G., Cavaco-Paulo, Artur. 2002. Studies of stabilization of native catalase using additives. Enzyme and Microbiology and Technology. 30: 387 – 391.
- Coughlan, M. P., Ljungdahl, L. G. 1998. Comparative Biochemistry of fungal and bacterial cellulolytic enzyme systems. In Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation. J. P. Aubert, P. Beguin and J. Millet (ed.). Academic Press, London, San Diego and New York, pp. 11-30.
- Cruywagen, C. W., Gossen, L. 2004. Effect of an exogenous fibrolytic enzyme on growth rate, feed intake and feed conversion ratio in growing lambs. South African Journal of Animal Science. 34 (Suppl. 2), 71-73.
- Cruywagen, C. W., van Zyl, W. H. 2008. Effects of a fungal enzyme cocktail treatment of high and low forage diets on lamb growth. Animal Feed Science and Technology. 145, 151-158.
- Cullen, D., Kersten, P. 1992. Fungal enzymes for lignocellulose degradation. In Applied Molecular Genetics of filamentous fungi. Edited by Kinghorn, J.R., Turner, G. New York, Chapman and Hall. Capítulo 4: 100 -131.
- Da Silva, R., Lago, E. S., Merheb, C. W., Macchione, M. M., Kun, P. Y., Gomes, E. 2005. Production of xylanase and CMCase on solid state fermentation in different residues by *Thermoascus aurantiacus* Miede. Brazilian Journal of Microbiology. 36, 235-241.
- D'Agostini, E. C., Mantovani, T. R. D., do Valle, J. S., Paccola-Meirelles, L. D., Colauto, N. B., Linde, G. A. 2011. Low carbon/nitrogen ratio increases laccase production from basidiomycetes in solid substrate cultivation. Scientia Agricola. 68(3), 295-300.
- Dekker, R.F.H. 1983. Bioconversion of hemicelluloses: aspects of hemicelluloses production by *Trichoderma reesei* QM9414 and enzymic saccharification of hemicelluloses. Biotechnology and Bioengineering, 25: 1127 – 1149.
- Dinis, M.J, Rui, M.F.B., Nunes, F., Dias, A., Guedes, C., Luis M.M.F., John, W. C., Guilhermina, S.M.M., Ana, R.N.B., Miguel, A.M.R. 2009. Modification of

- wheat straw lignin by solid state fermentation with white rot fungi. *Bioresource Technology*. 100: 4829 -4835.
- Elisisahvili, V., Michel, P., Kachlishvili, E., Asatiani, M., Kvesitadze, G., 2006. Use of *Pleurotus dryinus* for lignocellulolytic enzymes production in submerged fermentation of mandarin peels and tree leaves. *Enzyme and Microbial Technology* 38: 998-1004.
 - Elwakeel, E.A., Titgemeyer, E.C., Johnson, B.J., Armendariz, C.K., Shirley, J.E. 2007. Fibrolytic enzymes to increase the nutritive value of dairy feedstuffs. *Journal of Dairy Science*. 90: 5226 -5236.
 - Erwin, E. S., Marco, G. T., Emery, E. M. 1961. Volatile fatty acid analysis of blood and rumen fluid by gas chromatography. *Journal of Dairy Science*. 44, 1768-1771.
 - Eun, J. S., Beauchemin, K. A. 2007. Enhancing *in vitro* degradation of alfalfa hay and corn silage using feed enzymes. *Journal of Dairy Science*. 90, 2839–2851.
 - Feng, P., Hunt, C. W., Pritchard, G. T. and Julien, W. E. (1996) Effect of enzyme preparations on *in situ* and *in vitro* degradation and *in vivo* digestive characteristics of mature cool-season grass forage in beef steers. *Journal of Animal Science* 74, 1349-1357.
 - Forsberg, C.W., Forazo, E., Chesson, 2000. Microbial adherence to the plant cell wall and enzymatic hydrolysis. In: Cronjé, P.B., Broomker, E.A., Henning, P.H., Schultheiss, W., van der Walt, J.G. (eds). *Ruminant physiology: Digestion, metabolism growth and reproduction*. CAB International. Pp.79 -98.
 - Forwood, J. R., Sleper, D. A. and Henning, J. A. 1990. Topical cellulase application effects on tall fescue digestibility. *Agronomy Journal* 82, 900-913.
 - García, A. y Torres R. G. 2003. Producción de enzimas lignolíticas por Basidiomycetes mediante la técnica de fermentación en sustrato sólido. *Acta Agrónomica* 5(1): 56-64.
 - Gassara, F., Satinder, K., Tyagi, R.D., Verma, M., Surampalli, R.Y. 2010. Screening of agro-industrial wastes to produce ligninolytic enzymes by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemical Engineering Journal*. 49: 388 – 394.

