



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD Y DE LA PRODUCCIÓN ANIMAL

OBTENCIÓN DE ENZIMAS FIBROLÍTICAS DE *Agaricus bisporus* POR  
FERMENTACIÓN SOLIDA DE ESQUILMOS AGRÍCOLAS PARA LA  
ALIMENTACIÓN DE RUMIANTES

Tesis para obtener el grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS

Presenta

MARICELA AYALA MARTÍNEZ

Tutor  
SERGIO S GONZÁLEZ MUÑOZ

Comité Tutorial  
CARLOS VÁZQUEZ PELAEZ  
DAVID G. MENDOZA MARTÍNEZ



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **AGRADECIMIENTOS**

A CONACYT por el subsidio con el proyecto CONACYT 42782-Z y por el respaldo constante durante mi formación académica.

Al Colegio de Postgraduados

A la Universidad Autónoma Metropolitana (Iztapalapa y Xochimilco)

A la Universidad Autónoma de Chapingo

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México

## RESUMEN

Las enzimas fibrolíticas aisladas de hongos y bacterias aumentan la degradación de los forrajes, por lo cual se puede usar la capacidad de *Agaricus bisporus* para obtener celulasas, xilanasas y lacasas que degraden residuos agrícolas o forrajes altos en fibra. El objetivo del presente estudio fue obtener, conservar las enzimas fibrolíticas de *A. bisporus* y evaluar su efecto sobre la degradación *in vitro* de alfalfa (*Medicago sativa*), paja de cebada (*Hordeum vulgare*), pasto ovillo (*Dactylis glomerata*), pasto Taiwan (*Pennisetum purpureum*) y composta usada por *A. bisporus*. Los extractos se obtuvieron de composta usada por *A. bisporus* después de 50, 60 y 90 d de cultivo, usando amortiguador de citrato (50 mM, pH 5.3) y se conservaron en refrigeración (R), R con ácido benzoico (RB), congelación (C), C con ácido benzoico (CB), C más glicerol (CG), congelación con glicerol y ácido benzoico CGB, y liofilización; las mediciones se hicieron a 1, 7, 14, 28, 56, 101 y 180 d. El diseño experimental fue completamente al azar con arreglo factorial de tratamientos; se analizaron los resultados por contrastes ortogonales, regresión y comparación de medias (Tukey;  $P < 0.01$ ). La actividad celulasa presentó un efecto cuadrático ( $P < 0.01$ ) aumentando al transcurrir los d de cultivo, obteniendo la mayor actividad a los 60 d. La actividad xilanasas no fue afectada ( $P > 0.01$ ) por la edad de cultivo. La lacasa aumentó linealmente ( $P < 0.01$ ) con los d de cultivo. Al aumentar los d de conservación disminuyeron las actividades enzimáticas. Los métodos de conservación con mayor actividad residual fueron C, CG, CB y L. ( $P < 0.01$ ). Para el estudio *in vitro* se usó además un compuesto enzimático comercial (Fibrozyme). Las enzimas de *A. bisporus* afectaron positivamente ( $P < 0.01$ ) la fracción A (soluble) de alfalfa, y la fracción B (potencialmente digestible) de la composta de *A. bisporus*, así como de pasto Taiwan y paja de cebada. El Fibrozyme aumentó la degradación de la fracción B en pasto ovillo y alfalfa. Las enzimas *A. bisporus*, así como el compuesto enzimático, aumentaron la desaparición *in vitro* de la FDA pero no la de FDN. Por tanto es posible obtener y conservar los extractos enzimáticos de composta usada por *A. bisporus*, con una cantidad considerable de actividad enzimática fibrolítica, con actividad adicional de

lacasas, mostrando efecto positivo en la degradación de la materia seca y fibra de cuatro forrajes.

Palabras clave: *Enzimas fibrolíticas, degradación in vitro, forrajes, métodos de conservación, A. bisporus*

## ABSTRACT

Fibrolytic enzymes from fungi and bacteria, increased the degradation of the forage, its can use the ability of *Agaricus bisporus* for cellulases, xylanases and laccases to degrade crop residues high in fiber. The objective of this study was to obtain and characterize the stability of fibrolytic enzymes from *A. bisporus* and to evaluate its effect on *in vitro* degradation of alfalfa (*Medicago sativa*), barley straw (*Hordeum vulgare*), grass (*Dactylis glomerata*), Taiwan grass (*Pennisetum purpureum*) and spent compost from *A. bisporus*. The extracts were obtained from blocks of *A. bisporus* after of 50, 60 and 90 d of culture, using citrate buffer (50 mM, pH 5.3) and kept in refrigeration (R), benzoic acid R (RB), freezing (F), with F benzoic acid (FB), more glycerol C (FG), frozen with glycerol and benzoic acid FGB, and lyophilization (L); variables were measured at 1, 7, 14, 28, 56, 101 and 180 d. The experimental design was completely randomized in a factorial arrangement, the results were analyzed by regression and orthogonal contrasts; means were compared using Tukey ( $P < 0.01$ ). The cellulase activity presented a quadratic effect ( $P < 0.01$ ) and the highest activity was obtained at 60 d of cultivation. The xylanase activity was not affected ( $P > 0.01$ ) by the days of culture. The laccase increased linearly ( $P < 0.01$ ) with days of cultivation. As days of conservation increased there was a decreased enzymatic activity. Conservation methods showing greater residual activity were F, FG, FB and L ( $P < 0.01$ ). Enzymes from *A. bisporus* affected positively ( $P < 0.01$ ) A fraction (soluble) of alfalfa, and the fraction B (potentially digestible) of the compost *A. bisporus*, Taiwan as well as grass and barley straw. Fibrozyme increased degradation of the

fraction B in grass and alfalfa. Enzyme from *A. bisporus* and Fibrozyme increased the *in vitro* disappearance of the FDA but not the NDF. Therefore it is possible to obtain and stabilize the enzymatic extracts of compost expended of *A. bisporus*, with a considerable amount of enzyme fibrolytic activity with additional activity of laccases showing positive effect on the degradation of dry matter and fiber from different forages

Keywords: Fibrolytic enzymes, degradation *in vitro*, forages, conservation methods, *A. bisporus*

## CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	I
RESUMEN.....	II
ABSTRACT.....	IV
LISTA DE CUADROS.....	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	IX
ABREVIATURAS Y SIGLAS USADAS.....	X
INTRODUCCIÓN.....	1
Justificación.....	4
Objetivos.....	5
Hipótesis.....	6
REVISIÓN DE LITERATURA.....	7
Importancia de los forrajes en la alimentación de rumiantes.....	7
<i>Agaricus bisporus</i> , hongo comestible degradador de residuos fibrosos.....	8
Cultivo comercial del champiñón.....	10
Pared celular.....	13
Componentes de la fibra.....	16
Enzimas.....	17
Enzimas endógenas.....	17
Enzimas exógenas.....	18
Enzimas exógenas fibrolíticas.....	18
MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
Ubicación.....	20
Material de experimentación.....	20

Análisis de laboratorio.....	21
Experimentación fase I.....	23
Experimentación fase II.....	24
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
Fase I.....	28
Fase II.....	33
CONCLUSIONES.....	36
REFERENCIAS.....	37

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Proteína soluble y actividades enzimáticas de extractos de <i>A. bisporus</i> a diferente edad de cultivo.....	<b>51</b>
<b>Cuadro 2.</b> Actividad enzimática y proteína soluble de extractos enzimáticos de residuos de <i>A. bisporus</i> de 60 d de siembra, conservados con diferentes métodos.....	<b>52</b>
<b>Cuadro 3.</b> Efecto de enzimas fibrolíticas sobre la degradación <i>in vitro</i> de la materia seca (MS), fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácido (FDA) de heno de alfalfa.....	<b>53</b>
<b>Cuadro 4.</b> Degradación <i>in vitro</i> a diferente tiempo de incubación, de materia seca (MS), fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácido (FDA) de heno de alfalfa.....	<b>54</b>
<b>Cuadro 5.</b> Efecto de enzimas fibrolíticas sobre la degradación <i>in vitro</i> de la materia seca (MS) de cuatro forrajes.....	<b>55</b>
<b>Cuadro 6.</b> Degradación <i>in vitro</i> a diferente tiempo de incubación de la materia seca de cuatro forrajes .....	<b>56</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Cantidad de proteína (mg) y actividad celulasa (UI) en composta de <i>A. bisporus</i> .....	<b>45</b>
<b>Figura 2.</b> Actividad xilanasa y lacasa (UI) en composta usada por <i>A. bisporus</i> .....	<b>46</b>
<b>Figura 3.</b> Efecto de método y tiempo de conservación sobre la actividad celulasa de composta usada por <i>A. bisporus</i> .....	<b>47</b>
<b>Figura 4.</b> Efecto de método y tiempo de conservación sobre la actividad xilanasa de composta usada por <i>A. bisporus</i> .....	<b>48</b>
<b>Figura 5.</b> Efecto de método y tiempo de conservación sobre la actividad lacasa de composta usada por <i>A. bisporus</i> .....	<b>49</b>
<b>Figura 6.</b> Concentración de nitrógeno amoniacal en líquido ruminal incubado <i>in vitro</i> con enzimas fibrolíticas de <i>A. bisporus</i> .....	<b>50</b>

## ABREVIATURAS Y SIGLAS USADAS

C congelación

R refrigeración

L liofilización

CB congelación con ácido benzoico

CG congelación con glicerol

RB refrigeración con ácido benzoico

h hora

mg miligramo

mL mililitro

$\lambda$  longitud de onda

nm nanómetro

d día

t tonelada

ha hectárea

Mcal megacaloría

MS materia seca

FDA fibra detergente ácido

FDN fibra detergente neutro

EM energía metabolizable

Kg kilogramo

CS cultivo solido

mM milimolar

min minuto

g gramo

$\mu\text{L}$  microlitros

UI unidades internacionales.

## INTRODUCCIÓN

Los esquilmos agrícolas se obtienen de la cosecha de cereales como maíz, cebada y trigo (Souza et al. 2001), o de la utilización del forraje para un producto como bagazo de caña, punta de caña, bagacillo, cachaza y melaza, derivados de la producción de azúcar (Aranda 2000). Los esquilmos agrícolas son productos con alto grado de lignificación y su calidad nutricional es mala. Estos subproductos son generados en gran volumen, como en el cultivo de maíz de cuya gran cantidad de biomasa sólo se cosecha 50 % en forma de grano y el resto corresponde a caña, hoja, limbo y mazorca, conocido como rastrojo, lo que representa de 16 a 25 t ha<sup>-1</sup> (Manterola *et al.*, 1999). Los esquilmos producidos en mayor cantidad en México son rastrojo de maíz, paja de cebada y bagazo de caña de azúcar (Gaitán, 2002) y uno de sus usos principales es como una fuente de nutrientes abundante y barata para los rumiantes. Sin embargo, el rastrojo de maíz, en comparación con las pajas de otros cereales, tiene poca proteína (3 %) y gran cantidad de pared celular (70 %), lo que lo hace un residuo con mayor contenido energético (1.60 y 2.1 Mcal kg<sup>-1</sup> MS (Manterola *et al.*, 1999). La paja de cebada también aporta poca proteína (2 %), alto contenido de pared celular (73 %), baja digestibilidad *in vitro* (32 %), 1.15 Mcal EM kg<sup>-1</sup> MS y 1.4 Mcal ED kg<sup>-1</sup> MS (Laforé *et al.*, 1999).

Se ha intentado mejorar la digestibilidad de los esquilmos agrícolas mediante diversos procesos: físicos como el molido; químicos como la utilización de hidróxido de sodio o urea; biológicos como el ensilaje (fermentación anaerobia), la fermentación sólida (aerobia); cultivos bacterianos, de hongos o productos como las enzimas (Yescas *et al.*, 2004) utilizados para aprovechar los nutrientes potencialmente digeribles de los esquilmos. Los principales componentes de los forrajes son hemicelulosa y celulosa, que pueden ser digeridos en gran medida por enzimas fibrolíticas presentes en rumen. Sin embargo, la utilización ruminal de

los compuestos estructurales de la pared celular de los forrajes y esquilmos agrícolas puede ser aumentada con la adición de enzimas externas como celulasas, xilanasas, lignocelulasas, para complementar la actividad de los microorganismos ruminales. Las enzimas fibrolíticas, aisladas de hongos y bacterias, han mostrando efectos positivos en varios estudios. Es posible encontrar este tipo de enzimas de procedencia comercial, pero su costo es elevado debido a que son obtenidas mediante aislamiento.

Debido al exceso de producción de esquilmos agrícolas a la par se ha incrementado, la producción mundial de hongos cultivados. De esta producción mundial de hongos, un 70 % corresponde a *Agaricus bisporus* (champiñón), *Pleurotus oestratus* (setas) y *Lentinula edodes*. El hongo *A. bisporus*, puede degradar sustratos lignocelulósicos como residuos agrícolas, industriales y maderables (Martínez *et al.*, 1984) porque es un hongo saprofito que de manera natural crece en bosques, y sobre madera en descomposición (González, 1991); además, dentro su contenido proteínico encontramos aminoácidos esenciales (triptofano, treonina, lisina y metionina), vitaminas del complejo B y minerales (Ca, K y P). El cultivo de *A. bisporus* sobre fermentación sólida tiene mayores ventajas que el realizado en medio líquido, ya que las esporas resisten mayor tiempo en condiciones adversas como la deshidratación, exceso de agua, y presentan una mayor adherencia al sustrato. La producción de hongos ha incrementado en México y en varios países más debido a que es una alternativa parcial para remediar la insuficiencia alimentaría así como la contaminación causada por desechos orgánicos de origen agroindustrial; sin embargo, este aumento en la producción de hongos ha elevado paralelamente los desechos contaminantes derivados de su cultivo (Salmones *et al.*, 1997; Guillen *et al.*, 1998; Vogel, 2000). Por esta razón, la fermentación sólida de hongos, ha ofrecido, además, una alternativa para la producción de enzimas fibrolíticas, que pueden ser utilizadas en la alimentación de rumiantes (Muller *et. al.*, 2004). *A. bisporus*, el hongo más comestible en el mundo (Chang, and Miles, 2004), ha sido cultivado en sustratos como esquilmos agrícolas, pollinaza y cerdaza (Mamiro and Royse, 2008).

La composta utilizada como sustrato por *A. bisporus* presenta dos componentes principales: contenidos lingocelulosicos y biomasa microbiana, los cuales producen grandes cantidades de enzimas fibrolíticas como celulasas, hemicelulasas y lacasas (Durrant *et al.*, 1991; Bonnen *et al.*, 1994; De Groot *et al.*, 1998) asociadas al sustrato usado por el hongo (Ball y Jackson, 1995; Pandey, 2003). Las bacterias termófilas predominan en la composta al iniciarse el cultivo de *A. bisporus*, posteriormente disminuye al avanzar la población del actinomiceto (Ball y Jackson, 1995). La concentración de celulosa es elevada entre los 30 y 60 d de cultivo (Wood y Goodenough (1977), mientras que las enzimas xilanasas y lacasas se incrementan al final de proceso (después de 60 d de cultivo) (Wood y Goodenough 1977; Bonen *et al.*, 1994). Para conservar las enzimas fibrolíticas comerciales se ha usado refrigeración (Valenzuela y Ortiz, 2007), congelación (Sánchez y Corrales, 2005), ácido benzoico y glicerol (Chanasattru *et al.*, 2008). Sin embargo, no se han caracterizado las enzimas fibrolíticas y lacasas contenidas en la composta usada por *A. bisporus*, ni tampoco se han evaluado métodos de conservación de extractos enzimáticos obtenidos de *A. bisporus*. Por tal motivo, el objetivo del presente estudio fue obtener, cuantificar y conservar las enzimas fibrolíticas contenidas en la composta usada por *A. bisporus*, para posteriormente evaluar su efecto sobre la degradación *in vitro* de diferentes forrajes, leguminosas como la alfalfa (*Medicago sativa*), gramíneas como pasto ovillo (*Dactylis glomerata*) y pasto Taiwan (*Pennisetum purpureum*); esquilmos agrícolas como la paja de cebada (*Hordeum vulgare*) y la misma composta gastada del cultivo de *A. bisporus*.

