



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA**

**EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS
FISICOQUÍMICAS DE ENSILADO DE SUSTRATO
RESIDUAL DE LA PRODUCCIÓN DE HONGOS DE
PODREDUMBRE BLANCA**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

**PRESENTA
DIANA VICTORIA VALDÉS MELÉNDEZ**

ASESORAS

Dra Claudia Cecilia Márquez Mota

Dra Angélica Valeria Lorenzana Moreno



Ciudad Universitaria, Cd. Mx. 2024



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.

DEDICATORIA

A mis padres y mi hermano, por siempre cuidarme, quererme y apoyarme.

A Leo, por todos los años de compañía y cariño.

A Ixchel, por mostrarme que la ternura es el camino.

A mis asesoras, Claudia y Valeria, por abrir caminos para todas nosotras.

A Edi, Gonzi y Lalito, por su trabajo duro, pero sobre todo por su amistad.

A Damián, mi químico, por su apoyo y su paciencia.

A Humberto Gutiérrez, por todo lo que me enseñó.

A la Victoria chiquita, por saltar.

AGRADECIMIENTOS

Al proyecto PAPIIT IN212822 de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia–UNAM por el financiamiento de este proyecto de investigación.

Al Dr. Hermilo Leal Lara de la Facultad de la Facultad de Química, UNAM, por su apoyo en la obtención de los sustratos residuales de hongo para este estudio.

Al Centro de Enseñanza Práctica en Producción y Salud Animal, CEPIPSA – UNAM por las facilidades otorgadas para la realización de este proyecto.

Al Laboratorio del Departamento de Nutrición Animal y Bromatología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia–UNAM y la Química Agueda por su apoyo para la determinación de la composición química de los ensilados.

Al Doctor Talamantes y la Química Moni del Departamento de Nutrición Animal y Bromatología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia–UNAM, por su apoyo para la determinación de nitrógeno amoniacal, ácidos grasos volátiles y micotoxinas.

CONTENIDO

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.2 Características nutricionales del rastrojo de maíz empleado en la alimentación animal	2
1.3 Estructura de la pared celular vegetal	3
1.3.1 Componentes de la pared celular vegetal	3
1.4 Estrategias para mejorar las características nutricionales del rastrojo de maíz	5
1.5 Características generales de los hongos basidiomicetos	6
1.1 Panorama de la producción de esquilmos agrícolas, usos e importancia en la alimentación animal	8
1.5.1 Efecto del complejo de enzimas lignocelulósicas de los hongos de podredumbre blanca sobre la pared celular del rastrojo de maíz	9
1.5.2 Síntesis de Metabolitos Secundarios (Ms) de los hongos de podredumbre blanca a partir de lignina	11
1.5.3 La importancia de los compuestos fenólicos en la alimentación animal	13
1.5.4 Producción de hongos cultivados en México	14
1.6 El ensilaje como método de conservación, almacenaje y alternativa de consumo del sustrato residual de la producción de hongos de podredumbre blanca en la alimentación animal	14
1.6.1 Generalidades del proceso de ensilaje	16

1.6.2 Evaluación de las características de la materia vegetal ensilada	21
2. HIPÓTESIS	23
3. OBJETIVO GENERAL	23
4. MATERIAL Y MÉTODOS	24
4.1 Localización	24
4.1.2 Obtención de sustrato residual de la producción de hongos comestibles	24
4.2 Elaboración de ensilados	25
4.2.1 Análisis de los microsilos	27
4.3 Evaluación de la composición química de los ensilados	28
4.3.1 Determinación de humedad por secado en estufa	28
4.3.2 Determinación de cenizas en seco	30
4.3.3 Determinación de extracto etéreo por el método Soxhlet	31
4.3.4 Determinación del nitrógeno total por método Kjeldahl para calcular el porcentaje de proteína cruda (PC).	33
4.3.5 Determinación de la fibra cruda y sus fracciones.	35
4.3.6 Determinación del extracto libre de nitrógeno (ELN)	37
4.3.7 Determinación de compuestos secundarios	37
4.3.8 Determinación de micotoxinas por Cromatografía de Capa Fina (TLC).	42
4.3.9 Estimación de la digestibilidad <i>in vitro</i> por la técnica de producción de gas	44