- Giraldo, L. A., M. L. Tejido, M. J. Ranilla, and M. D. Carro. 2007. Effects of exogenous fibrolytic enzymes on *in vitro* ruminal fermentation of substrates with different forage: concentrate ratios. *Animal Feed Science and Technology*. 141: 306 - 325.
- Giraldo, L. A., Tejido, M. L., Ranilla, M. J., Ramos, S., Carro, M. D. 2008. Influence of direct-fed fibrolytic enzymes on diet digestibility and ruminal activity in sheep fed a grass hay-based diet. *Journal of Animal Science*. 86: 1617-1623.
- Gómez, V. A., Pérez, J., Mendoza, G.D., Aranda, E., Hernández, A., 2003. Fibrolytic exogenous enzymes improve performance in steers fed sugar cane and star grass. *Livestock production Science* 82: 249-254.
- González, S.S., Mendoza, G.D.M., M. García W. Animal agriculture and natural resource. In: Rosati A., A. Tewolde, y C. Mosconi (eds). *WAAP, Book of the year-2003*. Wageningen Academic Publisher, Netherlands. pp: 33 -71.
- González, A.M. 2004. "Estructura vegetal" in [<http://www.biologia.edu.ar>] Visitado el 28/Febrero/2009.
- González-García, E., Albanell, E., Caja, G., Casals, R. 2009. *In vitro* fermentative characteristics of ruminant diets supplemented with fibrolytic enzymes and ranges of optimal endo- β 1, 4-glucanase activity. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 94: 250 - 263.
- Graminha, E. B. N., Gonçalves, A. Z. L., Pirota, R. D. P. B., Balsalobre, M. A. A., Da Silva, R., Gomes, E., 2008. Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. *Animal Feed Science and Technology* 144, 1–22.
- Harris, P., Smith, B.G. 2006. Plant cell walls and cell-wall polysaccharides: structures, properties and uses in food products. *International Journal of Food Science and Technology*. 41: 129-143.
- Hernández, G.P.A. 2009. Caracterización del extracto enzimático xilanolítico exógeno de *Cellulomonas flavigena* en condiciones ruminales. Tesis de Doctorado. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Edo. de México.
- Herrera, T., Ulloa, M., 2004. El reino de los hongos, *Micología Básica y aplicada*. Ed. Fondo de cultura económica. México D.F.