## JUSTIFICACIÓN

La efecto y la estabilización de las enzimas fibrolíticas presentes en la composta usada por *Agaricus bisporus* (champiñón) en cultivo sólido estudiadas en la presente investigación son importantes, primero, para la utilización de un subproducto que representa un problema ambiental, y en segundo lugar, por el potencial del subproducto para ser integrado como aditivo en dietas para rumiantes, lo cual incrementará la degradación de la materia seca y la fibra de la dieta.

## OBJETIVOS

- I. Obtener el extracto enzimático del residuo de la cosecha de *A. bisporus*, y analizar su efecto a diferente edad de siembra, conservado con diferentes métodos, para conocer la degradación *in vitro* de las enzimas de *A. bisporus*.
- II. Evaluar el efecto de las enzimas celulasas, xilanasas y lacasas de *A. bisporus* y una extracto enzimático comercial a base de xilanasa sobre la desaparición *in vitro* de la MS, FDN y FDA de alfalfa
- III. Evaluar el efecto de las enzimas celulasas, xilanasas y lacasas de *A. bisporus* y una extracto enzimático comercial a base de xilanasa sobre sobre la desaparición *in vitro* de la materia seca de alfalfa, pasto ovillo, Taiwan, paja de cebada y composta usada por *A. bisporus*

## HIPÓTESIS

- I. Es posible obtener, medir y conservar, la actividad de enzimas celulasas, xilanasas y lacasas de *A. bisporus*
- II. La degradación *in vitro* de las enzimas fibrolíticas y lacasas de *A. bisporus* es similar a la de un extracto comercial basado en xilanasas.
- III. La adición de enzimas de *A. bisporus* o una enzima comercial puede incrementar la desaparición *in vitro* de la MS, FDN y FDA de alfalfa
- IV. La adición de enzimas de *A. bisporus* o una enzima comercial incrementa la desaparición *in vitro* de la MS de alfalfa, orchard, paja de cebada, Taiwan y residuo de cosecha de *A. bisporus*

## REVISIÓN DE LITERATURA

### Importancia de los forrajes en la alimentación de rumiantes

El comportamiento productivo de los rumiantes está directamente relacionado con la alimentación y con la finalidad de optimizar el rendimiento productivo, se evalúan modificaciones de los ingredientes dietarios, a través de las diferentes variables productivas. A diferencia de otras especies, los nutrientes del alimento deben cubrir los requerimientos de los microorganismos ruminales, además de satisfacer los requerimientos de mantenimiento y producción del rumiante. El ecosistema microbiano ruminal es muy diverso, está adaptado para digerir fuentes de alimentos fibrosos, y puede utilizar diversos forrajes con alta cantidad de fibra; sin embargo, la pared celular de las plantas contiene polisacáridos entrelazados a lignina y otros componentes fenólicos, los cuales limitan su degradación por los microorganismos. Las barreras bioquímicas y físicas presentes en los sustratos ingeridos y los límites en el tiempo de retención en el rumen, son algunos de los factores que limitan la degradación de la fibra por los rumiantes (Wang y McAllister, 2002). Además los ingredientes para rumiantes contienen algunos compuestos secundarios como polifenoles y saponinas (McAllister *et al.*, 1993, Wang *et al.*, 2001), así como ácidos fenólicos y sílice en la pared celular que usualmente tienen un efecto negativo sobre la actividad celulolítica (Bae *et al.*, 1997). Aunque el mayor obstáculo para la degradación eficiente de la pared celular en el rumen, lo constituyen los cruces entrelazados entre celulosa, hemicelulosa, lignina y otros compuestos que limitan el acceso de las enzimas bacterianas a los sustratos.

En la actualidad hay una mayor utilización de subproductos agrícolas o forrajes con alta cantidad de fibra y baja calidad nutricional en la alimentación de rumiantes. Por esta razón se han desarrollado nuevas tecnologías para intensificar los sistemas de producción de rumiantes mediante un uso más eficiente de recursos naturales y económicos disponibles, sin afectar los indicadores de productividad y de satisfacción de la demanda de alimentos de una población en un crecimiento exponencial. En este sentido, algunas razones explican la inclusión de aditivos utilizados con frecuencia en la alimentación de rumiantes (West, 2000):

- Complementación de nutrientes para incrementar la actividad metabólica del rumiante.
- En vacas lecheras de alta producción el uso de aditivos ayuda a mantener un deseable ambiente ruminal porque las dietas son concentradas y hay un alto consumo de alimento, lo cual condiciona la síntesis de compuestos orgánicos por los microorganismos ruminales.
- Complementación estratégica con elementos o nutrientes deficitarios ante el considerable empleo de subproductos de bajo o variable valor nutricional
- Modificadores metabólicos necesarios para altos requerimientos, como en las etapas fisiológicas y productivas de mayor demanda nutricional.
- Productos que incrementan la inmunidad de los animales y por ende, su resistencia a enfermedades.
- Aditivos que mejoran las funciones microbianas ruminales y pueden incrementar la digestión de la fibra, así como la biosíntesis proteínica.

Las enzimas fibrolíticas obtenidas de la fermentación sólida por hongos son aditivos que hacen más eficiente degradación de los componentes de la pared celular de los ingredientes fibrosos usados para la alimentación de rumiantes (Alexopoulos y Mims, 1985).

*Agaricus bisporus*, hongo comestible degradador de residuos fibrosos

Los hongos (*micetos*) son organismos eucarióticos, portadores de esporas, aclorofilicos que se reproducen sexual o asexualmente, y cuyas estructuras somáticas, ramificadas y filamentosas están rodeadas por paredes celulares que contienen quitina o celulosa, o ambas sustancias (Alexopoulos y Mims, 1985). Las setas son órganos sexuales en el micelio vegetativo en el cual primero se forman hifas; dentro de estos cuerpos pequeños ocurre la diferenciación celular y se establecen los primeros cuerpos fructíferos, deteniéndose la diferenciación celular e incrementando la producción de biomasa (Kues, 2000).

El *A. bisporus* (champiñón) pertenece a la clase de los *Basidomicetos*, orden *Agaricales*, de la familia *Agaricaceae* y género *Agaricus*; su nombre bisporus indica que se trata de una especie con dos esporas, a diferencia de la mayoría de los *Basidomicetos* que poseen cuatro o más sobre cada basidio. Los basidios son

células en forma de masa, los cuales producen esporas sexuales y a su vez un grupo de basidios forman un himenio (Guzmán, 1985, Fiore y Albarracín, 1997 y Vedder, 1996).

El ciclo de vida del champiñón es una sucesión de etapas que va desde la germinación de las esporas hasta la formación de cuerpos fructificantes. En condiciones adecuadas de humedad, temperatura y pH del sustrato, las esporas germinan desarrollando un tubo germinal que crece y origina una hifa. Esta se ramifica desarrollando en su conjunto el micelio primario, el cual continúa ramificándose hasta formar micelio secundario. Funcionalmente, el micelio es similar al sistema radicular de los vegetales ya que allí se efectúa la absorción de los nutrimentos y mediante enzimas extracelulares lignolíticas (lacasas) que degradan lignina, facilita la utilización de la holocelulosa (celulosa y hemicelulosa) de la paja fermentada (composta); además, tiene la función de anclar los esporóforos al sustrato, esta primera etapa de crecimiento micelial es conocida como fase vegetativa (Rimko *et al.*, 2003, Papinutti *et.al.*, 2003, Hellmut, 1987, Vedder, 1996).

El cambio de las condiciones ambientales (temperatura, humedad y pH del sustrato) induce a este organismo a pasar de un desarrollo vegetativo a uno generativo (fase generativa). Se forman primordios que crecen y originan la estructura visible, conocida como hongo, champiñón, cuerpo fructificante o esporóforo. El desarrollo de un esporóforo comienza con la aglomeración de filamentos del micelio que van a formar una pequeña esfera conocida como primordio o cabeza de alfiler. Después de unos días, el primordio alcanza el tamaño de un chícharo y posteriormente se distingue un estípe y un píleo. Cuando madura el esporóforo se producen esporas sexuales en la parte inferior del píleo comúnmente conocido como sombrero (Leal, 1985, Vedder, 1996). El crecimiento del champiñón se da en ciclos llamados oleadas o floradas. Dependiendo de la cepa, estos brotes normalmente tienen un intervalo de producción de 7 a 10 d. El 70 % de la producción total se recoge en las tres primeras floradas (Vedder, 1996).

### Cultivo comercial del champiñón

El champiñón es un degradador secundario cuya alimentación depende de sustancias orgánicas disponibles, ya que no puede formar por si mismo los hidratos de carbono que forman parte de su estructura, son incapaces de fotosintetizar y por consiguiente necesitan sustratos ricos para sus requerimientos de energía y biomasa, lo cual logran produciendo enzimas fibrolíticas (Wainwright, 1995). Para la constitución del micelio requiere altas cantidades de lignina, mientras que en la formación del cuerpo reproductor necesitan grandes cantidades de celulosa y pentosas (Hellmut, 1987).

**Composta:** El proceso de cultivo de este hongo se inicia con la preparación del sustrato o composta donde se desarrolla el micelio y donde toma los nutrientes necesarios para su propagación y producción de cuerpos fructíferos. El compostaje es un proceso de fermentación microbiana en estado sólido, mediante el cual diversos subproductos vegetales lignocelulósicos considerados como materiales base, junto con otros aditivos nitrogenados o materiales de enriquecimiento, son transformados en un medio de cultivo selectivo para el champiñón (Hellmut, 1987). La composta es un complejo lignocelulósico de tipo húmico rico en nitrógeno, como medio selectivo, el cual no debe favorecer el desarrollo de otros organismos (Van Griensven, 1988). Es una oxidación biológica exotérmica de la materia orgánica llevada a cabo por una sucesión dinámica y rápida de poblaciones microbianas aerobias, donde la materia orgánica heterogénea inicial es transformada a través de fases biooxidativas y de maduración, en un producto final estabilizado a través de mineralización y humidificación (Kenji *et al.*, 1994; García *et al.*, 1997). Las fases de este proceso se describen a continuación.

Fase I: Las materias primas son mezcladas, humedecidas y apiladas (Royse, 2007). Cuando la temperatura es mayor a 60 °C, los organismos termófilos comienzan a desaparecer y el calor derivado de las reacciones químicas causa la caramelización y otras reacciones de pardeamiento esenciales para la formación de un sustrato específico para el cultivo del champiñón (Gea y Tello 1997).

Fase II: El sustrato de la fase I se introduce en las cámaras de pasteurización, lo cual tiene fundamentalmente dos propósitos: pasteurización, también denominada

“fermentación dirigida y controlada” y acondicionamiento final de la composta, para convertirlo en específico para el champiñón, por la ausencia de amoníaco y porque contiene carbohidratos fácilmente disponibles (Gea y Tello 1997; Sanchez *et al.*, 2004; Royse, 2007).

Aunque la materia en descomposición presenta poblaciones microbiológicas autóctonas que pueden realizar el proceso del composteo, es una práctica común adicionar inóculos como abono de caballo o pollinaza como fuente de nitrógeno, para acelerar el proceso (Keniji *et al.*, 1994; Vázquez *et al.*, 1997). Así se obtienen los compuestos requeridos por el champiñón, que son alrededor de 92 % de agua, fuentes de carbono, vitaminas y minerales. Si el compostaje fue adecuado se obtendrá una composta con las siguientes características (Royse *et al.*, 1982; Gea, 1997):

- pH 7.3
- 66 % humedad
- 2.05 % nitrógeno total
- 73 % materia orgánica
- 27 % cenizas
- Libre de amoníaco residual y de parásitos competidores.

**Semilla de champiñón (inoculación):** La semilla es un material biológico utilizado para sembrar el sustrato destinado a la producción del champiñón. La semilla está constituida por hifas fúngicas crecidas sobre granos de trigo, sorgo o centeno que funcionan como medio nutritivo, permitiendo al mismo tiempo una difusión fraccionada del hongo en la masa del sustrato final (composta) con lo que se consigue un gran número de puntos de siembra. La preparación de la semilla está separada de las actividades culturales, la cual se realiza en laboratorios especializados (Ferri, 1985). Una vez que la composta está lista se mezcla con la semilla a razón de 1 % en peso fresco del sustrato, lo cual se realiza mecánicamente para obtener uniformidad en toda la composta (Fletcher *et al.* 1991).

**Etapas del ciclo del cultivo:** Durante el cultivo es necesario controlar varios factores ambientales como temperatura, CO<sub>2</sub>, y humedad relativa (Hermans, 1988)

En la primera etapa de cultivo (la incubación) se extienden los granos de inóculo por toda la composta con una temperatura ambiental de 22 a 25 °C en el interior de la composta, con 95 % de humedad y 0.1 a 30 % de CO<sub>2</sub> (Hermans, 1988; Vedder, 1996). Al estar la composta invadida del micelio es necesario recubrir con tierra (2-5 cm de espesor) para que se desarrollen los cuerpos fructíferos (Fiore y Albarracín, 1997; Gea, 1997). Esa tierra de cobertura sirve como soporte físico para los carpóforos, protege la superficie de la composta de la desecación, absorbe gran cantidad de agua, actuando como reservorio, contiene y favorece los factores que inducen a la fructificación, proporciona un ambiente aireado al micelio, permitiendo el intercambio gaseoso y favorece un pH ligeramente alcalino (Wuest y Beyer, 1996; Van Griensven, 1988). Después de 7 a 9 d de aplicar la tierra, aparece el micelio en la superficie de la misma, induciendo la fructificación, variando las condiciones climáticas: baja la temperatura a 16 °C, incrementa la ventilación, reduce el CO<sub>2</sub>, a 0.08 % y disminuye la humedad a 85-90 % (Gea y Tello, 1997). A los 35 o 40 d de cultivo ocurre la primera floración y cada 10 d las floraciones posteriores (2<sup>a</sup> a los 50 d y 3<sup>a</sup> a los 60 d) (Royse, 2007).

**Actividad enzimática del champiñón:** Los hongos cultivados en presencia de materiales lignocelulolíticos estimulan la secreción de enzimas para degradar estos materiales (Kapich *et al.*, 2004, Vladimir *et al.*, 2006). Por esta razón el micelio de *A. bisporus* produce grandes cantidades de enzimas extracelulares, predominantemente hidrolasas, que degradan compuestos lignocelulosicos en sustancias solubles (Wood y Fermor, 1981; Baldrian y Gabriel, 2003). La acción enzimática catalizada por las celulasas (endocelulasas) hidroliza la celulosa proporcionando azúcares como glucosa y celobiosa que son asimilables por el micelio (Wood y Fermor, 1981). Las xilanasas utilizan como sustrato el xilan (De Groot *et al.*, 1988) y aumentan durante el estadio del primordio o botón y durante la etapa de fructificación. Las lacasas degradan lignina (Díaz *et al.*, 1995) y se

incrementa su producción cuando se necesita en la etapa inductiva de fructificación.

### Pared celular

La pared celular de las plantas consiste principalmente de celulosa (40-45%), hemicelulosa (30-35 %) y lignina (20-23 %) (Ladish *et al.*, 1983). Los forrajes contienen gran proporción de materia orgánica (35-80 %) en forma de pared celular, lo cual proporciona integridad estructural de la planta. Los carbohidratos estructurales, principalmente hemicelulosa, celulosa y pectina, son degradados por los microorganismos en el rumen, lo cual permite a los rumiantes usar fuentes de energía que no pueden ser utilizados eficientemente por los no rumiantes.

Los hidratos de carbono desempeñan cuatro funciones importantes en los organismos vivos (Lenhinger, 1985):

- Fuente de energía, mediante su combustión
- Aporte de átomos de carbono para la síntesis de otros componentes celulares
- Elementos estructurales de la célula y los tejidos
- Almacén de energía.