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
5.1 Evaluación de las características organolépticas (físicas) de los ensilados realizados con el sustrato agotado de los hongos <i>Pleurotus ostreatus</i> y <i>Lentinula edodes</i> en sus diferentes formulaciones.	47
5.2 Evaluación de las características químicas de los ensilados realizados con el sustrato agotado de los hongos <i>Pleurotus ostreatus</i> y <i>Lentinula edodes</i> en sus diferentes formulaciones.	48
5.3 Caracterización de los metabolitos secundarios de los ensilados	52
5.3.1 Fenoles y taninos totales	52
5.3.2 Saponinas	54
5.4 Evaluación del efecto de los diferentes ensilados sobre el porcentaje de digestibilidad <i>in vitro</i> de la materia seca (DIVMS), cinética de la fermentación, producción de nitrógeno amoniacal y pH.	54
5.5 Evaluación de la presencia de micotoxinas en ensilados de SRH de <i>Lentinula edodes</i> L5 y <i>Pleurotus ostreatus</i> IAP.	59
6. CONCLUSIÓN	60
7. REFERENCIAS	62

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Formulación de sustrato para la obtención de hongos comestibles.	25
Cuadro 2. Formulación de los microsilos.	26
Cuadro 3. Evaluación de características organolépticas de los ensilados	48
Cuadro 4. Composición nutricional de los ensilados.	52
Cuadro 5. Fenoles y taninos totales de los ensilados elaborados con SRH.	53
Cuadro 6. Digestibilidad <i>in vitro</i> , producción de gas, nitrógeno amoniacal y pH de los ensilados elaborados con SRH.	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de flujo para la toma de muestras, determinación de pH y evaluación de las propiedades organolépticas	28
Figura 2. Diagrama de flujo para la determinación del porcentaje de humedad en una muestra.	29
Figura 3. Diagrama de flujo para la determinación del porcentaje de cenizas totales en seco de una muestra.	31
Figura 4. Diagrama de flujo para la determinación del porcentaje de extracto etéreo de una muestra.	32
Figura 5. Diagrama de flujo para la determinación del porcentaje de nitrógeno total de una muestra.	34
Figura 6. Diagrama de flujo para la elaboración del extracto etanólico de una muestra.	38
Figura 7. Diagrama de flujo para la determinación de la presencia de saponinas en ensilados por prueba de espumado (a) y prueba de coloración (b).	39
Figura 8. Diagrama de flujo para la elaboración del extracto de una muestra en acetona al 70 %.	40
Figura 9. Diagrama de flujo para la determinación de compuestos fenólicos totales de una muestra por espectrofotometría.	41
Figura 10. Diagrama de flujo para la determinación de taninos en una muestra.	42
Figura 11. Diagrama de flujo para la extracción de material biológico de una muestra de ensilado utilizando solventes orgánicos.	43
Figura 12. Diagrama de flujo para la determinación de la presencia de micotoxinas en ensilado por la técnica de cromatografía de capa fina.	44
Figura 13. Diagrama de flujo para la determinación de la digestibilidad in vitro de una muestra por la técnica de producción de gas.	46
Figura 14. Resultados de las pruebas de colorimetría y espumado para la detección de saponinas en ensilados de SRH.	54

Figura 15. Resultados de la detección de micotoxinas en .SRH y ensilados de SRH por prueba de cromatografía de capa fina.

59

RESUMEN

El interés por la utilización de los esquilmos agrícola, particularmente el rastrojo de maíz, en la alimentación de los animales ha llevado al desarrollo de estrategias para mejorar las características nutricionales de estos. Una de estas estrategias, es el procesamiento biológico, el cual consiste en el cultivo de hongos de podredumbre blanca, como *Lentinula edodes* y *Pleurotus ostreatus*, que disminuyen el grado de lignificación de los esquilmos. En este estudio se elaboraron 32 microsilos utilizando el sustrato agotado (SRH) de la producción de dichos hongos en combinación con porcentajes crecientes de maíz molido (0 %, 10 %, 20% y 30 %) para evaluar sus características organolépticas, nutricionales (composición química, contenido de metabolitos secundarios), su digestibilidad *in vitro* y posibles riesgos a la salud de los animales derivados de su consumo (micotoxinas).