- Howard, R.L., Abotsi E., Jansen van Rensburg E.L., and Howard S., 2003. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *African Journal Biotechnology* 2(12):602-619.
- Hristov, A. N., L. M. Rode, K. A. Beauchemin, and R. L. Wuerfel. 1996. Effect of two fibrolytic enzyme preparations on alfalfa hay dry matter digestibility and rumen fermentation in dry cows. In: *Proc. Can. Soc. Anim. Sci. Annu. Conf.*, Lethbridge, AB. p 14.
- Hristov, A. N., Basel, C. E., Melgar, A., Foley, A. E., Ropp, J. K., Hunt, C. W., Tricarico, J. M. 2008. Effect of exogenous polysaccharide-degrading enzyme preparations on ruminal fermentation and digestibility of nutrients in dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*. 145, 182-193.
- Hristov, A. N., McAllister, T. A. and Cheng, K.-J. 1998. Stability of exogenous polysaccharide degrading enzyme in the rumen. *Animal Feed Science and Technology* 76, 165-172.
- Iwaasa, A. D., Rode, L. M. and Beauchemin, K. A. 1998. Cumulative gas production of alfalfa forage treated with different cell wall-degrading enzymes. *Journal of Dairy Science* 81, Suppl. 1, 291.
- Iwashita, K. 2002. Recent studies of protein secretion by filamentous fungi. *Journal Bioscience Bioengineer.* 94: 530 – 535.
- Jalilvand, G., Odongo, N.E., López, S., Naserian, A., Valizadeh, F., Eftekhar S., Kebreab E., France J., 2008. Effects of different levels on an enzyme mixture on *in vitro* production parameters of contrasting forages. *Animal Feed Science and Technology*, 146: 289-301.
- Jaouani, A. Guillen, F., Penninckx, M.J.M. Martínez, A.T., Martínez, M.J. 2005. Role of *Pycnoporus coccineus* laccase in the degradation of aromatic compounds in olive oil mill wastewater. *Enzyme and Microbial Technology*. 36: 478 - 486.
- Kapoor, Shami, Pardeep K., Priva Katyal. 2009. Effect of supplementation of wheat straw on growth and lignocellulolytic enzyme potential of *Lentinus edodes*. *World Journal of Agricultural Sciences*. 5 (3): 328 – 331.
- Kaur, J., Chadha, B.S., Kumar, B.A., Saini, A H.S. 2007. Purification of two endoglucanases from *Melanocarpus* sp. MTCC 3922. *Bioresource Technology*. 98: 74-81.

- Khalil, A.I. 2002. Production and characterization of cellulolytic and xylanolytic enzymes from the ligninolytic white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* grown on sugar cane bagasse. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18: 753 – 759.
- Khandeparkar, R.D.S., Bhosle, N.B. 2006. Isolation, purification and characterization of the xylanase produced by *Arthrobacter* sp. MTCC 5214 when grown in solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*. 39: 732-742.
- Koroleva, O.V., Stepanova, E.V., Vladimir, I.B., Vladimir, P.T, Wolfgang, P. 2001. Temperature-induced changes in copper centers and protein conformation of two fungal laccases from *Coriolus hirsutus* and *Coriolus zonatus*. *Biochemical et Biophysical Acta*. 1547: 397 – 407.
- Krause, M., Beauchemin, K. A., Rode, L. M., Farr, B. I., Norgaard, P.1998. Fibrolytic enzyme treatment of barley grain and source of forage in high-grain diets fed to growing cattle. *Journal of Animal Science*. 76: 2912 – 2920.
- Krause, D. O., S. E. Denman, R. Mackie, M. Morrison, A.L. Rae, G.T. Attwood, and C.S. McSweeney. 2003. Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology, and genomics. *FEMS Microbiology Reviews*. 797: 1-31.
- Krueger, N. A., Adesogan, A. T., Staples, C. R., Krueger, W. K., Dean, D. B., Litell, R.C. 2008. The potential to increase digestibility of tropical grasses with a fungal, ferulic acid esterase enzyme preparation. *Animal Feed Science and Technology*. 145: 95-108.
- Kumar, S., Tsai, Ch., Ma, B., Nussnov, R. 2000. Contribution of Salt Bridges Toward Protein Thermostability. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*. 11(1): 79 - 85.
- Kung, L. Jr., and A. O. Hession. 1995. Preventing in vitro lactate accumulation in ruminal fermentation by inoculating with *Megasphaera elsdenii*. *Journal of Animal Science*. 73: 250 - 256.
- Leng, R.A., Brett, D.J. 1966. Simultaneous measurements of the rates of production of acetic, propionic and butyric acids in the rumen of sheep on different diets and the correlation between production rates and concentrations of these acids in the rumen. *British Journal Nutrition*. 20: 541 – 552.