En las plantas la celulosa y hemicelulosa son los principales polisacáridos estructurales, representan aproximadamente 70% de la biomasa vegetal (Ladish *et al.*, 1983) y sirven como fuente principal de energía para los herbívoros (Béguin y Aubert, 1994). La membrana celular de los vegetales se inicia como una membrana pectínica que es gradualmente sustituida por depósitos de celulosa, hemicelulosa y lignina. El contenido de pectina desciende notablemente cuando la planta envejece y simultáneamente aumenta la lignina y la celulosa. La celulosa y hemicelulosa pueden ser convertidas en azúcares solubles por enzimas de origen microbiano como celulasas y hemicelulasas (Mendels, 1985; Viikari *et al.*, 1993). Por tanto, la fermentación de estos carbohidratos requiere previamente su hidrólisis en el rumen (Chesson y Forsberg, 1997), este proceso es realizado principalmente por enzimas bacterianas, hongos y parásitos.

Celulosa: El principal carbohidrato sintetizado por las plantas y es un polímero de glucosa lineal unido por enlaces  $\beta$  1,4 glucosídicos (Van Soest, 1994;

Béguin y Aubert, 1994), con una estructura simple primaria y otra compleja terciaria; se presenta en forma cristalina y amorfa, y es el polisacárido más resistente de la pared celular. La forma cristalina presenta mayor resistencia a la hidrólisis debido al mayor número de interacciones químicas, que evita la acción enzimática (McDonald *et al.*, 1993) A su vez, la celulasa es una enzima que degrada la celulosa y consta de dos unidades importantes como mínimo: C1 que rompe los enlaces, liberando cadenas de glucosa susceptibles a una posterior hidrólisis, y CX que hidroliza estas cadenas hasta celobiosa y glucosa; además, las celulasas parecen diferir en su capacidad para absorber el factor hidrolítico (Beauchemin y Rode, 1996).

Hemicelulosa: Polisacárido de la pared celular, soluble en álcali y estrechamente asociado a celulosa; está formada por unidades de D-glucosa, D-galactosa, D-manosa, D-xilosa y L-arabinosa unidas por diferentes combinaciones y por varios enlaces glucosídicos. En ocasiones se denominan xilanos, glucomananos, galactanos o arabinanos (Bhat y Hazlewood, 2001). Posee dos tipos de polisacáridos: 1) de cadena corta o celulosanas que forman parte de la estructura de la celulosa y están orientados en la estructura micelar; 2) polisacáridos amorfos incrustados asociados íntimamente a lignina de la membrana celular.

Pectinas: Un grupo de polisacáridos estrechamente asociados, solubles en agua caliente y que componen las paredes primarias de las células y las regiones intercelulares de las plantas superiores (McDonald *et al.*, 2002). Los carbohidratos de este grupo incluyen los poligalacturonanos, arabinanos, galactanos y arabinogalactanos (Chesson, 1994). Están presentes en la pared celular de todas las plantas y se localizan en el centro constituyendo el cemento de la pared celular de las plantas (Van Soest, 1994). Son importantes en las plantas dicotiledóneas como la alfalfa, constituyendo una mayor proporción de la pared celular y aportando una mayor degradación de ellas, a diferencia de las gramíneas (Hatfield, 1989).

Compuestos fenólicos (lignina): La lignina no es un carbohidrato pero está estrechamente asociada a los compuestos de este grupo, confiere resistencia

química y biológica a la pared celular y fortaleza mecánica a la planta. La lignina engloba una serie de compuestos estrechamente relacionados y es un polímero originado de tres derivados del fenilpropano: alcohol coumaril, alcohol coniferil y alcohol sinapil; hay muchas unidades fenilpropanoides asociadas en una estructura compleja entrelazada (Lapierre, 1993). Existe una gran heterogeneidad entre las ligninas de diferentes especies, órganos, tejidos y posiblemente tipo de células (Lam *et al.*, 1990). Los compuestos fenólicos de la pared celular son considerados como el principal factor limitante de la disponibilidad de la pared celular y contenido celular para los animales (Jung y Ralph, 1990, Van Soest, 1994). Así, la lignina ejerce una acción negativa en la digestibilidad de los principales compuestos presentes en las células vegetales protegiéndolos de la hidrólisis enzimática de los procesos digestivos (Jung y Allen, 1995).

#### Componentes de la fibra

La fibra es una entidad química heterogénea, constituida por celulosa, hemicelulosa, lignina, minerales y otros compuestos (Van Soest, 1994). Nutricionalmente se define como la fracción menos degradable del alimento, que ocupa espacio en el tubo digestivo, resiste la digestión de las enzimas de los mamíferos y sólo puede ser desdoblada por enzimas sintetizadas por los microorganismos ruminales (Mertens, 1997). De acuerdo con el método utilizado para su cuantificación, las fracciones de carbohidratos que conforman la pared celular, reciben diferentes nombres:

Fibra total: Constituida por el residuo insoluble de una muestra de alimento que permanece después de una ebullición en solución ácida, seguida por una alcalina; contiene celulosa, hemicelulosa, lignina y compuestos nitrogenados (Van Soest, 1994)

Fibra detergente neutro (FDN): Es el residuo después de que una muestra de alimento fue sometido a calor con un detergente neutro; está constituida por celulosa, hemicelulosa, lignina, cantidades variables de almidón, minerales y compuestos nitrogenados (Nussio *et al.*, 2000). La desventaja de esta fibra es que algunas pectinas son solubilizadas, por lo cual esta fracción no representa toda la pared celular (Van Soest y Robinson, 1985; Aman, 1993). La FDN se relaciona

principalmente con el consumo, pero dado que la FDN sólo cuantifica las características químicas, y no toma en cuenta atributos físicos de la fibra, como el tamaño de partícula y la densidad, surgieron los conceptos de FDN físicamente efectiva y FDN efectiva (Mertens, 1996, 2000, 2001).

Fibra detergente ácido (FDA): Está constituida por material indigerible en una solución ácido e incluye celulosa y lignina como componentes primarios (Van Soest, 1963), y se relaciona con la digestibilidad del alimento. En esta fracción se agregan la pectina, minerales, compuestos nitrogenados insolubles en detergente ácido y cutina.

### Enzimas

Este término deriva del griego en (en) y zyme (levadura), son catalizadores biológicos producidos de manera natural por seres vivos, se encargan de acelerar las reacciones metabólicas en condiciones compatibles para la vida (Bello, 1998). Químicamente las enzimas son proteínas globulares que poseen un sitio activo que les permite unir las moléculas que intervienen en la reacción con un sustrato determinado, de manera semejante a una llave con su cerradura (Taylor y Headon, 1992). Esta fusión permite la ruptura o formación de enlaces para obtener productos (Frumholtz y Beauchemin, 1999). Para poder actuar algunas enzimas necesitan un cofactor, los cuales pueden ser inorgánicos ( $Fe^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$ ), u orgánicas llamadas coenzimas (vitaminas); por tanto, una enzima completa se llama holoenzima y está formada por una parte proteínica (apoenzima) y un cofactor no proteínico (coenzima) (Bohinsky, 1991). De acuerdo a su función se clasifican en (Conn y Stump, 2000):

- Oxidoreductasas
- Transferasas
- Isomerasas
- Hidrolasas
- Liasas
- Ligasas

Enzimas endógenas: En el rumen hay enzimas que degradan polímeros de las paredes celulares de las plantas (celulasas, xilanasas,  $\beta$  glucanasas, pectinasas, etc.), las amilasas, proteasas, fitasas y otras encargadas de degradar toxinas. La variedad de enzimas presentes en el rumen se debe a la diversidad de la masa microbiana (Doerner y White, 1990, Yanke *et al.*, 1995). Las enzimas actúan individual y sinérgicamente para hidrolizar la celulosa (Wood, 1992 y Aubert, 1994). Además, las enzimas se unen a un complejo enzimático (celulosomas) (Bayer *et al.*, 1998).

Enzimas exógenas: Las enzimas son producidas por todos los organismos vivos y actúan como catalizadores de las funciones mediante la aceleración de las reacciones químicas. Las enzimas exógenas se han utilizado en la industria alimentaria para consumo humano como la producción de pan, queso, vino, cerveza y papel (Lehinger, 1994). En especies pecuarias el uso de enzimas se inició desde 1960 en dietas para no rumiantes (Beauchemin *et al.*, 1997), y las enzimas utilizadas se han clasificado por el sustrato con el cual tienen mayor afinidad (Frumholtz, 2001):

- Proteasas: Debilitan potencialmente la matriz proteínica del almidón, mejorando la digestión
- Fibrolíticas: Mejoran la utilización de los alimentos fibrosos
- Amilasas: Incrementan el aprovechamiento de alimentos con alto contenido de almidón.

Las enzimas exógenas son elaboradas usando microorganismos mediante procesos biotecnológicos de fermentación controlada (Kung, 1999) Algunas de estas enzimas se utilizan para remover factores antinutricionales de los alimentos, incrementando la digestibilidad y coadyuvando en la actividad enzimática endógena (Smiricky *et al.*, 2001)

Enzimas exógenas fibrolíticas: Son aquellas que no pueden ser sintetizadas por los animales y, por tanto, se deben incluir en el alimento para especies pecuarias. Estas enzimas se obtienen mediante fermentación controlada de bacterias y hongos (Frumholtz y Beauchemin, 2001) y son protegidas por un proceso de glucosilación, para evitar la degradación por los microorganismos ruminales

(Morgavi *et al.*, 2001). Ejemplos de estas enzimas comerciales son: 1) *Fibrozyme*® es un producto granulado y con altas concentraciones de enzimas xilanasas (Moreno, 2004), celulasas  $\beta$ -glucanasas, amilasas y proteasas (Frumholtz y Beauchemi, 1999); 2) Pro-Mote® producto líquido con alta cantidad de celulasas (Moreno, 2004). Las enzimas fibrolíticas actúan cuando su principio activo se adhiere al sustrato para formar un complejo enzima-sustrato, y luego la enzima rompe los enlaces que unen los carbohidratos liberando unidades de carbohidratos solubles (Huber 1985). Otra manera de intervenir en la degradación de la fibra es aumentando la eficiencia de los microorganismos ruminales. En este sentido la actividad de las enzimas fibrolíticas puede ser limitada por los siguientes factores:

1) Extrínsecos (Zinn *et al.*, 1999):

- Temperatura ruminal
- Variación del pH
- Contenido de grasa en la dieta
- Presencia de ionóforos o antibióticos.

2) Intrínsecos (Pritchard *et al.*, 1996, Beauchemin *et al.*, 1997, Feng *et al.*, 1996, Yang *et al.*, 1999):

- Tipo y forma de presentación de las enzimas
- Dosis utilizada
- Características de la dieta
- Composición y forma de adicionar la enzima a la dieta.

3) Relacionados con el animal (Yang *et al.*, 1999, Frumholtz y Beauchemin, 1997):

- Especie
- Estado fisiológico.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### ***Ubicación***

Esta investigación se efectuó en el Laboratorio de Enzimología y Biología Molecular de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, México D. F. y en el laboratorio de Nutrición Animal del Colegio de Postgraduados, Montecillo, Edo. de México.

### ***Material de experimentación***

Se utilizaron bloques de composta usada por *A. bisporus* (~ 25 kg de peso fresco) de una granja comercial (El Riojal SA de CV, Las Vigas, Veracruz, México). Los bloques estaban formados por paja de cebada, gallinaza, urea, carbonato de calcio y grano de sorgo colonizado por micelio de *A. bisporus* en cultivo sólido (CS), cubierto por una capa de tierra de 5 kg. Se utilizaron bloques de 50, 60 y 90 d de cultivo para la fase I en el experimento 1, de 60 d para el experimento 2 y 60 d para la fase II en todos los experimentos.

### **Extracción y purificación enzimática**

Para obtener el extracto enzimático se quitó la capa de cobertura del bloque residual de la cosecha de *A. bisporus*, se homogenizó el material fermentado y se obtuvieron tres muestras de 400 g, y cada una de ellas se humedeció con 600 mL de amortiguador de citrato (50 mM con pH 5.3). Para separar las enzimas del sustrato se agitó la mezcla manualmente durante 30 min y se prensó para separar la fase sólida de la fase líquida. La fase líquida fue centrifugada dos veces (4 °C, 10,000 g, 25 min) (Márquez *et al.*, 2007) y decantada, para obtener el extracto enzimático.

### **Métodos de conservación**

Los extractos enzimáticos obtenidos de los bloques de desecho de 60 d de cultivo, se subdividieron (6 repeticiones) en frascos de vidrio ámbar (20 mL) y fueron asignados completamente al azar al tiempo (1, 7, 14, 28, 56, 101 y 180) y método de conservación correspondiente:

- Refrigeración (R; 8 °C).

- Refrigeración con ácido benzoico en solución 10 mM con amortiguador de acetato 10 % (RAB).
- Congelación (C; -20 °C)
- Congelación más ácido benzoico al 10 % (CAB)
- Congelación más glicerol al 10 % (CG)
- Congelación con glicerol al 5 % y ácido benzoico al 5 % (CABG)
- Liofilización (L).

### ***Análisis de laboratorio***

#### **Determinación de proteína soluble**

La cantidad de *proteína soluble* fue determinada mediante el método de colorimetría de proteína ligada (Bradford, 1976). Se utilizó seroalbúmina bovina (Sigma) como estándar en solución de 0.15 M de amortiguador de citrato (50 mM, pH 5.3). En 800  $\mu$ L de extracto enzimático en solución amortiguadora de citrato (50 mM, pH 5.3) se añadieron 200  $\mu$ L de reactivo de Bradford (Bio-RAD) y se agitó vigorosamente con un aparato vórtex. La reacción duró 5 min y se leyó la absorbancia a  $\lambda$  595 nm en una celdilla de acrílico mediante un espectrofotómetro (DU 640 Beckman).

#### **Actividad enzimática**

La actividad de *xilanasa* se obtuvo por la técnica de azúcares reductores usando el método del ácido dinitrosalisílico (DNS) (Miller, 1959) con las modificaciones de Loera y Córdova (2003) Purkarthofer *et al.* (1993) y Márquez *et al.* (2007). Para la curva estándar se utilizó solución de xilosa 10 mM con amortiguador de citrato (50 mM y 5.3 de pH). Cada muestra (100  $\mu$ L) de extracto líquido fue incubado con 900  $\mu$ L de sustrato una solución de xilan de avena (Sigma X-0627) al 5 %, a 50 ° C por 5 min, se agregaron 1.5 mL de solución DNS, se hirvió por 5 min, y se colocó en hielo. La absorbancia se leyó a  $\lambda$  540 nm. Para cada muestra se incubó un testigo con 900  $\mu$ L de sustrato, por 5 min a 50 ° C, se agregó 1.5 mL de solución DNS y 100  $\mu$ L de extracto enzimático, se hirvió 5 min, se colocó en hielo y se leyó a  $\lambda$  540 nm. Se incubó un testigo general con 1000  $\mu$ L de amortiguador de citrato (50 mM y

5.3 de pH), por 5 min a 50 ° C, se agregó 1.5 mL de solución DNS, se hirvió 5 min, se colocó en hielo y se leyó a  $\lambda$  540 nm. Se considero una unidad internacional (UI) para xilanasas como la cantidad de enzima que libera 1 $\mu$  mol de azúcar reductor (expresado como equivalentes de xilosa) por min.