Los análisis de laboratorio demostraron que los microsilos elaborados con el sustrato residual de la producción de hongo de *Lentinula edodes* en combinación con 30 % de maíz molido tuvieron las mejores características nutricionales y la mayor cantidad de metabolitos secundarios en comparación con cualquiera de los demás ensilados elaborados en el estudio, sin embargo, de manera general, los ensilados elaborados con sustrato residual de la producción de hongos de *Pleurotus ostreatus* mostraron tener las mejores características organolépticas; por lo que, podrían tener un mejor nivel de aceptación y consumo por parte de los animales. Por otro lado, el consumo de ninguno de los ensilados mostro evidencia de ser potencialmente peligroso.

1. INTRODUCCIÓN

1.2 Características nutricionales del rastrojo de maíz empleado en la alimentación animal

El cultivo del maíz produce una gran cantidad de biomasa de la cual solo se recolecta el 50 % en forma de grano, luego de eso, la biomasa residual (hoja, limbo, caña, mazorca y otras partes vegetativas) que se produce de su cultivo oscila entre 20 a 35 toneladas por hectárea (Álvarez *et al.*, 2022).

En México, el maíz es el cereal de mayor producción y demanda, en 2017 su producción alcanzó los 27.7 millones de toneladas con un valor de 100 206 millones de pesos (SIAP, 2018), lo que a su vez generó 16.6 millones de toneladas de residuo de esta cosecha con un valor de 9 597 millones de pesos (SIAP, 2018). Lo anterior sitúa al rastrojo de maíz como el principal residuo de las actividades agrícolas por arriba del rastrojo de sorgo con 3.5 millones y del rastrojo de avena con 9.6 millones de toneladas anuales (SIAP, 2018).

Por su alta disponibilidad y bajo costo, los esquilmos de la producción de maíz son la base alimentaria para el ganado nacional, sobre todo en épocas de escasez de forraje verde, por lo que 85 % del rastrojo de maíz producido en el país, se utiliza para la alimentación de animales (Macedo, 2000).

Al respecto, Fuentes *et al.* (2001) señalan que en México es común la utilización de rastrojo de maíz como alimento para rumiantes a pesar de presentar un escaso valor nutrimental (proteína menor al 5 % de la MS, contenido de fibra neutro detergente 73-75 % y fibra detergente ácido 46-52 %). Debido a esto, por sí mismo no es suficiente para mantener las funciones normales productivas, reproductivas y de trabajo del ganado; además, en la mayoría de los casos, tampoco es posible que los animales puedan mantener su peso corporal. Por tanto, si se usa como única fuente de alimento, normalmente se presentarán pérdidas considerables, aunque

variables, de peso y de condición corporal en el ganado (Salgado, 2011). Estas características están dadas, en gran medida, por la cantidad de pared celular que contiene.

1.3 Estructura de la pared celular vegetal

Una de las características distintivas de las células vegetales es la presencia en ellas de una pared celular que protege su contenido celular (aproximadamente del 35 al 80 % de la materia orgánica de los tejidos vegetales está contenida en la pared celular) la cual proporciona forma y rigidez estructural a la planta, provee el medio para la circulación y distribución del agua, minerales y otras moléculas pequeñas y contiene otras moléculas especializadas que regulan el crecimiento y protegen a la planta de enfermedades (Williams, 2003).

1.3.1 Componentes de la pared celular vegetal

La pared celular está compuesta principalmente por polisacáridos de composición y estructura variable entre los que se destacan la celulosa, hemicelulosa, lignina, ácidos fenólicos, proteínas, iones y agua. La composición y organización de los componentes individuales en la pared controlan su estructura y función (Valenciaga *et al.*, 2004).