- Lewis, G. E., Hunt, C. W., Sánchez, W.K., Treacher, R., Pritchard, G.T., Feng, P. 1996. Effect of direct-fed fibrolytic enzymes on the digestive characteristics of a forage-based diet fed to beef steers. *Journal of Animal Science*. 74: 3020 - 3028.
- Levin, L., Herrmann, Papinutti, L., 2008. Optimization of lignocellulolytic enzyme production by the white-rot fungus *Trametes trogii* in solid-state fermentation using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*. 39: 207-214.
- Loera, O., Córdova, J., 2003. Improvement of xylanase production by a parasexual cross between *Aspergillus niger* strains. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 46 (2): 177-181.
- Loera, O., Villaseñor, F. 2006. Xylanases. In advances in agricultural and food biotechnology. In: Guevara, R.G., Torres, I. (Eds.). Research Signpost Editorial, Kerala, India. Chapter 14. pp. 305–322.
- Luther, R., Trenkle, A., Burroughs, W. 1966. Influence of rumen protozoa on volatile acid production and ration digestibility in lambs. *Journal of Animal Science*. 25: 1116-1122.
- Mandaluniz, N., Larronde, E., Amores, G., Lecuona, M.V., Rodríguez, B.L., Arranz, J., Ruiz, G., Nájera, O., R. Ruiz, Albisu, A.M, Pérez, E.F., Scheifler, M. 2010. El alperujo resulta un complemento interesante en la dieta de las ovejas lecheras en los períodos sin pasto. ISSN0212-1689, 254: 18-22. <http://www.agenciasinc.es/Noticias/> Visitado el 29 de Noviembre de 2011.
- Marquéz, O. A. E., 2006. Estudios para la producción de una lacasa termoestable por el hongo *Trametes* sp. EUM1. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa. México, D.F.
- Márquez-Araque A. T., Mendoza-Martínez G. D., González, S., Buntinx S., Loera O., 2007. Fibrolytic activity of enzymes produced by *Trametes* sp. EUM1, *Pleurotus ostreatus* IE8 and *Aspergillus niger* AD96.4 in solid fermentation. *Interciencia* 32(11), ISSN0378–1844.
- Márquez, A., Mendoza, G., Pinos-Rodríguez, J.M., Zavaleta, H., González, S.S., Buntinx, S., Loera, O., Meneses, M. 2009. Effect of fibrolytic enzymes and incubation pH on *in vitro* degradation of NDF extracts of alfalfa and orchard grass. *Italian Journal of Animal Science*. 8: 221 – 230.

- Martínez, V.F.J. 2011. Efecto de estrés térmico en la producción de lacasas en *Fomes* sp. EUM1. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. México, D.F.
- Martínez, T.A., Speranza, M., Ruíz-Dueñas, J.F., Ferreira, P., Camarero, S., Guillén, F., Martínez, J.M., Gutiérrez, A., del Río, C.J. 2005. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology*. 8: 195 -204.
- Massadeh, M.I.; Yusoff W.M.W.; Omar, O.; Kader, J. 2001. Synergism of cellulose enzymes in mixed solid substrate fermentation. *Biotechnology Letters*. 23: 1771-1774.
- Mayer, M., Staples C. 2002. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry*. 60:551 – 565.
- McAllister, T. A., Oosting, S.J., Popp, J. D., Mir, Z., Yanke, L.J., Hristov, A.N., Treacher, R.J., Cheng, K.J. 1999. Effect of exogenous enzymes on digestibility of barley silage and growth performance of feedlot cattle. *Canadian Journal of Animal Science*. 79: 353 – 360.
- McCollough, H. 1967. The determination of ammonia in whole blood by direct colorimetric method. *Clinical Chemistry*, 17: 297-304.
- Medina, R.E. 2003. Caracterización de lacasas producidas por un hongo termofílico silvestre aislado a partir de desechos lignocelulósicos. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México, D.F.
- Membrillo, I., Sánchez, 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 Technology*. 99, 7842 –7847.
- Membrillo, I., Sánchez, C., Meneses, M., Favela, E., Loera, O. 2011. Particle geometry affects differentially substrate composition and enzyme profiles by *Pleurotus ostreatus* growing on sugar cane bagasse. *Bioresource Technology* 102:1581-1586
- Méndez, H. J.E. 2010. Decoloración del índigo carmín por medio de una estrategia basada en el cultivo sólido de *Fomes* sp. EUM1. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. México, D.F.