La actividad *celulasa* se midió por azúcares reductores usando el método del ácido dinitrosalisílico (Miller, 1959) con las modificaciones de Loera y Córdova (2003) y Márquez et al. (2007). Para la curva estándar se utilizó solución de glucosa 10 mM con amortiguador de citrato 50 mM y 5.3 de pH. Cada muestra (100  $\mu$ L) de extracto líquido fue incubado con 900  $\mu$ L de sustrato (solución de carboximetilcelulosa Sigma-Aldrich C4888 al 5%), a 50 °C por 60 min, se agregaron 1.5 mL de solución DNS, se hirvió 5 min, se colocó en hielo y se leyó a  $\lambda$  540 nm. Para cada muestra se incubó un testigo con 900  $\mu$ L de sustrato (solución de carboximetilcelulosa Sigma-Aldrich C4888 al 5%), por 60 min a 50 °C, se agregó 1.5 mL de solución DNS y 100  $\mu$ L de extracto enzimático, se hirvió por 5 min, se colocó en hielo y se leyó a  $\lambda$  540 nm. Se incubó un testigo general con 1000  $\mu$ L de amortiguador de citrato 50 mM y 5.3 de pH, por 60 min a 50 °C, se agregó 1.5 mL de solución DNS, se hirvió por 5 min, se colocó en hielo y se leyó a  $\lambda$  540 nm. Una unidad internacional (UI) para celulasa es la cantidad de enzima que libera 1 $\mu$  mol de azúcar reductor (expresado como equivalentes de glucosa) por min.

La actividad *lacasa* fue determinada en un sistema de reacción de 1000  $\mu$ L con 800  $\mu$ L de amortiguador de citrato 50 mM y pH 5.3, 100  $\mu$ L de extracto enzimático, y 100  $\mu$ L de sustrato ABTS, preparado con 0.69 g de ABTS (2, 2' Azino-bis 3-etilbenzeno-thiazolina-6-ácido sulfónico) disuelto en 250 mL de amortiguador de citrato (50 mM y pH 5.3). El coeficiente de extinción molar para el ABTS fue 36,000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. El sistema de reacción sin el sustrato se pre incubó 1 min a 40 °C; luego se adicionó el sustrato y se midieron los incrementos de la absorbancia a una  $\lambda$  de 420 nm por 5 min, cada 15 s. Una unidad de actividad (UI) se definió como la cantidad de enzima que produce 1  $\mu$ mol de sustrato oxidado por min (Bourbonnais *et al.*, 1997, modificada por Márquez *et al.*, 2007).

## **Experimentación fase I**

### **Efecto enzimático a diferente edad de cultivo de *A. bisporus***

Se obtuvieron extractos enzimáticos de residuos de cosecha de *A. bisporus* (champiñón) de 50, 60 y 90 d de cultivo. Se utilizaron 9 bloques de desecho: 3 bloques de cada edad de cultivo (50, 60 y 90 d), cada uno con 6 repeticiones. Las variables medidas fueron: actividad enzimática de xilanasas, celulasas (Loera y Córdova, 2003), y lacasas (Bourbonaise *et al.*, 1997), así como la cantidad de proteína soluble (Bradford 1976).

El diseño experimental fue completamente al azar y el modelo estadístico fue el siguiente:

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

Donde:

$y_{ij}$  = Variable dependiente (xilanasas, lacasas, celulasas y proteína)

$\mu$  = Media general

$\tau_i$  = Efecto del  $i$ -ésimo tratamiento ( $i = 50, 60, 90$  d de cultivo)

$\varepsilon_{ij}$  = Efecto del  $i$ -ésimo ( $i = 50, 60, 90$  d de cultivo) tratamiento de la  $j$ -ésima repetición (extractos enzimáticos  $j = 1, 2, 3, \dots, 6$ )

### **Análisis estadístico**

Los resultados se analizaron con PROC GLM SAS 9.0 (2000), por polinomios ortogonales (lineal, cuadrático y cúbico). La comparación de medias se hizo mediante el procedimiento de Tukey (Steel y Torrie, 1988). Se aceptaron diferencias significativas con  $P < 0.01$  (Montgomery, 1997).

### **Efecto de tiempo y métodos de conservación sobre la actividad enzimática de extractos enzimáticos de *A. bisporus***

Se obtuvieron extractos enzimáticos de residuos de cosechas de *A. bisporus* de 60 d de edad de siembra y se conservaron en frascos ámbar en: refrigeración (R),

refrigeración con 10% de ácido benzoico (RAB), congelación (C), congelación con 10% de ácido benzoico (CAB), congelación con 10% de glicerol (CG), congelación con 5% de glicerol y 5% de ácido benzoico (CABG) y liofilización (L); se realizaron mediciones a través del tiempo (1, 7, 14, 28, 56, 101 y 180 d de conservación).

Las variables medidas fueron: actividad enzimática de xilanasas, celulasas (Loera y Córdova, 2003), y lacasas (Bourbonaise *et al.*, 1997, modificada por Márquez *et al.*, 2007), así como la cantidad de proteína soluble (Bradford, 1976).

El diseño experimental fue completamente al azar con un arreglo factorial 7x7 y el modelo estadístico fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

Donde:

$Y_{ij}$ = Variable dependiente (xilanasas, celulasas, lacasas y proteína soluble)

$\mu$ = Media general

$\alpha_i$ = Efecto del i-ésimo tipo conservación (i=C, CB, CG, CBG, R, RB y L)

$\beta_j$ = Efecto del j-ésimo día de conservación (j=1, 7, 14, 28, 56, 101 y 180)

$(\alpha\beta)_{ij}$  = Efecto de la interacción en el i-ésimo tipo de conservación y el j-ésimo día de conservación

$\epsilon_{ijk}$ = Efecto del error experimental con la k-ésima repetición (k=1,2,3.....18), del i-ésimo tipo de conservación (i=C, CB, CG, CBG, R, RB y L), y el j-ésimo día de conservación (j= 1,7,14,28,56,101 y 180)

### **Análisis estadístico**

Los resultados se analizaron con PROC GLM SAS 9.0 (2000), por polinomios ortogonales (lineal, cuadrático y cúbico). La comparación de medias se hizo mediante el procedimiento de Tukey (Steel y Torrie, 1988). Se aceptaron diferencias significativas con  $P < 0.01$  (Montgomery, 1997).

### ***Experimentación fase II***

#### **Degradación *in vitro* de enzimas fibrolíticas de *A. bisporus***

La degradación *in vitro* de las enzimas celulasas, xilanasas y lacasas de *A. bisporus* (Tilley y Terry, 1963) se calculó usando como indicador la concentración

de N-NH<sub>3</sub> (McCullough, 1967), se mezcló 1 mL de extracto de *A. bisporus* conservado con R, RB, C, CB, CG, CBG y L, con la cantidad de proteína soluble homologada para todos los extractos enzimáticos (2.40 ± 0.01 mg g<sup>-1</sup> MS), 15 mL de saliva McDougall (1948) y 5 mL de líquido ruminal, incubados 72 h a 39 °C, tomando muestras a las 0, 3, 6, 9, 12, 24, 48 y 72 h.

El diseño experimental fue completamente al azar con un arreglo factorial 7 tipos de extracto x 8 tiempos de incubación, y el modelo estadístico fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

Donde:

$Y_{ij}$ = Variable dependiente (NH<sub>3</sub>)

$\mu$ = Media general

$\alpha_i$ = Efecto del i-ésimo tipo extracto

$\beta_j$ = Efecto del j-ésimo tiempo de incubación

$(\alpha\beta)_{ij}$  = Efecto de la interacción en el i-ésimo tipo de extracto y el j-ésimo tiempo de incubación

$\epsilon_{ijk}$ = Efecto del error experimental con la k-ésima repetición (k=1,2,3.....6), del i-ésimo tipo de extracto y el j-ésimo tiempo de incubación

### **Análisis estadístico**

Los resultados se analizaron con PROC GLM SAS 9.0 (2000), por polinomios ortogonales y regresión (lineal, cuadrática y cúbica). La comparación de medias se hizo mediante el procedimiento de Tukey (Steel y Torrie, 1988). Se aceptaron diferencias significativas con P<0.01 (Montgomery, 1997).

### **Degradación in vitro de la materia seca, fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácido (FDA) de alfalfa**

El producto enzimático de *A. bisporus* y el producto comercial (*Fibrozyme*®; Alltech, Nicholasville, KY, USA) fueron homologados a una actividad de xilanasas (160.02 ± 0.27), se añadieron 500 mg de alfalfa, 33.33 mL de saliva de McDougall (1948) y 16.67 mL de líquido ruminal, y se incubaron a 39 °C (Tilley y Terry, 1967)

para obtener la DIVMS y la degradación de FDN (DIVFDN) y FDA (DIVFDA), a las 1, 12, 24, 48 y 72 h.

El diseño experimental fue completamente al azar con un arreglo factorial 2 tipo de extractos x 5 tiempos de incubación, y el modelo estadístico fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

Donde:

$Y_{ij}$ = Variable dependiente (FDN, FDA, MS)

$\mu$ = Media general

$\alpha_i$ = Efecto del i-ésimo tipo extracto

$\beta_j$ = Efecto del j-ésimo tiempo de incubación

$(\alpha\beta)_{ij}$ = Efecto de la interacción en el i-ésimo tipo de extracto y el j-ésimo tiempo de incubación

$\epsilon_{ijk}$ = Efecto del error experimental con la k-ésima repetición (k=1,2,3.....6), del i-ésimo tipo de extracto y el j-ésimo tiempo de incubación

#### Degradación in vitro de la materia seca de cuatro forrajes

Los productos enzimáticos de *A. bisporus* y uno comercial (*Fibrozyme*®; Alltech, Nicholasville, KY, USA) fueron homologados por la cantidad de actividad de xilanasas ( $160.02 \pm 0.27$  UI). Se determinó la degradación *in vitro* (1, 12, 24, 48 y 72 h) de la MS (DIVMS; Tilley y Terry, 1963) de: composta usada por *A. bisporus*, paja de cebada, pasto ovillo, Taiwán. Se mezclaron los extractos enzimáticos con 500 mg de forraje, 33.33 mL de saliva McDougall (1948) y 16.67 mL de líquido ruminal, incubándolos 72 h a 39 °C.

El diseño experimental fue completamente al azar con un arreglo factorial 4 forrajes x 3 productos enzimáticos x 5 tiempos de incubación para la DIVMS de los forrajes; 3 productos enzimáticos x 5 tiempos de incubación para la DIVMS, DIVFDN y DIVFDA de alfalfa. Se usó el procedimiento GLM (SAS, 2002), más análisis de regresión y polinomios ortogonales ( $p \leq 0.01$ ) (Montgomery, 1997). El modelo estadístico fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + (\alpha\beta)_{ij} + (\alpha\gamma)_{ik} + (\beta\gamma)_{jk} + (\alpha\beta\gamma)_{ijk} + \epsilon_{ijkl}$$

Donde:

$Y_{ij}$ = Variable dependiente (MS)

$\mu$ = Media general

$\alpha_i$ = Efecto del i-ésimo tipo extracto i= sin extracto, *Fibrozyme*®, *A.bisporus*

$\beta_j$ = Efecto del j-ésimo tiempo de incubación j=1, 12, 24, 48, 72 h

$\gamma_k$ = Efecto del j-ésimo tiempo de forraje k= pasto ovillo, Taiwan, paja de cebada y composta usada por *A. bisporus*

$(\alpha\beta\gamma)_{ijk}$ =Efecto de la interacción en el i-ésimo tipo de extracto, el j-ésimo tiempo de incubación y el k-ésimo tipo de forraje

$\epsilon_{ijkl}$ = Efecto del error experimental con la k-ésima repetición (k=1,2,3.....6), del i-ésimo tipo de extracto, el j-ésimo tiempo de incubación y el k-ésimo tipo de forraje

### **Análisis estadístico**

Los resultados se analizaron con PROC GLM SAS 9.0 (2000), por polinomios ortogonales y regresión (lineal, cuadrática y cúbica). La comparación de medias se hizo mediante el procedimiento de Tukey (Steel y Torrie, 1988). Se aceptaron diferencias significativas con  $P < 0.01$  (Montgomery, 1997).

La cinética ruminal de MS, FDN y FDA de los forrajes se calculó con el modelo de Gompertz:

$$DIS(t) = a + b * \exp [(-C) \exp (-Dt)]$$

Donde:

**DIS** es la degradación de material ( $g\ kg^{-1}$ ) en el tiempo (t); **a** es la fracción soluble ( $g\ kg^{-1}$ ) en el tiempo (t); **b** es la fracción insoluble pero potencialmente degradable ( $g\ kg^{-1}$ ); **c** es la tasa de desaparición de **ab**; **D** es un parámetro para medir la tasa de desaparición.

En este modelo de Gompertz (Susmel *et al.*, 1999) la tasa fraccional de degradación varía en función del tiempo, y el valor medio (es decir, una constante comparable a la tasa exponencial de la desaparición) se obtiene como:  $c = D/C$ . La MS, FDN y FDA que permanecen en cada tiempo de incubación se usaron para adaptarse a un modelo de regresión no lineal mediante la opción NLIN (SAS, 2002).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Fase I

#### Efecto enzimático a diferente edad de cultivo de *A. bisporus*

La concentración de *proteína soluble* en los extractos enzimáticos de *A. bisporus* disminuyó ( $P < 0.01$ ) linealmente al aumentar los d de cultivo (Figura 1). La actividad enzimática fue diferente ( $P < 0.01$ ) por días de cultivo, presentando un efecto cuadrático para celulasa y lineal positivo para lacasa (Figura 1 y Figura 2), incrementando esta última con los días de cultivo. La mayor concentración de actividad enzimática se presentó a los 60 d para celulasa y 90 d para lacasa (Cuadro 1). A pesar de que la actividad xilanasas disminuyó numéricamente (Cuadro 1) al aumentar los días de cultivo, no fue significativamente diferente ( $P > 0.01$ ) (Figura 2) al transcurrir los días de cultivo.

Las enzimas fibrolíticas degradan activamente los principales componentes de la pared celular de los forrajes, tales como celulosa, hemicelulosa, xilosa y compuestos polifenólicos. Por tal motivo son necesarios para los hongos, los cuales no pueden degradar por si mismo los sustratos fibrosos en los que se cultivan y las utilizan como medio de alimentación. Todas las enzimas degradadoras de fibra cuantificadas en esta investigación fueron superiores a las reportados para otros hongos como *Aspergillus sp* (Membrillo *et al.*, 2008). Ball y Jackson (1995) quienes recuperaron enzimas degradadoras de fibra como peroxidases, xilanasas, acetilsterasas, arabinofuranosidasas, celulasas, endoglucanase, celobiohidrasas y  $\beta$ -glucosidasa del cuerpo fructífero de *A. bisporus*. Además, Li *et al.* (2001) indirectamente detectaron la presencia de enzimas fibrolíticas en el sustrato de cultivo de *Pleurotus ostreatus* al cuantificar 90 % de celulosa, 65 % de hemicelulosa y 75 % de lignina a los primeros 30 d de cultivo, así como 45 % de celulosa, 20 % de hemicelulosa y 40 % de lignina a los 45 d de cultivo. Este claro descenso de contenido fibroso indica la presencia de enzimas fibrolíticas producidas por el hongo, las cuales utilizaron estos componentes y los transformaron en moléculas fáciles de asimilar para el mismo.

La celulasa y xilanasas dominan el proceso de compostaje en los primeros 60 d y la lacasa en los posteriores a esta fase. Esta distribución de las enzimas se debe a

una sucesión de poblaciones microbianas mixtas en la composta durante el cultivo del hongo; en un inicio dominan las bacterias aerobias termófilas y disminuyen considerablemente al incrementar hongos termófilos y actinomicetos (Ball y Jackson, 1995). Lo anterior indica que al terminar la cosecha de los cuerpos fructíferos del *A. bisporus*, la composta gastada incluirá dos grandes componentes: una fracción de lignocelulosa y alta cantidad de biomasa enzimática (De Groot *et al.*, 1998). Se ha encontrado una amplia gama de enzimas fibrolíticas incluyendo celulasas, hemicelulasas y lacasas, asociadas al cuerpo fructífero de *A. bisporus*, en las etapas de producción y cosecha (Durrant *et al.*, 1991; Bonnen *et al.*, 1994), pero no en composta gastada después de la cosecha, lo cual se pudo caracterizar en la presente investigación, obteniendo altas concentraciones de la actividad enzimática lacasa y principalmente xilanasa. La actividad enzimática de *A. bisporus* se ha relacionado principalmente a las fases de la producción del cuerpo fructífero, sin evaluar su potencial como productores de enzimas fibrolíticas que podrían adicionarse en dietas para rumiantes.