- Celulosa: es un polímero de fórmula general $(C_6 H_{10} O_5)_n$ constituido por unidades lineales de glucosa (elementos de D-Glucosa unidos por enlaces β 1-4 glicosídicos). Esta estructura es rígida y altamente insoluble en H_2O . La celulosa es el principal componente estructural de las paredes celulares de las plantas. Los enlaces hidrógeno entre polímeros paralelos forman microfibrillas fuertes que proveen la fuerza y rigidez requerida en las paredes celulares de las plantas (Gardner *et al.*, 1999).
- Hemicelulosa: son carbohidratos estructurales no celulósicos que existen como polímeros lineales y ramificados, en asociación con otros

carbohidratos. La xilosa, mananosa y galactosa, frecuentemente forman su estructura vertebral, mientras que la arabinosa, galactosa y ácidos urónicos están presentes en los lados de la cadena (Kirby *et al.*, 1998).

Las hemicelulosas son polisacáridos matrices que se enlazan junto a las microfibrillas de celulosa y forman enlaces covalentes con la lignina. (Valenciaga *et al.*, 2004).

- Lignina: es un polímero fenólico tridimensional, de estructura muy compleja, constituye el principal polímero natural junto con la celulosa y es responsable de la rigidez de la planta, de la resistencia de los tejidos vasculares, la conducción de solutos, agua y sales minerales necesarias para la supervivencia de la planta, además de la protección contra fenómenos oxidativos y de ataques de parásitos (Barthes, 1992).
- Ácidos Fenólicos: son compuestos fenólicos de pesos moleculares relativamente pequeños que se han aislado de las paredes celulares por extracción con álcali o tratamiento con celulasas, están unidos a los residuos de glucanos y xilanos e incluyen ácido p- coumárico, ácido ferúlico y vainillina. Los ácidos fenólicos constituyen agentes entrecruzadores en los complejos lignina - carbohidratos, e inhiben la utilización de los residuos de carbohidratos asociados a ellos. (Valenciaga *et al.*, 2004).

A diferencia del resto de los componentes de la pared celular la lignina se caracteriza por aumentar su presencia de manera directamente proporcional a la madurez de la matriz vegetal. En general, el contenido de lignina de los forrajes ha sido asociado negativamente con la degradabilidad de la fibra y se cree que está actúa como una barrera física a la degradación microbiana de la fibra en el rumen. En el rastrojo de maíz, la lignina constituye el principal componente de la pared formando una intrincada red de filamentos que se disponen alrededor de la celulosa y hemicelulosa (Rosales *et al.*, 2005).

Todo lo anterior ha dado lugar a investigaciones sobre métodos que permitan mejorar el aporte nutrimental y digestibilidad de los rastrojos, especialmente el de

maíz dada su importancia económica, con el objetivo de facilitar su uso como insumo en la alimentación animal mejorando sus características nutrimentales.

1.4 Estrategias para mejorar las características nutricionales del rastrojo de maíz

Existen métodos para tratar los forrajes fibrosos que permiten incrementar el consumo y la digestibilidad de estos alimentos y por lo tanto incrementar la productividad animal; estos métodos se clasifican en tres grupos: físicos, químicos y biológicos.

Entre los métodos físicos se encuentran el picado y la molienda, los cuales están encaminados a disminuir el tamaño de la partícula para que esta tenga mayor superficie de contacto con la microbiota del rumen, encargada de su fermentación; y la humectación con presión de vapor previa ingestión, que vuelve más disponibles dentro del rumen a los componentes de la pared celular (Rosales *et al.*, 2005).

Los tratamientos químicos involucran el uso de sustancias alcalinas que, en términos generales, actúan a través de la ruptura de las paredes celulares por medio de la solubilización de la hemicelulosa y la hidrólisis de los ésteres de ácidos urónicos y acéticos, aumentando la tasa de digestión ruminal de la celulosa al sufrir un aumento en sus dimensiones y exponer mayor superficie al ataque de los microorganismos del rumen (Klopfenstein, 1980). Al tratar el rastrojo con estas sustancias, se realiza una predigestión, por lo que, se aprovecha de un modo más eficiente y con un costo menor de producción, ya que estos alimentos no son caros y las técnicas y materiales utilizados son sencillos (Fuentes *et al.*, 2001).