- Meneses, M., Madrid, J., Martínez, A., Hernández, F., Gallego, A., Megías, M.D. 2007. Evaluación fermentativa del ensilado del subproducto de alcachofa (*Cynara scolymus* L.) en tres niveles de un microsilo. *Anales de Veterinaria*, 23: 129 – 136.
- Mesgaran, M.D., Malakkhahi, ., Heravi, M.A.R., Vakili, A., Tahmasbi, A. 2010. *In situ* ruminal degradation and *in vitro* gas production of chemical treated sesame stover. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 9: 2256 – 2260.
- Miller, G. L., Blum, R., Glennon, W. E., Burton, A. L. 1960. Measurement of carboxymethylcellulase activity. *Analytical Biochemistry*. 2, 127-132.
- Miron, J., D. Ben-Ghedalia y M.Morrison. 2001. Invited review: adhesion mechanisms of rumen cellulolytic bacteria. *Journal of Dairy Science* 84:1294 – 1309.
- Montes, H.C. Magaña, P.I. 2002. Enzimas con aplicación industrial. In: XXX Aniversario de Biotecnología y Bioingeniería. Avance y perspectiva Cinvestav. 21:279 – 282.
- Morgavi, P., James, N.C., Beever, D.E., Wallace, R., 2000. Stability and stabilization of potential feed additive enzymes in rumen fluid. *Enzyme and Microbial Technology* 26: 171-177
- Muhamad, B., Suwandiyastuti, S. N. O. 2005. The improving quality of concentrate diet with fibrolytic enzyme and its effect on rumen metabolism and blood parameter of fattening Holstein male. *Animal Production* 7, 127-134.
- Muirhead, S. 1996. *Direct Fed Microbial, Enzyme and Forage Additive Compendium*, 3rd edn. The Miller Publishing Company, Minnetonka, Minnesota, 391 pp.
- Muwalla, M. M., Haddad, S. G., Hijazeen, M. A. 2007. Effect of fibrolytic enzyme inclusion in high concentrate fattening diets in nutrient digestibility and growth performance of Awassi lambs. *Livestock Science*. 111: 255-258.
- Nandakumar, M.P., Thakur, M.S., Raghavarao, K.S., Ghildyal, N.P., 1994. Mechanism of solid particle degradation by *Aspergillus niger* in solid substrate fermentation. *Process Biochemistry* 29: 545-551.
- Nosoh Y. and Sekiguchi T. 1990. Protein engineering for thermostability. *TIBTECH*. 8:16-20

- NRC, 1999. Nutrient Requirement of Sheep. National research Council, National Academy of Sciences. National Academies Press, Washington, DC.
- Nserenko, V.L., Morgavi, D.P., Rode, L.M., Beauchemin, K.A., McAllister, T.A., 2000. Effects of the fungal preparation on hydrolysis and subsequent degradation of alfalfa hay fiber by mixed rumen microorganism *in vitro*. *Animal Feed Science and Technology* 88: 153-170.
- Ordaz, H.A. 2008. Efecto de la temperatura en la producción de enzimas lignocelulolíticas por *Fomes* sp. EUM1 en cultivo sólido. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. México, D.F.
- Ordaz, A., Favela E., Meneses M., Mendoza G., Loera O. 2012. Hyphal morphology modification in the thermal adaptation by the white rot fungus *Fomes* sp. EUM1. *Journal of Basic Microbiology*.52: 167-174. DOI: 10.1002/jobm.201000528
- Ordaz, H.A. 2012. Cambios en el crecimiento hifal y del patrón de secreción de enzimas durante la adaptación térmica del hongo de pudrición blanca *Fomes* sp. EUM1. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana. Iztapalapa. México, D.F.
- Pandey, A., Selvakumar, P., Soccol, C.R., Nigam, P. 1999. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current Sciences* 77: 149-162.
- Pandey, A., Soccol, C.R., Nigam, P., Soccol, V.T. 2000 Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, 74:69-80.
- Pandey, A., 2003. Solid-State fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 13: 81-84.
- Papinutti, L., Dimitriu, P., Forchiassin, F., 2008. Stabilization studies of *Fomes sclerodermeus* laccases. *Bioresource Technology*. 99, 419–424.
- Peláez, A., Meneses, M.M., Miranda, L.A., Megías, M.D., Barcena, G.R., Loera, O., 2008. Advantages of solid fermentation state with *Pleurotus sapidus* in sugar cane silage. *Archivos de Zootecnia* 57: 25-33.
- Peláez-Acero, A., Meneses-Mayo, M., Miranda-Romero, L. A., Ayala-Martínez, M., Crosby-Galván, M. M., Loera-Corral, O., Mejías-Rivas, M. D. 2011.