La actividad de celulasas ( $10 \text{ UI MS g}^{-1}$ ) obtenida de los extractos enzimáticos de composta usada por *A. bisporus* con 50 d de cultivo es congruente con lo reportado por Arce *et al.* (2007), quienes encontraron una actividad de  $11.7 \text{ UI MS g}^{-1}$  a los 48 d de cultivo. Wood y Goodenough (1977) señalaron que las celulasas están íntimamente relacionadas con el incremento en la producción de cuerpos fructíferos del champiñón, lo que explicaría la mayor actividad de celulasas ( $20.0 \text{ UI MS g}^{-1}$ ) a los 60 d de cultivo, porque ésta fue la tercera cosecha y cuando se presenta la mayor producción de cuerpos fructíferos. La actividad xilanasa no fue diferente ( $P > 0.01$ ) para los extractos de composta gastada a los 50, 60 y 90 d, porque la producción de estas enzimas no está relacionada con el nivel de producción del cuerpo fructífero, sino con la fase de colonización que se lleva a cabo entre 30 y 60 d de cultivo, lo cual coincide con el agotamiento del sustrato. Si no hay cambio del sustrato en la fase de colonización durante la etapa productiva del champiñón, no se observará diferencia en la actividad xilanasa. La actividad lacasa fue mayor en la composta usada por 90 d de cultivo, porque esta actividad está directamente relacionada con la cantidad de compuestos fenólicos presentes

en el sustrato, los cuales se incrementan al ser una composta agotada (Wood y Goodenough, 1977). Si se considera que en un cultivo a los 60 d, el champiñón ha consumido la mayor parte de los componentes de la pared celular del forraje y deja una alta proporción de compuestos fenólicos que no puede utilizar, los cultivos de 90 d en gran medida estarán conformados por estos elementos, relacionándose así con altas concentraciones de enzimas lacasas.

La actividad enzimática de *A. bisporus* puede ser considerada como potencial si se compara con la de otros hongos conocidos por su producción de enzimas exógenas, como *Trametes sp*, *Pleurotus ostreatus* y *Aspergillus niger*, para los cuales Márquez et al. (2007) reportan (19 d de cultivo) celulasa 9.56, 1.16, 0.95 UI MS g<sup>-1</sup> y xilanasa 137.6, 18.96, 27.20 UI MS g<sup>-1</sup>. Para extractos enzimáticos de *Aspergillus sp*. (40 d), la actividad (UI/mg de proteína) fue 0.7 lacasa, 0.7 xilanasa y 1.0 celulasa (Shah et al., 2005). Con el mismo hongo cultivado con café y residuos de caña y hojas de maíz, la actividad fue 268.7 UI xilanasa/mL (Lagunas et al., 2006). En el presente estudio (60 d cultivo), los valores (UI/mg proteína) para xilanasa fueron 18.84, 0,47 y 0.05 para celulasa y lacasa, lo que significa que *A. bisporus* contiene una importante concentración de xilanasa. Sin embargo, Sungurtas et al. (2004), para el cultivo de cebada, encontraron una actividad de xilanasa de 2400 UI MS g<sup>-1</sup>, un valor más alto que en el presente estudio con *A. bisporus* con cebada y paja.

#### Efecto de tiempo y métodos de conservación sobre la actividad enzimática de extractos enzimáticos de *A. bisporus*

La actividad de las enzimas fibrolíticas fue afectada por el método de conservación y el tiempo de almacenamiento. En el día 1 de almacenamiento, la proteína soluble de los extractos enzimáticos de *A. bisporus* fue mayor con C y R (8.6 UI/MS g<sup>-1</sup>) que los otros métodos: CB 7.6 UI/MS g<sup>-1</sup>; CG 6.5 UI/MS g<sup>-1</sup>; CBG 5.6 UI/MS g<sup>-1</sup> y L 5.6 UI/MS g<sup>-1</sup>. Al aumentar los días de conservación no cambió la cantidad de proteína (P>0.01).

La proteína soluble fue estable por 180 d de conservación para C 78.58 %, en CB 99.08 %, en CG 100 %, en CGB 92.80 %, en L 100 %, en R 77.4 % y en RB 80.57

%. Los extractos con mayor ( $P<0.01$ ) cantidad de proteína soluble fueron los conservados en R, C, y CB (Cuadro 2).

La actividad celulasa, xilanasa y lacasa para el primer día de conservación con los diferentes métodos fue mayor con C y R (7.4; 707.4; 2515.3 UI/MS  $g^{-1}$ ), pero se redujo al adicionar ácido benzoico (4.7; 637.6; 639,6 UI/MS  $g^{-1}$ ), glicerol (5.2; 573.7; 595.7 UI/MS  $g^{-1}$ ), ácido benzoico y glicerol (4.5; 566,5; 551.9 UI/MS  $g^{-1}$ ), así como cuando se liofilizaron (3.3; 264.0; 353.6 UI/MS  $g^{-1}$ ).

La actividad celulasa presentó efectos cuadrático y cúbico del tiempo de conservación (Figura 3) disminuyendo a los 56 d al conservarlos con los métodos C, CB, CG, CGB, R y RB, con una estabilización del día 1 al 56 y del 56 al 180; con L, los extractos fueron estables del día 1 al 180 (Figura 3). La actividad celulasa se conservó a los 180 d en C 42.45 %, en CB 62.03 %, en CG 65.18 %, en CGB 73.66 %, en L 98.79 %, en R 22.78 % y en RB 26.37 %. Los extractos con mayor ( $P<0.05$ ) cantidad de actividad celulasa fueron los conservados en C (Cuadro 2).

La actividad xilanasa disminuyó linealmente ( $P<0.01$ ) el tiempo de conservación para CBG y L, mientras que se incrementó con un efecto cuadrático ( $P<0.01$ ) sobre CB, CG, L, R y RB en los extractos conservados en C y CGB. La actividad xilanasa disminuyó al día 101 en C y CGB; al 14 con CB; al 56 con CG, R y RB y hasta el 180 con L. La actividad xilanasa fue estable del día 7 al 56 con los métodos de R y RB; del 56 al 180 con los métodos CB, CG, R y RB; del 7 al 101 con CB, del 1 al 101 con C, CG, CGB y L, del 101 al 180 con CGB y L (Figura 4). La actividad xilanasa se conservó a los 180 d en C 32.87 %, en CB 15.17 %, en CG 24.89 %, en CGB 13.81 %, en L 38.48 %, en R 4.67 % y en RB 16.15 % a los 180 d de conservación.

Al aumentar el tiempo de conservación la actividad lacasa disminuyó con un efecto cubico ( $P<0.01$ ) (Figura 5). La actividad lacasa de los extractos fue mayor ( $P<0.01$ ) al conservarlos en C y R (Cuadro 2). La actividad lacasa disminuyó a los 7 d con C, CB y R; y a los 180 d con CG, CGB, L y RB. Fue estable del día 7 al 180 con los métodos de C, CB y R; y del 1 al 101 con CG, CGB, L y RB. (Figura 5). La actividad lacasa se perdió casi en su totalidad a los 180 d de conservación.

Al utilizar liofilización como método de conservación de actividad enzimática de celulasa, xilanasa y lacasa (98, 38 y 1.6 %) se conservó hasta los 180 d, a diferencia de los otros métodos. Este comportamiento se debe a que la liofilización, al eliminar el agua rápidamente, evita la contaminación del producto (Valenzuela y Ortiz, 2007; Tano, 2007.), de manera contraria al proceso de refrigeración (Grazyna *et al.*, 2008; Mohapatra *et al.*, 2008) que conservó actividades bajas o casi nulas (23, 4.67 y 0 % de actividad de celulasa, xilanasa y lacasa). Aunado a ello la liofilización no es un proceso agresivo como la congelación, que mantuvo 43, 33 y 1.2 % de la actividad de celulasa, xilanasa y lacasa; ya que aunque disminuye la contaminación (Rebordes *et al.*, 2007), la mayoría de los nutrientes son retenidos durante cuatro meses de almacenamiento (Grazyna *et al.*, 2008), pero la cristalización del producto, provoca fracturas o desnaturalización de las proteínas (Chimes *et al.*, 2007; Sánchez y Corrales, 2005). Para evitar este problema, en el presente estudio fue utilizado el glicerol que actúa como crioprotector y evita daños a las proteínas (Sánchez y Corrales, 2005; Van *et al.*, 2003), conservando así 65, 25 y 7.8 % de actividad celulasa, xilanasa y lacasa; sin embargo este crioprotector puede alterar la acción de los microorganismos ruminales, sobre otros productos de la dieta. El ácido benzoico, que actúa como bacteriostático, también fue usado en el presente estudio, lo que permitió la conservación de 62, 15 y 4.5 % de la actividad celulasa, xilanasa y lacasa.

## Fase II

### Degradación *in vitro* de enzimas fibrolíticas de *A. bisporus*

La degradabilidad de las enzimas ocurrió de las 3 a las 48 h de incubación (Figura 6), lo que coincide con Ramírez (2005) quien reportó un tiempo medio de degradación de 4 h para *Fibrozyme*®, Safyme, y hemicelulosas industriales; además, Pinos *et al.* (2002) observaron una degradación *in vitro* de 6 a 12 h para *Fibrozyme*®. Sin embargo, Morgavi *et al.* (2000) encontraron que las enzimas de *Trichoderma viridae* y *A. niger* no son estables a las 7 h de incubación porque la proteína se degrada rápidamente en el rumen. Los resultados obtenidos en la presente investigación, así como los recién mencionados, indican que la rapidez de degradación de los complejos enzimáticos se debe principalmente a la falta de nitrógeno disponible para los microorganismos ruminales, por lo cual degradan las enzimas para usarlas como fuente de nitrógeno. Por esta razón McAllister *et al.* (1999) han intentado proteger las enzimas adicionando surfactante (Tween 80) y encontraron una mejor estabilidad *in vitro* de las enzimas; sin embargo obtuvieron una respuesta negativa en el consumo de MS y la ganancia de peso. En cambio, Pan *et al.* (2003) al adicionar nitrógeno en forma de urea observaron un aumento en N amoniacal, pero con un incremento de la actividad enzimática.

### Degradación *in vitro* de la materia seca, fibra detergente neutro y ácido de alfalfa

La desaparición *in vitro* de la fracción A (fracción soluble de MS al enjuagar la muestra 20 min en agua) fue mayor ( $P < 0.01$ ) al incubar la alfalfa con el extracto de *A. bisporus*, pero la de la fracción B (potencialmente digestible que se degrada) fue mayor con el compuesto fibrolítico exógeno comercial. Por tanto, la degradación de la fracción C (suma de la fracción A y la B) aumentó con dicho compuesto y con el extracto *A. bisporus* (Cuadro 3 y 4) a las 24 y 12 h.

No hubo cambios en la fracción B ni en la tasa de degradación de FDN, pero sí hubo un efecto positivo ( $P < 0.01$ ) en la FDA. Al respecto, la DIVMS ha aumentado al agregar *Fibrozyme*® (Ramírez *et al.*, 2005; Pinos *et al.*, 2002), Promote, Depol 40 o Liquicell (Colombatto *et al.*, 2003, 2006; Gun y Beauchemin, 2007). Sin embargo, Ramírez *et al.* (2005) observaron un efecto negativo de *Fibrozyme*® en

la degradación *in vitro* de la alfalfa. Respecto a la DIVFDN de los forrajes se ha reportado que no hubo efecto en alfalfa con Fibrozyme® (Ramírez *et al.*, 2005), en ensilado de cebada con xilanasas-celulasas (McAllister *et al.* 1999, 2003), ni en grano rolado de cebada y ensilado de cebada con Promote (Krause *et al.*, 1998). Además, la DIVFDA no ha cambiado en paja de arroz con *T. reesi* (Eun *et al.*, 2006), en alimento para cabras lecheras con Promote (González, 2004) ni en rastrojo de maíz o paja de avena con Fibrozyme® (Yescas *et al.*, 2004). Pero los resultados positivos en la DIVFDA en el presente estudio fueron similares a los observados para grano de cebada rolado, paja y ensilado de cebada con Promote (Krause *et al.*, 1998). Además se han encontrado cambios positivos en la DIVFDN y DIVFDA en pasto ovillo, rastrojo de maíz y forrajes tropicales con Fibrozyme® (Ramírez *et al.*, 2005), en alfalfa con Liquicell (Colombatto *et al.*, 2006), en alfalfa con endoglucanasas-xilanasas (Gun y Beauchemin, 2007).

#### Degradación *in vitro* de la materia seca de cuatro forrajes

La tasa de degradación y la fracción A (fracción soluble de MS que se pierde al enjuagar la muestra 20 min en agua) no cambiaron ( $p > 0.01$ ) al incluir los extractos enzimáticos (Cuadro 5), en la incubación de pasto ovillo, pasto Taiwán, paja de cebada y composta de *A. bisporus*, lo cual indica que la aplicación previa de los extractos enzimáticos no incrementaría la degradación de los forrajes.

En cambio, la fracción B (potencialmente digestible que se degrada) y por ende la fracción C (suma de la fracción A y la B) aumentaron ( $P < 0.01$ ; Cuadro 5) al incubar el pasto ovillo con el compuesto fibrolítico exógeno comercial, pasto Taiwan y paja de cebada con el extracto de *A. bisporus* y el compuesto fibrolítico exógeno comercial, así como la composta de *A. bisporus* con el extracto de *A. bisporus* (Cuadro 6). Lo anterior muestra una clara especificidad de las enzimas y permitiría explicar parcialmente la diversidad de resultados obtenidos al adicionar enzimas fibrolíticas exógenas a diferentes ingredientes. Además, el extracto obtenido de *A. bisporus* sería más efectivo en forrajes toscos o bien con una alta cantidad de lignina, debido a que el cultivo del hongo se hace sobre paja de cebada y pollinaza principalmente. La digestibilidad de la MS de ingrediente

fibrosos aumentaría porque las enzimas actúan directamente sobre lignina, celulosa y hemicelulosa, lo cual se ha reportado para paja de arroz con enzimas de *Trichoderma reesi* (Eun *et al.*, 2006), caña de azúcar con Fibrozyme® (Gómez *et al.*, 2003), harina de semilla de maíz de girasol y harina de soya con enzimas fibrolíticas (Titi, 2003).

Sin embargo, hay resultados negativos de las enzimas fibrolíticas en la DIVMS ya que el tiempo de retención disminuye en: caña de azúcar con Fibrozyme®, Safyme y hemicelulosas industriales (Ramírez *et al.*, 2005); ensilado de cebada con xilanasas y celulasas (McAllister *et al.*, 1999); concentrado y caña de azúcar con Fibrozyme® (Cano *et al.*, 2003); rastrojo de maíz y paja de avena con Fibrozyme® (Yescas *et al.*, 2004).

## CONCLUSIONES

El análisis de los resultados del presente estudio muestra que es posible obtener y conservar los extractos enzimáticos de composta usada por *A. bisporus* con una cantidad considerable de actividad enzimática fibrolítica, y con una actividad adicional de lacasas, para degradar compuestos polifenólicos. Además es factible conservar esos extractos enzimáticos mediante liofilización, congelación con ácido benzoico o congelación con glicerol. Aunado a ello, en estudios *in vitro* las enzimas celulasas, xilanasas y lacasas de *A. bisporus* afectaron positivamente la degradación de materia seca en la fracción A (soluble) de alfalfa y la fracción B (potencialmente digestible) de la composta de *A. bisporus*, así como de pasto Taiwan y paja de cebada. En cambio, el compuesto fibrolítico exógeno comercial afectó la fracción B en pasto ovillo y alfalfa. Y tanto el extracto enzimático obtenido de *A. bisporus*, como el compuesto fibrolítico exógeno comercial Fibrozyme® aumentaron la desaparición *in vitro* de la FDA, pero no de FDN.