Finalmente, los procesamientos biológicos que consisten en la adición de cultivos microbianos y enzimas fibrolíticas exógenas (aisladas de cultivos de hongos y bacterias), como celulasas y xilanasas donde el modelo de acción más probable para explicar los efectos benéficos de la adición de enzimas, es que éstas trabajan

sinérgicamente con el microbiota del rumen (Krause *et al.*, 2003). Estas enzimas aplicadas a los forrajes antes de una incubación *in vitro* mejoraron la digestión de la materia seca y la fibra detergente neutra (Feng *et al.*, 1996), sin embargo, la producción y aislamiento de grandes cantidades de estas enzimas es muy costosa y requiere de mucha mano de obra y equipo especializado, por lo que, una alternativa para disminuir costos es obtenerlas de subproductos agroindustriales a partir de hongos filamentosos aislados de los mismos residuos (Machado *et al.*, 2020).

En este sentido, el estudio de los hongos de pudrición blanca (pertenecientes al filo *Basidiomycota*) como otro método de procesamiento biológico del rastrojo de maíz ha ido en aumento debido a su capacidad de producir exoenzimas que degradan eficientemente la celulosa, hemicelulosa y lignina, componentes principales de la pared celular del rastrojo de maíz, en compuestos de bajo peso molecular mejorando su calidad y digestibilidad (Fuentes *et al.*, 2001; Machado *et al.*, 2020).

1.5 Características generales de los hongos basidiomicetos

Alrededor de 70,000 especies de hongos han sido descritas, sin embargo, se estima que pueden existir alrededor de 1.5 millones de especies (Hawksworth *et al.*, 1995); todos ellas heterótrofas, es decir, requieren materia orgánica preformada que utilizan como fuente de carbono y energía para la síntesis de estructuras celulares (Candia-Sánchez *et al.*, 2017).

Los hongos pueden reproducirse por esporas o por medio de la ramificación de estructuras tubulares y arborescentes llamadas hifas (estructura cilíndrica que consta de una pared celular que recubre a una membrana en cuyo interior pueden existir uno o varios núcleos) que crecen por extensión apical o de las puntas y que se multiplican por ramificación; al conjunto de hifas ramificadas de los hongos se le conoce como micelio, mismo que puede encontrarse en forma monocariótica (un solo núcleo) o dicariótica (dos núcleos). En los extremos de estas células es donde

se lleva a cabo la asimilación de nutrientes del medio y la excreción de las hidrolasas (enzimas extracelulares) necesarias para la degradación de una gran variedad de substratos complejos (Herrera *et al.*, 1990; Alexopoulos *et al.*, 1996).

Los hongos *Basidiomycotina* (Hibbett *et al.*, 2007) constituyen un grupo que reúne más de 30 mil especies (Kirk *et al.*, 2001) consideradas superiores por su complejidad morfológica y la presencia de basidios, células donde se producen externamente esporas sexuales (basidiosporas) tras la cariogamia y la meiosis, característica principal que define su identificación y clasificación taxonómica (Candia-Sánchez *et al.*, 2017).

Bajo condiciones ambientales específicas, el micelio dicariótico de estos hongos comienza a formar estructuras reproductoras denominadas cuerpos fructíferos (también llamados carpóforos, esporóforos o basidiocarpos). En el cuerpo fructífero, el estípite o pie y el característico píleo o sombrero están conformados por micelio ramificado; en la parte inferior del píleo se encuentran las laminillas, mismas que constituyen el himenio, lugar donde se forman y se liberan las esporas una vez que el cuerpo fructífero ha madurado (Candia-Sánchez *et al.*, 2017).

Aunque comúnmente se emplea el término saprófito para describir hongos que se alimentan de materia muerta (Kirk *et al.*, 2001), los basidiomicetos destacan por su importancia crucial en la naturaleza, ya que algunos de ellos como por ejemplo *Lentinus hirtus*, *Schizophyllum commune*, *Trametes versicolor* y *Pleurotus* spp (Agrios, 2005) son los principales descomponedores de materia orgánica mediante la producción de enzimas modificadoras de la lignina, como las lignina peroxidasa, las manganeso peroxidasa y lacasas (Rayner *et al.*, 1988). La acción de estas permite la degradación de biopolímeros tales como la celulosa, hemicelulosa y lignina lo que servirá de nutrientes para los hongos (Moore-Landecker, 1996).