Fibrolitic enzymes produced by solid-state fermentation to improve sugar cane silage. *Agrociencia-México*. 45, 675- 685.

- Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., de la Rubia, R.T., Martínez, J. 2002. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Microbiology*, 5: 53 -63.
- Pinos-Rodríguez, J. M., González, S. S., Mendoza, G. D., Bárcena, R., Cobos, M. A., Hernández, A., Ortega, M. E. 2002. Effect of exogenous fibrolitic enzyme on ruminal fermentation and digestibility of alfalfa and rye-grass hay fed to lambs. *Journal of Animal Science*. 80: 3016-3020.
- Pinos-Rodríguez, J.M., Moreno, R., González, S.S., Robinson, P.H., Mendoza, G., Álvarez, G. 2008. Effects of exogenous fibrolitic enzymes on ruminal fermentation and digestibility of total mixed rations fed to lambs. *Animal Feed Science & Technology*. 142: 210 – 219.
- Polizeli, 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. *Applied Microbiology and Technology*, 67: 577 – 591.
- Qinnghe, Cai; Yue Xiaoyu; Niu Tiangui; Ji Cheng; Ma Qiugang. 2004. The screening of culture condition and properties of xylanase by white.rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Process Biochemistry* 39: 1561-1566.
- Quiroz-Castañeda, R.E., Pérez-Mejía, N., Martínez-Ayala, C., Acosta-Urdapilleta, L., Folch-Mallol, J. 2011. Evaluation of different lignocellulosic substrates for the production of cellulases and xylanases by the basidiomycete fungi *Bjerkandera adusta* and *Pycnoporus sanguineus*. *Biodegradation*. 22: 565 – 572.
- Ramírez, C.L., Aranda, E.I., Mendoza, M.G., Landois, P.L., Miranda, R.L.A., Crosby, G.M.M., 2005. Caracterización de productos fibrolíticos comerciales utilizados en la alimentación de rumiantes. *Veterinaria México*. 36: 1-9.
- Rabinovich M. L., Melnick M. S and Bolobova A.V., 2002. The structure and mechanism of action of cellulolytic enzymes. *Biochemistry (Moscow)*, 67 (8): 850 - 871.
- Regalado, Carlos, Vázquez-Obregón, I., García-Almendárez, B.E., Domínguez-Domínguez, J., Aguilera-Barreyro, A., Amaro-Reyes, A. 2010. Xylanolytic enzymes production by *Aspergillus niger* GS1 from solid state fermentation on corn stover and their effect on ruminal digestibility. *Journal of Biotechnology* ISSN: 0717-3458