## REFERENCIAS

- Alexopoulos, C. J. and Mimis C.H.W. 1985. Introducción a la Micología. Omega. Barcelona, España. 525 p.
- Arce C.O., Leal L.H., Cruz S.F., Ramírez C.R., and Loera O. 2007. Production of fruit bodies and enzymatic activities of *Agaricus bisporus* on supplemented compost. The Fourth International Medicinal Mushroom Conference. Ljubljana, Slovenia EU. pp: 25-28.
- Ball, A. S., and Jackson, A.M., 1995. The recovery of lignocellulose-degrading enzymes from spent mushroom compost. *Bioresource Technology* 54: 311-314
- Beauchemin, K, Jones, S., Rode, L., and Sewalt, V. 1997. Effects of fibolytic enzymes in corn or barley diets on performance and carcass characteristics of feedlot cattle. *Canadian Journal of Animal Science* 77:645-653.
- Bonnen A., Antón L., and Orth A. 1994. Lignin degrading enzymes of the commercial button mushroom *A. bisporus*. *Applied Environment Microbiology* 3: 960-965.
- Bourbonnais R., Paice G., Freiermuth M.B., Bodie E., and Borneman S. 1997. Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds. *Applied Environment Microbiology* 63: 4627-4632.
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytic Biochemical* 72: 248-254.
- Cano, A. E. Aranda, G. Mendoza, P. Perez y J. Ramos. 2003. Comportamiento de toretes en pastos tropicales suplementados con caña de azúcar y enzimas fibrolíticas. *Técnica Pecuaria en México* 41(2):153-164.
- Chanasattru W., Decker E.A., and McClements D.J. 2008. Impact of cosolvents (polyols) on globular protein functionality: Ultrasonic velocity, density, surface tension and solubility study. *Food Hydrocolloids* 22:1475-1484.

- Chang S.T., and Miles P. G. 2004. Mushrooms. Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect and Environmental Impact, 2<sup>nd</sup>. Ed. CRC. Press, Boca Raton. 451 p.
- Colombatto, D., Mould, F., Bhat, M., and Owen, E. 2003. Use of fibrolytic enzymes to improve the nutritive value of ruminant diets. A biochemical and in vitro rumen degradation assessment. *Animal Feed Science Technology* 107: 201-209.
- Colombatto, D., Mould, F., Bhat, M., and Owen, E. 2006. Influence of exogenous fibrolytic enzymes level and incubation pH on the in vitro ruminal fermentation of alfalfa stems. *Animal Feed Science Technology* Doi: 10.1016/j.anifeedsci.2006.10.001.
- De Groot, P. W. J., Basten, D. E. J. W., Sonnenberg, A. S. M., Van Griensven, L. J. L. D., Visser, J., and Schaap, P. J. 1998. [An endo-1,4- \$\beta\$ -xylanase-encoding gene from \*Agaricus bisporus\* is regulated by compost-specific factors](#). *Journal Molecular Biology* 277: 273-284.
- Durrant, A. J., Wood, D. A., and Cain, R. B. 1991. Lignocellulose biodegradation by *Agaricus bisporus* during solid substrate fermentation. *Journal Genetic Microbiology* 137:751-755.
- Eun, J., Beauchemin, K., and Hong, S. 2006. Exogenous enzymes added to untreated or ammoniated rice straw: Effects on in vitro fermentation characteristics and degradability. *Animal Feed Science Technology* 131: 86-101.
- Fiore P y Albarracín M. 1997. Compost y tierra de cobertura para el cultivo del champiñón (*Agaricus brunnescens* Peck., *A. bisporus*). *Revista FAC. Agronomía (LUZ)* 1998. 15: 230-241.
- Gea A, Tello M. 1997. Micosis del Cultivo del Champiñón. Mundi-Prensa. España. 159 p.
- Gómez V. Pérez, J., Mendoza, G., Aranda, E., and Hernández, A. 2003. Fibrolytic exogenous enzymes improve performance in steers fed sugar cane and stargrass. *Livestock Production Science* 82: 249-254.

- González, G. 2004. Utilización de enzimas fibrolíticas en cabras lecheras. Evaluación de su actividad y características fermentativas in vitro. Tesis Doctoral. Departament de Ciència Animal: Dels Aliments. Universitat Autònoma de Barcelona. 124 p.
- Grazyna J. Bernas E., Cichon Z., Przemystaw P. 2008. Establishing the optimal period of storage for frozen *Agaricus bisporus*, depending on the preliminary processing applied. International Journal of Refrigeration. Doi:1010-1016/jrefrig. 12 010.
- Gun, J., and K. Beauchemin. 2007. Assessment of the efficacy of varying experimental exogenous fibrolytic enzymes using in vitro fermentation characteristics. Animal Feed Science Technology. 132: 298-315.
- Guzman G. 1985. Hongos. Limusa, México, 345 pp.
- Hellmut S. 1987. Cultivo comercial del champiñón. Acribia. Zaragoza, España 142 pp.
- Kapich A, Prior B, Botha A, Galkin S, Lundell T, Hatakka A. 2004. Effect of lignocellulose-containing substrate on production of ligninolytic peroxidases in submerged cultures of *Phanerochate chrysosporium*. Enzyme Microbiology Technology. 34:187-195.
- Kenji I, Bruce A, Barry J. 1994. Compositional changes in compost during composting and growth of *Agaricus bisporus*. Applied and Environmental Microbiology. 60 (5):1538-1546.
- Krause, M., K. Beauchemin; L. Rode, B. Farr, and P. Norgaard. 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.
- Kues U. 2000. Life history and development processes in the basidiomycete *Coprinus cinereus*. Microbiology and Molecular Biology. 64 (2): 316-353.
- Lagunas B., García A., Castaño T., Regalado G. Ávila G. 2006. Producción de enzimas hemicelulolíticas por fermentación sólida y su aplicación en alimento balanceado para pollos de engorda. Veterinaria México 37 (001): 1-13.

- Lankinen, P., K. Hildén, N. Aro, M. Salkinoja-Salonen, A. Hatakka. 2005. Manganese peroxidase of *Agaricus bisporus*: grain bran-promoted production and gene characterization. *Applied Microbiology Biotechnology* 66:401–407
- Li X., Pang Y., Zhang R. 2001. Compositional changes of cottonseed hull substrate during *Pleurotus ostreatus* growth and the effects on the feeding value of the spent substrate. *Bioresource Technology*. 80:157-161.
- Loera O., Cordova J. 2003. Improvement of xylanase production by a parasexual cross between *Aspergillus niger* strains. *Brazilian Archive Biology Technology* 46: 177-181.
- Mamiro, D. P., Royse, D. J., 2008. [The influence of spawn type and strain on yield, size and mushroom solids content of \*Agaricus bisporus\* produced on non-composted and spent mushroom compost.](#) *Bioresource Technology*. 99: 3205-3212.
- Márquez A.T., Mendoza M.G.D., Gonzalez M.S.S., Buntinx D.S.E., Loera C.O. 2007. Actividad fibrolítica de enzimas producidas por *Trametes sp.* EUM1, *Pleurotus ostreatus* IE8 y *Aspergillus niger* AD96.4 en fermentación sólida. *Interciencia*. 32 (11): 780-785.
- McAllister, T., K. Stantord, H. Bae, R. Treacher, A. Hristor, and K. Cheng. 1999. Effect of a surfactant and exogenous enzymes on digestibility of feed and on growth performance and carcass traits of lambs. *Canadian Journal of Animal Science*. 80:35-44.
- McCollough, H. 1967. The determination of ammonia in whole blood by direct colorimetric method. *Clinical Chemical*. 17:297-304.
- McDougall, I. 1948. Studies on ruminant saliva. I. The composition and output of sheep's saliva. *Biochemical Journal*. 70:99-109.
- Membrillo I, Sanchez 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.

- Miller G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytic Chemical* 31: 426–428.
- Mohapatra D., Frias J., Oliveira F., Biraz M., Ferry J. 2008. Development and validation of a model to predict enzymatic activity during storage of cultivated mushrooms (*Agaricus bisporus* spp.). *Journal of Food Engineering*. 86:39-48.
- Montgomery D.C. 1997. *Design and Analysis of Experiments*. 4<sup>th</sup> Ed. Wiley. U.S.A. 704 p.
- Morgavi, D., C. Newbold, D. Beever, and R. Wallace. 2000. Stability and stabilization of potential feed additive enzymes in rumen fluid. *Enzyme Microbiology Technology*. 26:171-177.
- Muller, S., R. Souza, B. Dal, D. Mitchel, and N. Krieger. 2004. Thermal denaturation is solid state fermentation really a good technology for the production of enzymes?. *Bioresource Technology*. 93:261-268.
- Pan, J., T. Suzuki, S. Kaike, K. Veda, Y. Kobayashi, K. Tanaka, and M. Okubo. 2003. Effects of urea infused into the rumen on liquid-and particle associated fibrolytic enzyme activities in steers fed low quality grass hay. *Animal Feed Science and Technology*. 104:13-27.
- Pandey, A., 2003. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 13: 81–84.
- Papinutti V, Diorio L, Forchiassin F. 2003. Degradación de la Madera de álamo por *Fomes sclerodermeus*: Producción de enzimas ligninolíticas en aserrín de álamo y cedro. *Revista Iberoamericana de Micología*. 20:16-20.
- Pinos RJM, González MS, Mendoza MG, Bárcena GR, y Cobos PM. 2002. Efecto de enzimas fibrolíticas exógenas en la digestibilidad in vitro de la pared celular de heno de alfalfa (*Medicago sativa*) o de ballico (*Lolium perene*). *Interciencia*. (27)1:28-32.
- Purkarthofer H., Sinner M., Steiner, W. 1993. Cellulase-free xylanase from *Thermomyces lanuginosus*: Optimization of production in submerged and solid state culture. *Enzyme Microbiology Technology* 15: 677–682.

- Ramírez, C. 2005. Evaluación bioquímica e in vitro de enzimas fibrolíticas exógenas utilizadas en la alimentación de rumiantes. Tesis Doctoral. Colegio de Postgraduados. Edo. de México. México. 213 p.
- Rimko T. Hilde W, Nicole A, Gerben S, Schaap P. 2003. Lignin degradation by *Agaricus bisporus* accounts for a 30% increase in bioavailable holocellulose during cultivation on compost. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51:2242-2245.
- Royse D. 2007. Consumo y producción de *Agaricus bisporus* en el mundo. Cultivo mercadotecnia e inocuidad alimenticia de *Agaricus bisporus*. Colegio de la frontera sur. Tapachula, Chiapas. México. Noviembre. 107pp.
- Sánchez L.L.C. y Corrales R.L.C. 2005. Congelación bacteriana: Factores que intervienen en el proceso. *Química Nova*, 3 (3): 1-120.
- SAS. 2002. User's Guide: Statistics. SAS. Institute. Cary, NC, USA. 1028 p.
- Shah M.P., Reddy G.V., Banerje R., Ravindra B.P., Kothari L. 2005. Microbial degradation of banana waste under solid state bioprocessing using two lignocellulolytic fungi (*Phylosticta sp*, *MPS-001* and *Aspergillus spp*. *MPS-002*). *Process Biochemistry*. 40:445-451.
- Sungurtas J., Swanston J.S., Davies H.V., McDougall G.J. 2004. Xylan-degrading enzymes and arabinoxylan solubilisation in barley cultivars of differing malting quality. *Journal of Cereal Science* 39:273-281.
- Susmel. P. Spanghero M. Stefanon B. 1999. Interpretation of rumen degradability of concentrate feeds with a Gompertz model. *Anim. Feed Science Technology*. 79, 223-237.
- Tano K., Oulé M.K., Doyon G. Leneki R. W. Azul J. 2007. Comparative evaluation on the effect of storage temperature fluctuation on modified atmosphere packages of selected fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology* 46: 212-221.
- Tilley, L., and R. Terry. 1963. A two stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *Journal of Bromatology Grassland Society*. 28:104-111.

- Titi, H. 2003. Replacing soybean meal with sunflower meal with or without fibrolytic enzymes in fattening diets of goat kids. *Small Ruminant Research*. 48: 45-50.
- Valenzuela H., L. D., y L. R. Ortiz R. 2007. Estabilidad de la glucosa oxidasa en sistemas amorfos formados por los disacáridos sacarosa, maltosa y trehalosa. *Química Nova* 13 (7):1633-1637.
- Van Greiesven L. 1988. The cultivation of mushroom. History and development. Mushroom Experimental Station. Horst. The Netherlands. 515 pp.
- Van P. and Therelein J. 2003. Determinants of freeze tolerance in microorganisms, physiological importance and biotechnological applications. *Advances in Applied Microbiology*. 53:129-176.
- Van Soest, P., J. Robertson, and B. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*. 74:3583-3597.
- Vázquez G. Alemán N. Arozarena A. Carmona J. Barba J, Campos R. 1997. Estudio comparativo de compostas. II. Análisis microbiológico. Productos naturales. *Perspectivas Biotecnológicas*. 3:129-132.
- Vladimir E, Penninckx, Kachlishvili, Asatiani M, Kvesitadze G. 2006. Use of *Pleurotus drynus* for lignocellulolytic enzymes production in submerged fermentation of mandarin peels and tree leaves. *Enzyme and Microbial Technology*. 38:998-1004.
- Wainwright M. 1995. Introducción a la Biotecnología de los hongos. Acribia. España. 235 pp.
- Wood D.D., Goodenough P.W. 1977. Fruiting of *Agaricus bisporus*. Changes in extracellular enzyme activities during growth and fruiting. *Archive Microbiology* 114: 161-165.
- Yescas Y., R., R. Bárcena-Gama, Germán D. Mendoza-Martínez, Sergio S. González-Muñoz, Mario Cobos Peralta, y María Esther Ortega Cerrilla. 2004. Digestibilidad in situ de dietas con rastrojo de maíz o paja de avena con enzimas fibrolíticas. *Agrociencia*. 38: 23-31.