1.1 Panorama de la producción de esquilmos agrícolas, usos e importancia en la alimentación animal

Los esquilmos agrícolas (también llamados residuos de cosecha, pajas, zacate, pastura y rastrojos) son subproductos derivados de las actividades agrícolas y se les considera como la porción del cultivo cosechado (hojas, tallos, espigas y brácteas de la mazorca) que queda después de extraer el grano (Reyes *et al.*, 2013).

En México, la mayor cantidad de rastrojos se obtiene del cultivo de granos de cereales (Sánchez *et al.*, 2012; SIAP, 2012), principalmente de la producción de maíz, sorgo, trigo y cebada; y se asocia directamente con la superficie que se destina para su cultivo (Borja *et al.*, 2016), por lo que, a medida que aumenta la demanda para satisfacer las necesidades alimenticias de la población, también se incrementa la disponibilidad de estos residuos (Macedo, 2000).

Se estima que por cada kilogramo de grano de maíz cosechado se obtiene un kilogramo de rastrojo (Infante *et al.*, 2016) y que a la par de la creciente producción de residuos agrícolas, su aprovechamiento también incrementará (Wortmann *et al.*, 2012). Esta última tendencia se explica por la utilización de los esquilmos agrícolas en diversas actividades, entre ellas, la búsqueda de nuevas fuentes energéticas alternativas y renovables (Núñez, 2012), la elaboración de compostas y recientemente su empleo como sustratos en la producción de hongos comestibles (Piña-Guzmán *et al.*, 2016).

Según diversos autores (Alapin, 2008; Correa, 2008; Eyhorn *et al.*, 2002), los rastrojos tienen dos usos fundamentales; por un lado, son una fuente importante de cobertura del suelo en la agricultura regulando su humedad y temperatura, amortiguando la erosión hídrica, controlando la maleza y aportando materia orgánica (MO) y nutrientes al suelo (Eyhorn *et al.*, 2002); por otro lado, en conjunto constituyen uno de los insumos más importantes para la alimentación de rumiantes por su abundancia y accesibilidad (Correa, 2008).

Al respecto, dentro de la ganadería mexicana los rastrojos cobran gran importancia ya que tienen la función de satisfacer la demanda de forraje para la alimentación del ganado (Gómez *et al.*, 2008), representando el 24 % de la materia seca (MS) disponible para la alimentación animal cuyo consumo se estima en 43.3 millones de toneladas anuales. En México, la producción de residuos derivados particularmente del maíz, sorgo, trigo y cebada cubren 21 % de la MS requerida por los rumiantes (vacas, ovejas y cabras) y, por lo tanto, 86.6 % del consumo de rastrojos en la ganadería nacional (SIACON-SIAP, 2012).

La utilización de rastrojos en la alimentación de ganado se mantiene por ser una fuente de energía en la dieta del ganado a precio accesible (Macedo, 2000; Villegas *et al.*, 2001) y por su alta disponibilidad en la época de estiaje; además, su uso en la alimentación de rumiantes ha incrementado en los últimos años en el ámbito mundial a medida que la disponibilidad de granos se reduce (Fuentes *et al.*, 2001).

1.5.1 Efecto del complejo de enzimas lignocelulósicas de los hongos de podredumbre blanca sobre la pared celular del rastrojo de maíz

Los hongos basidiomicetos se clasifican en hongos de la pudrición blanda, que degradan parcialmente la lignina para ganar acceso a la celulosa (Kirk *et al.*, 1987), y hongos de la pudrición blanca, que la descomponen completamente (Tuomela *et al.*, 2000). En este proceso intervienen enzimas, comúnmente conocidas como “modificadoras de la lignina”, las cuales son producto del metabolismo secundario de los hongos bajo un proceso estrictamente aerobio y sintetizadas en respuesta a factores estresantes y carencias nutricionales (Ortiz, 2009).