- Rivera, G.O.F, Zapata, R.S.M. 2006. Efecto de la adición de Multi-zyme® sobre La digestibilidad *in vitro* de raciones totalmente mezcladas para vacas lecheras en California, EUA. Tesis de Ingeniería en Agronomía. Zamorano, Honduras.
- Rode, L., Yang, W.Z., Beauchemin, K.A. 1999. Fibrolytic enzyme supplements for dairy cows in early lactation. *Journal Dairy Science*. 82: 2121-2126.
- Rodríguez-Couto, S., Moldes, D., Liébans, A., Sanroman, A. 2005. Application of solid state fermentation to lignolytic enzymes production. *Biochemical Engineering Journal*. 22(3): 211-219.
- Rodríguez, M.A.M., Pinto, P., Bezerra, R.M.F., Dias, A.A., Guedes, C.V.M., Cardoso, V.M.G., Cone J.W., Ferreira, L.M.M., Colaço, J., Sequeira, C.A., 2008. Effect of enzymes extracts isolated from white-rot fungi on chemical composition and *in vitro* digestibility of wheat straw. *Animal Feed Science and Technology*. 141: 326–338.
- Rogalski, J., Hatakka A., Wojtas-Wasilewska M., Leonowicz A. 1993. Cellulolytic enzymes of the ligninolytic white-rot fungus *Phelebia radiata*. Determination of enzyme activities. *Acta Biotechnologica* 13:47-51.
- Rovics, J. J., Ely, C. M. 1962. Response of beef cattle to enzyme supplement. *Journal of Animal Science* 21, 1012.
- SAGARPA, 2006. Servicio de información y estadística agroalimentaria y pesquera. www.siap.sagarpa.gob.mx. [Fecha de consulta: 23/10/2008].
- Sánchez, C., 2009. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*. 27: 185-194.
- Schlosser D., Grey R., Fritsche W., 1997. Patterns of ligninolytic enzymes in *Trametes versicolor*. Distribution of extra- and intracellular enzyme activities during cultivation on glucose, wheat straw and beech wood. *Applied Microbiology and Biotechnology* 47: 412-418.
- Schofield, P., Pell, A.N. 1995. Measurement and kinetic analysis of the neutral detergent soluble carbohydrate fraction of legumes y grass. *Animal Science Journal* 73: 3455-3463.
- Shah, R.A., Madamwar, D. 2005. Xylanase production under solid-state fermentation and its characterization by an isolated strain of *Aspergillus*

- foetidus* in India. World Journal of Microbiology and Biotechnology 21(3): 233 - 243.
- Sharma, R.K., Arora, D.S. 2010. Production of lignocellulolytic enzymes and enhancement of *in vitro* digestibility during solid state fermentation of wheat straw by *Phlebia floridensis*. Bioresource Technology.. 101: 9248 - 9253.
 - Solovyeva, I.V., Ananjin, V.M., Boev, A.V., Okunev, O.N. 1997. The controlled biosynthesis of cellobiase by *Aspergillus fungi*. Process Biochemistry 32: 21-28.
 - Stack, R.J., Hungate, R.E. 1984. Effect of 3-henylpropanoic acid on capsule and cellulases of *Ruminococcus albus* 8. Applied and Environmental Microbiology 48(1): 218 -223.
 - Steel, G. D. R., Torrie, J. H., Dickey, D.A. 1997. Principles and procedures of statistics. A biometrical approach. New York: The McGraw-Hill Companies, Inc. p. 637.
 - Suguimoto, H.H.; Barbosa A.M.; Dekker R.F.H.; Castro-Gomez R. J.H., 2001. Veratryl alcohol stimulates fruiting body formation in the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*. FEMS Microbiology Letters. 194: 235-238.
 - Tang, S.X., Tayo, G.O., Tan, Z.L., Sun, Z.H., Shen, L.X., Zhou, C.S., Xiao, W.J., Ren, G.P., Han, H.F., Shen, S.B. 2008. Effects of yeast culture and fibrolytic enzymes supplementation on *in vitro* fermentation characteristics of low-quality cereal straws. Journal of Animal Science. 86:1164 - 1172.
 - Tengerdy, R.P., Szakacs, G. 2003. Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation. Biochemical Engineering Journal 13: 169–179.
 - Theodorou, M., B. A. Williams, M. S. Dhanoa, A. B. McAllan, J. France. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. Animal Feed Science and Technology. 48: 185 - 197.
 - Thurston, C. F. 1994. The structure and function of fungal laccase. Microbiology. 140: 19-26
 - Topakas, E., Katapodis, P., Kekos, D., Macris, B.J., Christakopoulos, P. 2003. Production and partial characterization of xylanase by *Sporotrichum thermophile* under solid-state fermentation. World Journal of Microbiology & Biotechnology. 19: 195-198.