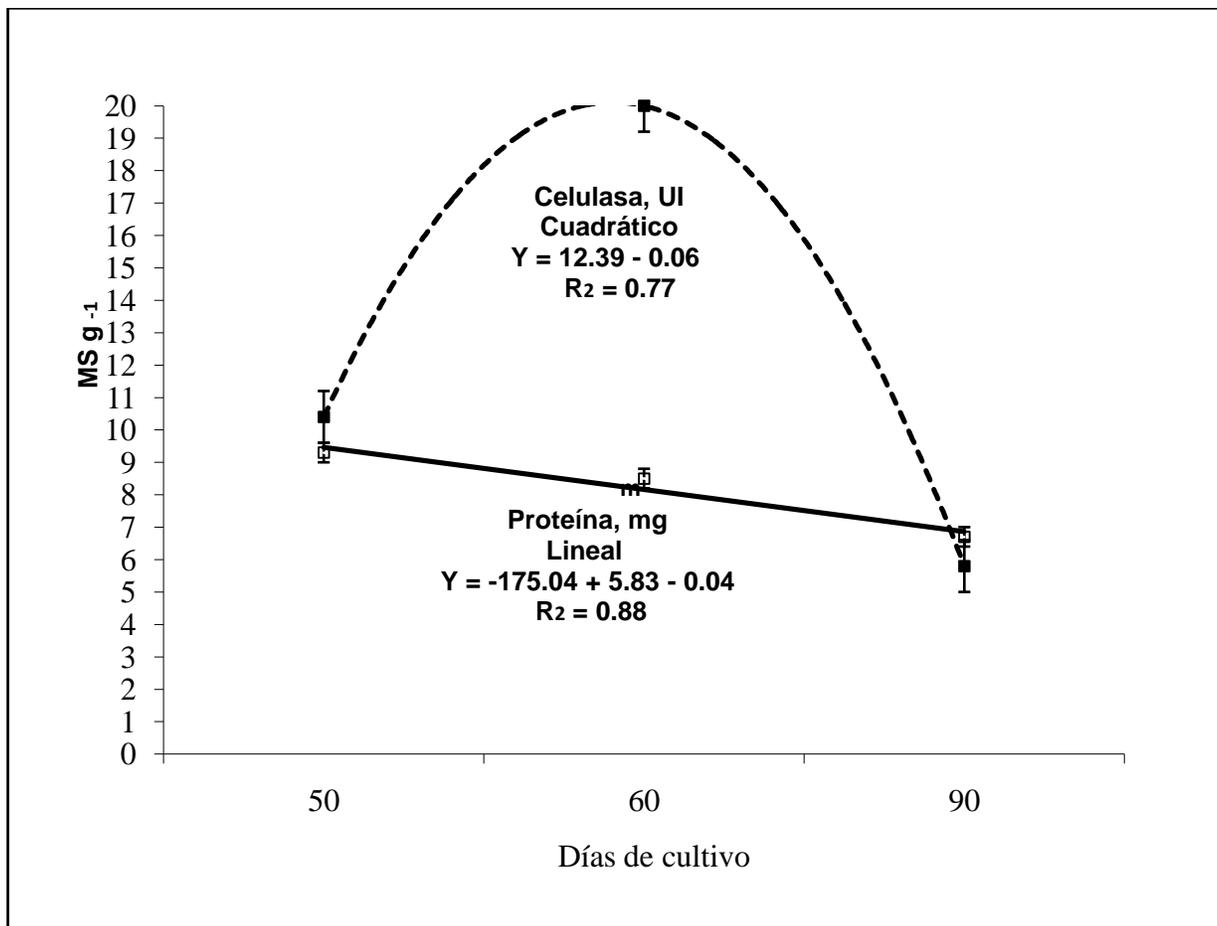


Figura 1. Cantidad de proteína (mg) y actividad celulasa (UI) en composta usada por *A. bisporus*.

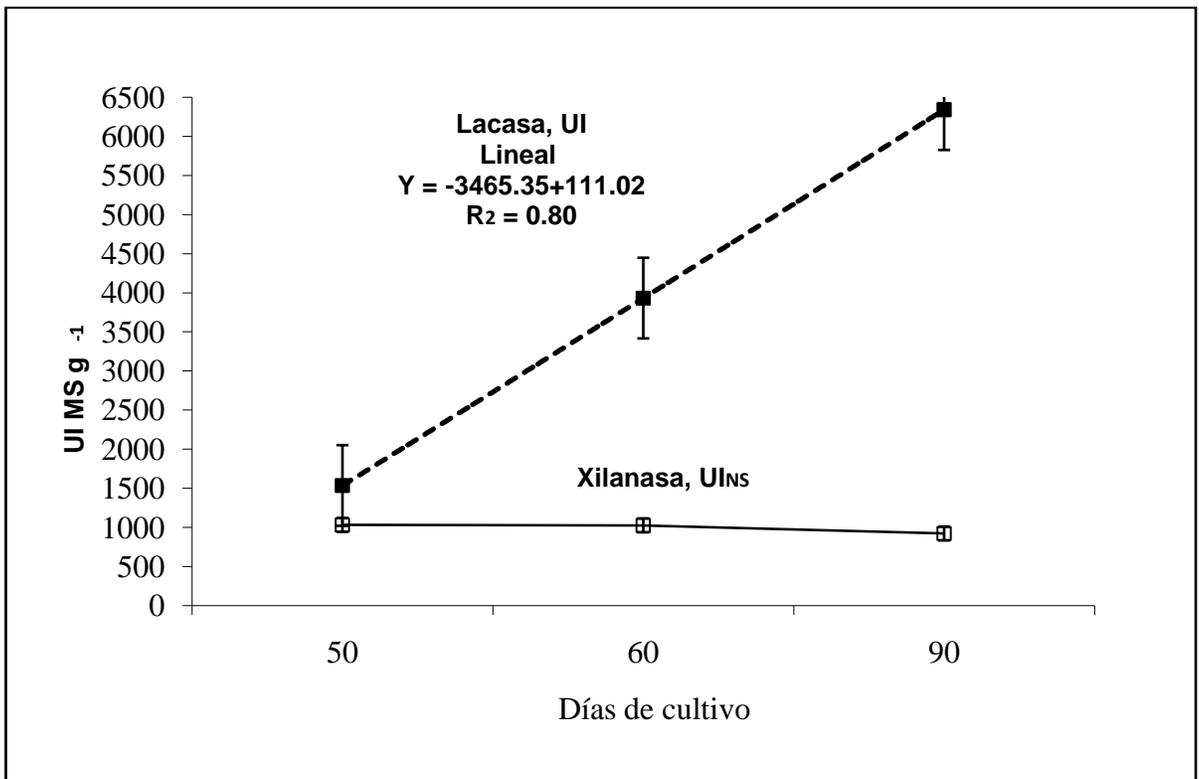
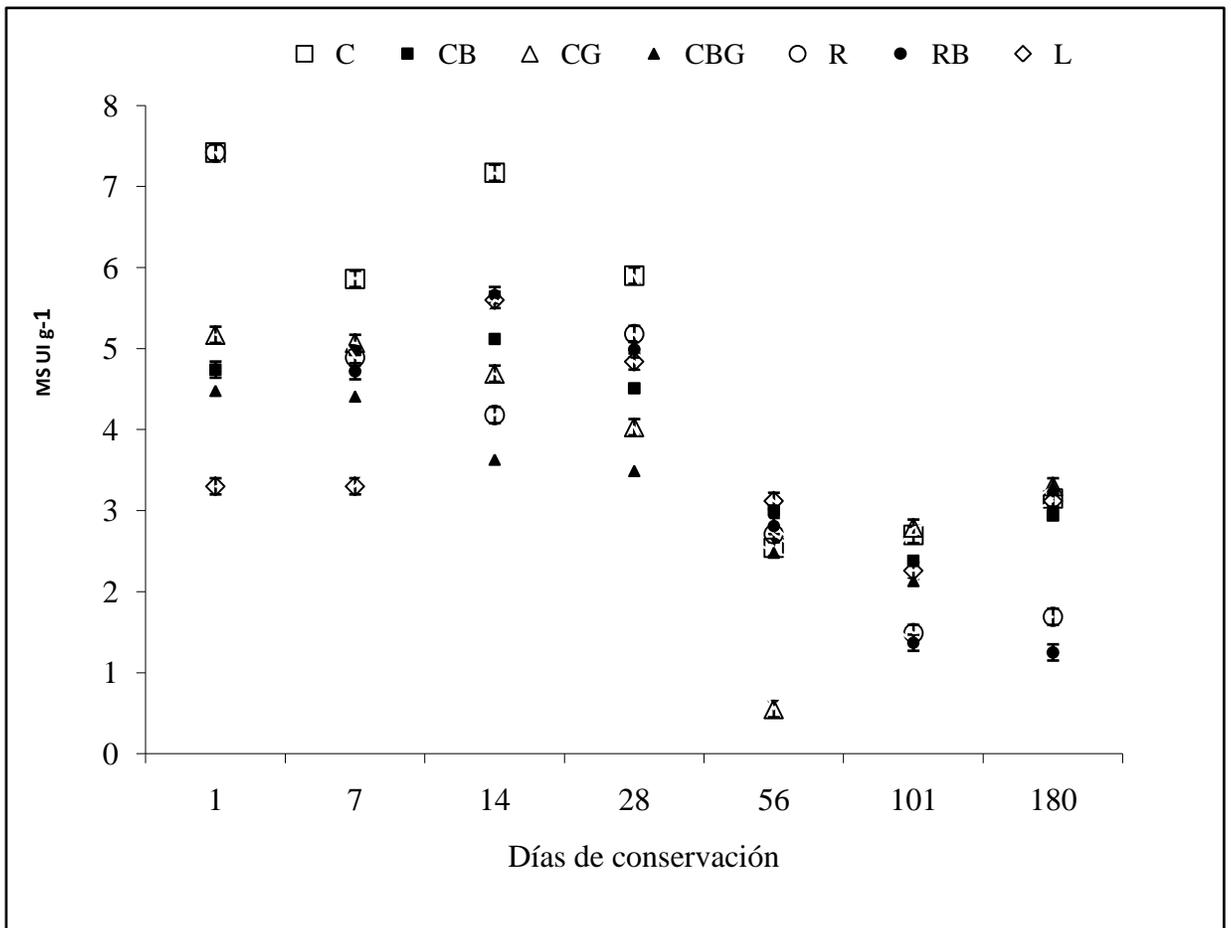
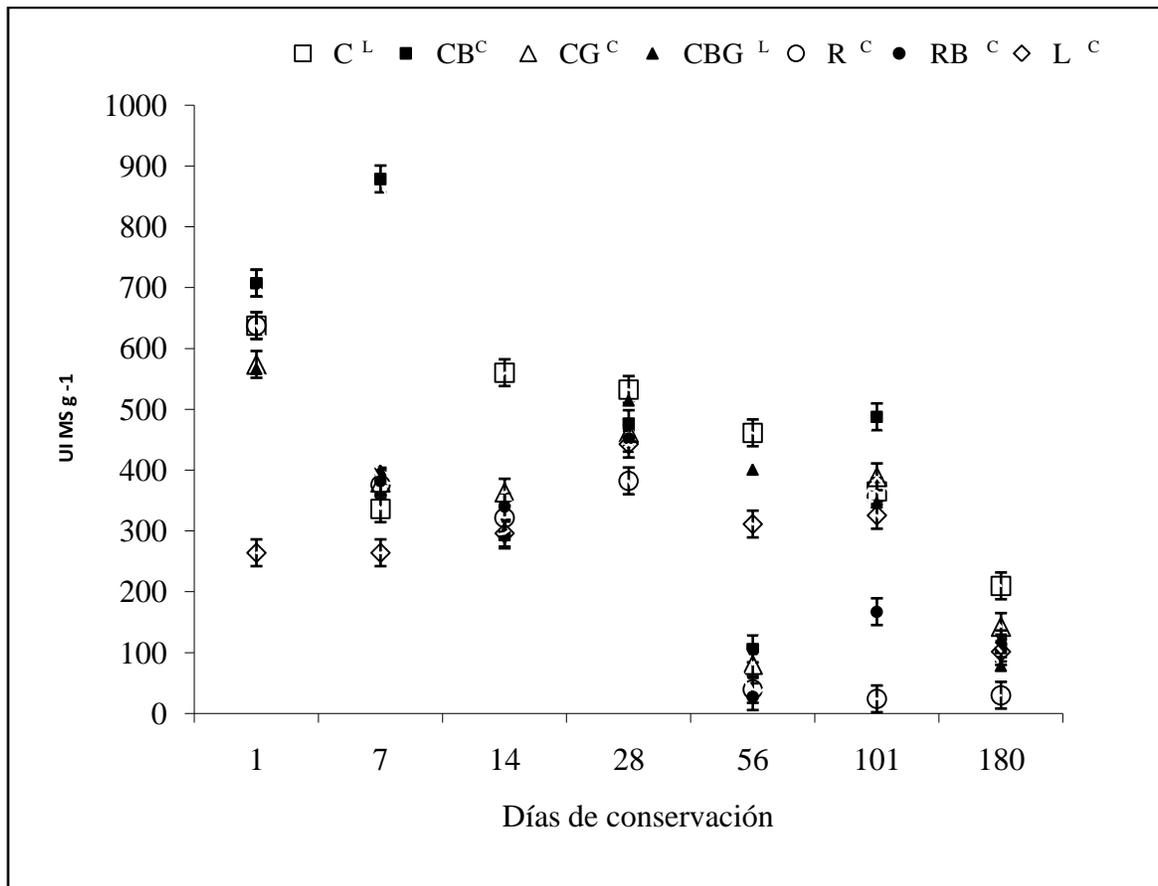


Figura 2. Actividad de xilanasa y lacasa en composta usada por *A. bisporus*



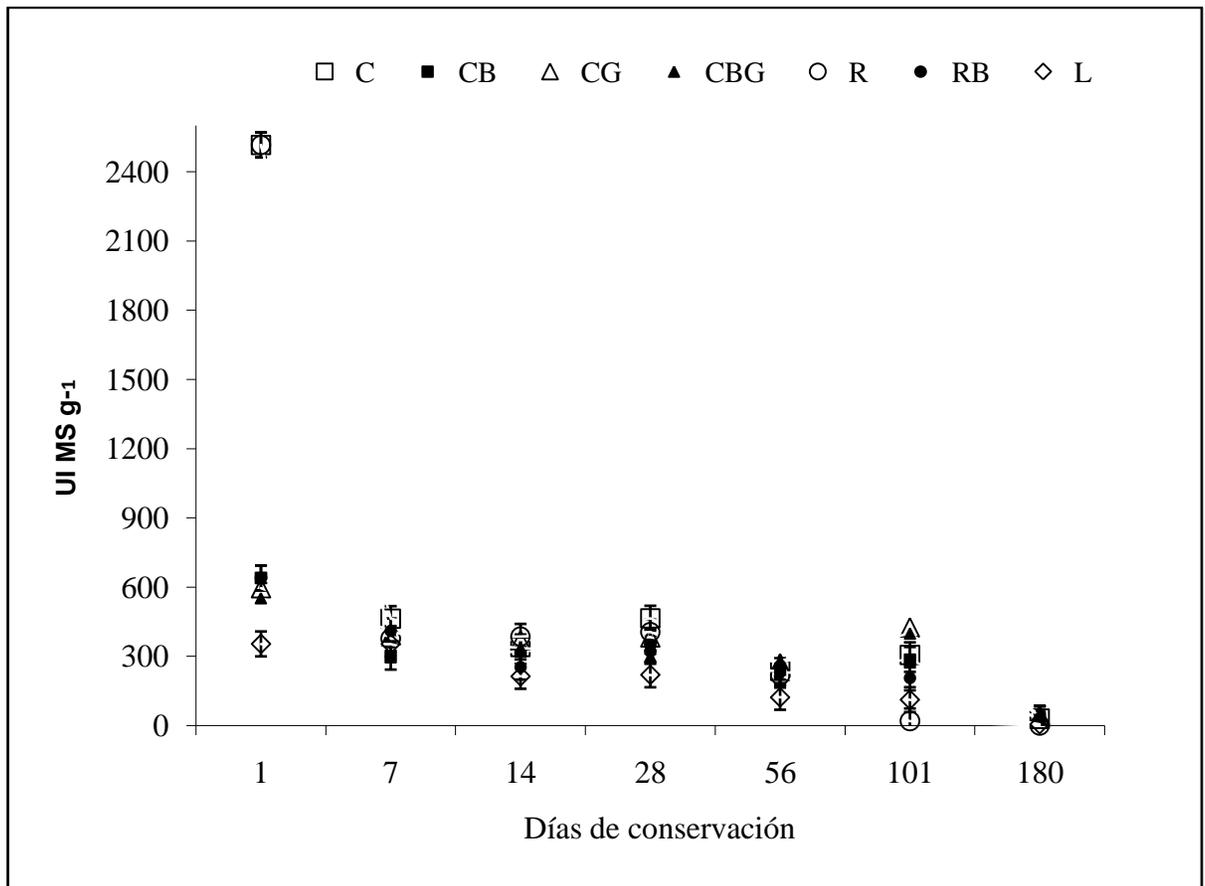
C, congelación; CB, congelación con ácido benzoico; CG, congelación con glicerol; CBG, congelación con ácido benzoico y glicerol; R, refrigeración; RB, refrigeración y ácido benzoico; L, liofilización, <sup>Q</sup> cuadrático; <sup>C</sup> cúbico.

Figura 3. Efecto de método y tiempo de conservación sobre la actividad celulasa de composta usada por *A. bisporus*.