Los hongos de la podredumbre blanca, conocidos así ya que al remover la lignina dejan un residuo color blanquecino (Levin *et al.*, 2006), constituyen el grupo más importante dentro de los basidiomicetos gracias a que producen enzimas ligninolíticas extracelulares (Hamme, 1996). Estos hongos son considerados

agentes primarios de descomposición porque son capaces de utilizar los desechos agrícolas en su forma original, es decir, sin que hayan sido sujetos previamente a algún proceso de degradación bioquímico o microbiológico (Sánchez, 2010).

Existen dos tipos de sistemas enzimáticos extracelulares: hidrolasas que degradan la celulosa (celulasas) y la hemicelulosa (hemicelulasas), y oxidoreductasas que degradan la lignina (lignino peroxidasa (LiP), manganeso peroxidasa (MnP), lacasa, oxidasa y xilanasa), las cuales poseen una potente capacidad oxidante (Hammel, 1996).

En la degradación enzimática de la lignina intervienen una serie de reacciones inespecíficas que originan la formación de radicales libres en el biopolímero y dan como resultado la desestabilización de los enlaces y finalmente la ruptura de la macromolécula (Barr, 1994), dando como resultado CO₂ y agua.

Los residuos agroindustriales utilizados para el cultivo y producción de hongos comestibles proveen las fuentes de carbono, nitrógeno, azufre y fósforo necesarias para el desarrollo adecuado de la biomasa fúngica (Rizki, 2011). Presumiblemente, el objetivo metabólico de la degradación de lignina por este grupo de hongos sería acceder a la celulosa y hemicelulosa, las cuales representan su fuente de carbono y energía (ten Have *et al.*, 2001).

Además, debido a la baja especificidad de la actividad enzimática y a la fuerte capacidad oxidativa del sistema de degradación ligninolítica, los hongos de la pudrición blanca pueden degradar un amplio conjunto de compuestos similares a los que presenta la lignina, tales como los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA) (Collins *et al.*, 1997), 2,4,6- trinitrotolueno (TNT) (Wariishi *et al.*, 1992), dioxinas, 1,1,1-trichloro-2,2-bis (4- chlorophenyl) ethane (DDT), cloroanilinas y colorantes (Field *et al.* 1992).

El material lignocelulósico que resta luego de la cosecha del hongo y que ha sido biotransformado por el crecimiento del micelio y producción del carpóforo se conoce como sustrato residual de hongo (SRH) o sustrato agotado de hongo (SAH) (Postemsky, 2016). Algunas de las características de este residuo son el aumento significativo en el contenido de cenizas, proteína bruta, aminoácidos, reducción de celulosa, hemicelulosa y lignina y aumento de la digestibilidad *in vitro* en comparación con sustrato de maíz sin inocular (Orozco, 2019); dichas características abren una brecha para su posible uso en la alimentación animal.

1.5.2 Síntesis de Metabolitos Secundarios (Ms) de los hongos de podredumbre blanca a partir de lignina

El metabolismo primario de plantas, bacterias u hongos puede definirse de manera general como todos los procesos de utilización y transferencia de masa y energía encaminados a la síntesis de compuestos esenciales (proteínas, glúcidos, ácidos nucleicos, etc.), también conocidos como compuestos primarios o metabolitos primarios, son de presencia universal en todas las especies y permiten llevar a cabo funciones de primer orden como el desarrollo, crecimiento y reproducción de los organismos (Banda, 2010; Kuzhuppillymyal-Prabhakarankutty *et al.*, 2023).

Por otro lado, el metabolismo secundario de estos organismos les permite producir y acumular una amplia variedad de compuestos químicos que no son indispensables para la vida pero que juegan un papel fundamental en la adaptación al estrés ambiental y en la defensa contra predadores y patógenos (Valares-Masa, 2011). También se pueden encontrar actuando como precursores de moléculas esenciales para el funcionamiento de las vías metabólicas primarias razón por la cual el metabolismo primario y el secundario están estrechamente relacionados. A los compuestos que resultan de este proceso se les denomina compuestos secundarios, Ms, metabolitos especializados o bien fitoquímicos (Sánchez, 2022). Los Ms son compuestos bioactivos de bajo peso molecular, con una amplia diversidad química, de estructura compleja y única (Scossa *et al.*, 2020). Su síntesis

es inducida en condiciones de estrés por factores bióticos y abióticos y a diferencia de los compuestos primarios, los Ms se encuentran en muy bajas concentraciones, esto es, menos del 1 % del peso en base seca (Bourgaud *et al.*, 2001). Su concentración depende de las condiciones ambientales de su desarrollo y de su phylo ya que cada especie de planta u hongos tiene su “set” característico de compuestos, es decir, son especie-específicos y como regla, un grupo particular de metabolitos secundarios predomina dentro de un taxón determinado (Fang *et al.*, 2019).