- Tricarico, J.M., K.A. Dawson, K.E. Newman. 1998. Effects of a microbial enzyme preparation (Fibrozyme) on ruminal digestion of fescue hay. *Journal of Animal Science*, 76 (supple, 1):289.
- Tuomela, M., Vikman, M., Hatakka, A., Itävaara, M. 2000. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. *Bioresource Technology* 72 169-183.
- Van Soest, P. J., Robertson, J. B., Lewis, B. A., 1991. Methods for dietary fibre, neutral detergent fibre, and nonstarch carbohydrates in relation to animal nutrition. *Journal Dairy Science*. 74, 3583–3597.
- Varel, V. H., Kreikemeier, K. K., Jung, H. G. and Hatfield, R. D. 1993. *In vitro* stimulation of forage fiber degradation by ruminal microorganisms with *Aspergillus oryzae* fermentation extract. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 3171-3176.
- Villegas-Castañeda, M., Meneses-Mayo, M., Miranda-Romero, L. A., Loera-Corral, O. 2010. Producción de gas *in vitro* y desaparición de la materia seca del cultivo sólido con hongos ligninolíticos. *Agrociencia*. 44, 917-929.
- Viniegra-González, G., Favela-Torres, E., Aguilar, C.N., Romero-Gómez, S., Díaz-Godínez, G., Augur, C. 2003. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal*. 13: 157-167
- Wang, Y., Spratling, B. M., ZoBell, R. D., Wiedmeier, R. D., McAllister, T. A., 2004. Effect of alkali pretreatment of wheat straw on the efficacy of exogenous fibrolytic enzymes. *Journal of Animal Science*. 82:198-208.
- Xiaoping, X, Xianghua, W, Yanan, B, Yi, Q. 2008. Effects of culture conditions on ligninolytic enzymes and protease production by *Phanerochaete chrysosporium* in air. *Journal of Environmental Sciences*. 20: 94-100.
- Yang, W. Z., Rode, L. M. and Beauchemin, K. A. 1998. Effects of fibrolytic enzyme additives on milk production of dairy cows. *Journal of Animal Science* 76, Suppl. 1, 320.Suppl. 1, 320.
- Yang, W.Z., K.A. Beauchemin, L.M. Rode. 1999. Effects of an enzyme feed additive on extent of digestion and milk production of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 82: 391 -403.

- Yang, W., Liu, J., Wang, W., Zhang, Y., Gao, P., 2004. Function of a low molecular peptide generated by cellulolytic fungi for the degradation of native cellulose. *Biotechnology Letters*. 26, 1799–1802.
- Zhu, Y, Zhang, H, Zhang,YL, Huang, F. 2011. Lignocellulose degradation, enzyme production and protein enrichment by *Trametes versicolor* during solid-state fermentation of corn stover. *African Journal of Biotechnology*. 10: 9182-9192.
- Ziin, R.A., Ware, R.A. 2002. Fibrolytic enzymes supplementation a tool for enhacing energy intake in growing-finishing feedlot cattle. Department of Animal Science, University of California, USA. pp. 219-224.

Dr. O. Loera,
Departamento de Biotecnología,
Universidad Autónoma Metropolitana,
Unidad Iztapalapa,
09340, México D. F., México.

In the Name of Allah

Dear colleague Dr. Loera,

I am pleased to inform you that your manuscript entitled:

"Efficiency of Lignocellulolytic Extracts from the Thermotolerant Strain *Fomes* sp. EUM1: Stability and Digestibility of Agricultural Wastes" by: O. Arce-Cervantes, G. Mendoza, L. A. Miranda, M. Meneses, O. Loera

has been accepted as an article for the Journal of Agricultural Science and Technology. Your article will be published in Vol. 15, No2, March 2013.

Sincerely Yours,



K. Poustini
Editor-in-Chief