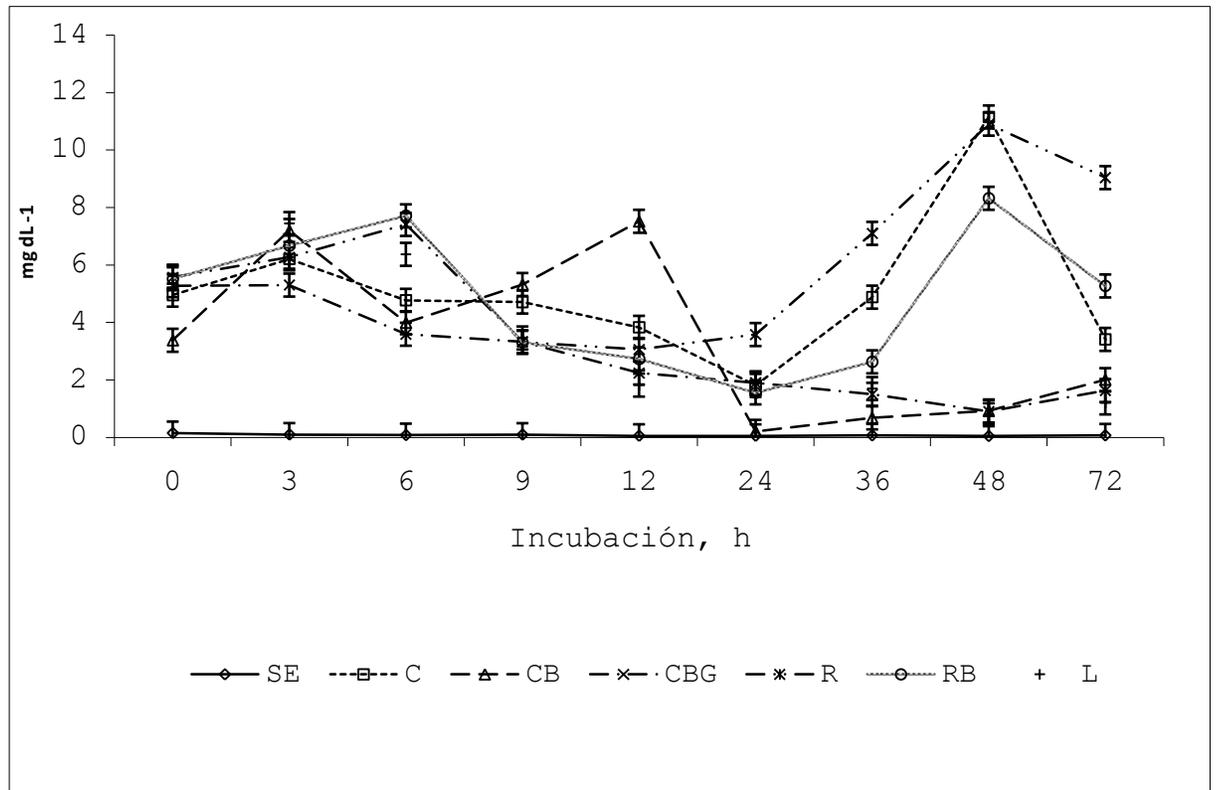


C, congelación; CB, congelación con ácido benzoico; CG, congelación con glicerol; CBG, congelación con ácido benzoico y glicerol, R, refrigeración; RB, refrigeración y ácido benzoico; L, liofilización, <sup>L</sup> lineal, <sup>Q</sup> cuadrático; <sup>C</sup> cúbico.

Figura 4. Efecto de método y tiempo de conservación sobre la actividad xilanasa de composta usada por *A. bisporus*.



C, congelación; CB, congelación con ácido benzoico; CG, congelación con glicerol; CBG, congelación con ácido benzoico y glicerol; R, refrigeración; RB, refrigeración y ácido benzoico; L, liofilización. La actividad enzimática fue afectada cúbicamente en el tiempo de conservación. Figura 5. Efecto de método y tiempo de conservación sobre la actividad lacasa, de composta usada por *A. bisporus*.



SE, sin extracto, C, congelación; CB, congelación con ácido benzoico; CBG, congelación con ácido benzoico y glicerol, R, refrigeración; RB, refrigeración y ácido benzoico; L, liofilización

**Figura 6. Concentración de nitrógeno amoniacal en líquido ruminal incubado *in vitro* con enzimas fibrolíticas de *A. bisporus***

**Cuadro 1. Proteína soluble y actividades enzimáticas de extractos de *A. bisporus* a diferente edad de cultivo**

Edad de cultivo d	Proteína mg MS g <sup>-1</sup>	Celulasa UI MS g <sup>-1</sup>	Xilanasa UI MS g <sup>-1</sup>	Lacasa UI MS g <sup>-1</sup>
50	8.8 <sup>a</sup>	10.0 <sup>b</sup>	1102.7 <sup>a</sup>	4035.7 <sup>ab</sup>
60	8.7 <sup>a</sup>	20.2 <sup>a</sup>	1024.7 <sup>a</sup>	3593.1 <sup>b</sup>
90	5.7 <sup>b</sup>	5.7 <sup>c</sup>	825.9 <sup>a</sup>	5663.3 <sup>a</sup>
EE	0.8	0.8	89.2	515.8

<sup>a, b</sup> = Literales diferentes indican diferencia estadísticamente significativa (P<0.01). E.E.= Error estándar.

**Cuadro 2. Actividad enzimática y proteína soluble de extractos enzimáticos de residuos de *A. bisporus* de 60 d de siembra conservados con diferentes métodos**

Método de Conservación	Proteína mg MS g <sup>-1</sup>	Celulasa UI MS g <sup>-1</sup>	Xilanasas UI MS g <sup>-1</sup>	Lacasa UI MS g <sup>-1</sup>
CONGELACIÓN	6.7 <sup>ab</sup>	4.9 <sup>a</sup>	443.2 <sup>a</sup>	622.6 <sup>a</sup>
CONGELACIÓN B	6.5 <sup>b</sup>	3.9 <sup>b</sup>	436.7 <sup>a</sup>	308.9 <sup>b</sup>
CONGELACIÓN G	6.0 <sup>bc</sup>	3.9 <sup>b</sup>	341.5 <sup>b</sup>	359.6 <sup>b</sup>
CONGELACIÓN G + B	5.6 <sup>d</sup>	3.4 <sup>d</sup>	372.4 <sup>b</sup>	327.9 <sup>b</sup>
LIOFILIZACIÓN	6.1 <sup>c</sup>	3.7 <sup>c</sup>	286.5 <sup>d</sup>	197.2 <sup>c</sup>
REFRIGERACIÓN	6.9 <sup>a</sup>	3.9 <sup>b</sup>	258.6 <sup>d</sup>	560.2 <sup>a</sup>
REFRIGERACIÓN B	6.3 <sup>bc</sup>	3.7 <sup>c</sup>	312.6 <sup>bc</sup>	299.2 <sup>b</sup>
E.E.	0.09	0.05	8.34	20.6

B - Ácido benzoico, G - Glicerol, <sup>abcd</sup>= Letras diferentes indican diferencia significativa (P<0.01) mg MS g<sup>-1</sup> =Miligramo por gramo de materia seca del residuo, UI MS g<sup>-1</sup>= Unidades internacionales por gramo de materia seca del residuo.

**Cuadro 3. Efecto de enzimas fibrolíticas sobre la degradación *in vitro* de la materia seca (MS), fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácida (FDA) de heno de alfalfa**

	Sin enzimas	Compuesto fibrolítico comercial	<i>A. bisporus</i>	E.E.
<b>Materia seca</b>				
Fracción soluble, g kg <sup>-1</sup> MS	418 <sup>b</sup>	412 <sup>b</sup>	474 <sup>a</sup>	20.2
Degradación potencial, g kg <sup>-1</sup> MS	268 <sup>b</sup>	332 <sup>a</sup>	251 <sup>b</sup>	11.6
Degradación total, g kg <sup>-1</sup> MS	686 <sup>b</sup>	744 <sup>a</sup>	725 <sup>ab</sup>	39.1
Tasa de degradación h <sup>-1</sup> FDN	0.035	0.038	0.039	0.002
Degradación potencial, g kg <sup>-1</sup> MS	447	467	472	31.9
Tasa de degradación h <sup>-1</sup> FDA	0.025	0.028	0.028	0.002
Degradación potencial, g kg <sup>-1</sup> MS	284 <sup>b</sup>	381 <sup>a</sup>	414 <sup>a</sup>	29.7
Tasa de degradación h <sup>-1</sup>	0.016	0.019	0.019	0.001

<sup>a, b</sup>= Literales diferentes indican diferencia estadísticamente significativa (P<0.01). E.E.= Error estándar.

**Cuadro 4. Degradación *in vitro* a diferente tiempo de incubación, de materia seca (MS), fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácido (FDA) de alfalfa**

Hora	MS			FDN			FDA		
	SE	F	AB	SE	F	AB	SE	F	AB
	g kg <sup>-1</sup> MS								
1	41.8 <sup>a</sup>	41.2 <sup>a</sup>	47.4 <sup>a</sup>						
12	53.7 <sup>b</sup>	44.0 <sup>c</sup>	61.7 <sup>a</sup>	8.2 <sup>b</sup>	20.6 <sup>a</sup>	24.5 <sup>a</sup>	4.2 <sup>c</sup>	17.8 <sup>b</sup>	24.8 <sup>a</sup>
24	59.9 <sup>a</sup>	64.2 <sup>a</sup>	62.7 <sup>a</sup>	16.1 <sup>b</sup>	27.9 <sup>a</sup>	28.6 <sup>a</sup>	4.3 <sup>c</sup>	40.9 <sup>a</sup>	25.9 <sup>b</sup>
48	60.7 <sup>a</sup>	72.2 <sup>a</sup>	67.5 <sup>a</sup>	31.2 <sup>b</sup>	48.3 <sup>a</sup>	40.1 <sup>a</sup>	5.9 <sup>c</sup>	49.1 <sup>a</sup>	33.2 <sup>b</sup>
72	72.5 <sup>a</sup>	74.4 <sup>a</sup>	68.6 <sup>a</sup>	46.5 <sup>b</sup>	50.1 <sup>a</sup>	43.4 <sup>b</sup>	39.8 <sup>b</sup>	61.7 <sup>a</sup>	42.6 <sup>b</sup>

<sup>a, b, c</sup> = Literales diferentes indican diferencia estadísticamente significativa (P<0.01) por extracto en cada forraje, Error estándar = 2.31.

SE: Sin enzimas; F: Extracto comercial Fibrozyme®; AB: Extracto enzimático obtenido de *A. bisporus*.

**Cuadro 5. Efecto de enzimas fibrolíticas sobre la degradación *in vitro* de la materia seca (MS) de cuatro forrajes**

	Sin enzimas	Compuesto		E.E.
		fibrolítico comercial	<i>A. bisporus</i>	
<b>Pasto ovillo</b>				
Fracción soluble, g kg <sup>-1</sup> MS	300 <sup>a</sup>	294 <sup>a</sup>	283 <sup>a</sup>	15.9
Degradación potencial, g kg <sup>-1</sup> MS	308 <sup>b</sup>	367 <sup>a</sup>	314 <sup>b</sup>	16.3
Degradación total, g kg <sup>-1</sup> MS	608 <sup>b</sup>	661 <sup>a</sup>	597 <sup>b</sup>	22.8
Tasa de degradación h <sup>-1</sup>	0.030	0.033	0.031	0.001 6
<b>Pasto Taiwan</b>				
Fracción soluble, g kg <sup>-1</sup> MS	221 <sup>a</sup>	199 <sup>a</sup>	210 <sup>a</sup>	10.3
Degradación potencial, g kg <sup>-1</sup> MS	108 <sup>b</sup>	232 <sup>a</sup>	252 <sup>a</sup>	10.6
Degradación total, g kg <sup>-1</sup> MS	329 <sup>b</sup>	431 <sup>a</sup>	462 <sup>a</sup>	14.7
Tasa de degradación h <sup>-1</sup>	0.022	0.025	0.026	0.001 2
<b>Paja de cebada</b>				
Fracción soluble, g kg <sup>-1</sup> MS	264 <sup>a</sup>	246 <sup>a</sup>	240 <sup>a</sup>	12.9
Degradación potencial, g kg <sup>-1</sup> MS	148 <sup>b</sup>	244 <sup>a</sup>	243 <sup>a</sup>	12.0
Degradación total, g kg <sup>-1</sup> MS	412 <sup>b</sup>	490 <sup>a</sup>	483 <sup>a</sup>	18.7
Tasa de degradación h <sup>-1</sup>	0.026	0.029	0.028	0.001 7
<b>Composta de <i>A. bisporus</i></b>				
Fracción soluble, g kg <sup>-1</sup> MS	284 <sup>a</sup>	280 <sup>a</sup>	304 <sup>a</sup>	13.5
Degradación potencial, g kg <sup>-1</sup> MS	238 <sup>c</sup>	302 <sup>b</sup>	368 <sup>a</sup>	13.9
Degradación total, g kg <sup>-1</sup> MS	522 <sup>c</sup>	582 <sup>b</sup>	672 <sup>a</sup>	19.9
Tasa de degradación h <sup>-1</sup>	0.028	0.030	0.032	0.002 1

<sup>a, b</sup>= Literales diferentes indican diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.01$ ); E.E.= Error estándar.

**Cuadro 6. Degradación *in vitro* a diferente tiempo de incubación de la materia seca de cuatro forrajes**

Hora	Pasto ovillo			Paja de cebada			Pasto Taiwan			Composta <i>A. bisporus</i>		
	SE	F	AB	SE	F	AB	SE	F	AB	SE	F	AB
	g kg <sup>-1</sup> MS											
1	31.0 <sup>a</sup>	28.4 <sup>a</sup>	27.4 <sup>a</sup>	28.4 <sup>a</sup>	24.6 <sup>a</sup>	19.7 <sup>a</sup>	22.1 <sup>a</sup>	13.7 <sup>a</sup>	21.0 <sup>a</sup>	28.4 <sup>a</sup>	28.0 <sup>a</sup>	30.4 <sup>a</sup>
12	42.0 <sup>a</sup>	33.2 <sup>a</sup>	44.1 <sup>a</sup>	31.9 <sup>a</sup>	30.3 <sup>a</sup>	30.8 <sup>a</sup>	27.6 <sup>a</sup>	19.1 <sup>a</sup>	24.1 <sup>a</sup>	34.5 <sup>a</sup>	36.4 <sup>a</sup>	42.3 <sup>a</sup>
24	50.1 <sup>a</sup>	45.1 <sup>a</sup>	44.9 <sup>a</sup>	36.8 <sup>b</sup>	42.7 <sup>ab</sup>	41.4 <sup>a</sup>	29.8 <sup>a</sup>	33.1 <sup>a</sup>	31.4 <sup>a</sup>	43.1 <sup>a</sup>	43.7 <sup>a</sup>	48.8 <sup>a</sup>
48	55.8 <sup>a</sup>	58.6 <sup>a</sup>	45.6 <sup>a</sup>	38.0 <sup>b</sup>	45.2 <sup>a</sup>	44.1 <sup>a</sup>	30.7 <sup>b</sup>	40.9 <sup>a</sup>	40.1 <sup>a</sup>	44.6 <sup>a</sup>	50.2 <sup>a</sup>	55.9 <sup>a</sup>
72	60.8 <sup>a</sup>	66.1 <sup>a</sup>	58.7 <sup>a</sup>	41.5 <sup>b</sup>	48.9 <sup>a</sup>	48.2 <sup>a</sup>	31.8 <sup>b</sup>	42.3 <sup>a</sup>	46.2 <sup>a</sup>	52.2 <sup>b</sup>	58.2 <sup>ab</sup>	67.2 <sup>a</sup>

<sup>a, b</sup>= Literales diferentes indican diferencia estadísticamente significativa (P<0.01) por extracto en cada forraje, Error estándar = 2.31.

SE: Sin enzimas; F: Extracto comercial Fibrozyme®; AB: Extracto enzimático obtenido de *A. bisporus*.