Estos metabolitos especializados son clasificados normalmente a partir de su vía biosintética y de manera general se consideran tres grandes familias (Bourgaud *et al.*, 2001): terpenoides, compuestos que contienen nitrógeno y compuestos fenólicos.

Los compuestos fenólicos (fenoles o CF) son los metabolitos secundarios más numerosos y con mayor distribución en el reino vegetal. Se caracterizan por contener al menos un anillo aromático (C₆, fenólico) en su estructura química, con por lo menos un grupo hidroxilo unido. El término ‘polifenoles’ se emplea para definir a aquellos compuestos con más de un anillo fenólico (Durazzo *et al.*, 2019).

La clasificación más aceptada de los compuestos fenólicos los divide en dos grandes grupos: polifenoles flavonoides y polifenoles no flavonoides. Los polifenoles flavonoides (el grupo más amplio de polifenoles) incluyen: antocianidinas, flavanoles, flavanonas, flavonoles, flavonas e isoflavonas. En cambio, los polifenoles no flavonoides incluyen: ácidos fenólicos o fenolcarboxílicos (fenilpropanoides), curcuminoides, cumarinas, cromonas, xantonas, estilbenos, lignanos y taninos (Durazzo *et al.*, 2019).

A nivel orgánico los CF influyen, entre otras cosas, en procesos de regulación transcripcional, síntesis de proteínas, actividad enzimática y reducción de especies reactivas de oxígeno (actividad antioxidante) (Martin, 2018).

Los metabolitos secundarios son fundamentales para numerosas ramas de la industria. De manera general, son empleados como insecticidas saborizantes, tintes y colorantes, fragancias, productos alimenticios y complementos nutritivos, fármacos e inclusive como combustibles (Tetali, 2019).

1.5.3 La importancia de los compuestos fenólicos en la alimentación animal

Ya que no todos los desechos agroindustriales presentan altos valores nutricionales y una considerable cantidad de compuestos fenólicos y bioactivos (Correddu *et al.*, 2020)., el uso en la alimentación animal de estos materiales representa la mejor y más sencilla forma de aprovecharlos nuevamente.

Se ha observado que los CF, incluidos en niveles bajos o moderados en la dieta de rumiantes, tienen efectos positivos en el metabolismo ruminal, en su estado de salud, su desempeño productivo y la calidad de los productos derivados, aun cuando de manera general el consumo voluntario y el coeficiente de digestibilidad se pueden ver disminuidos por su presencia (Gheshlagh *et al.*, 2021).

Los principales efectos de la presencia de compuestos fenólicos en la dieta se observan en la calidad del perfil de ácidos grasos, actividad antioxidante de la leche y la sangre, reducción de amoníaco en rumen y consecuentemente disminución de urea en leche y sangre. Otros de los efectos en la salud de los animales que se han evidenciado son la reducción de parásitos intestinales en ovejas, el aumento de peso corporal, mejora en la respuesta inmune mediada por células, reducción de procesos inflamatorios y mejora en el estado antioxidante de los animales (Correddu *et al.*, 2020; Gheshlagh *et al.*, 2021).

Se debe tener en cuenta que los efectos benéficos esperados del uso de residuos agroindustriales ricos en compuestos fenólicos pueden no siempre ser observados dado que su uso es poco eficaz debido a la falta de información sobre su valoración

(composición nutricional, estabilidad y durabilidad), estrategias de conservación, uso e implementación en dietas para la alimentación de rumiantes (Meneses *et al.*, 2007). Un residuo agroindustrial que no ha sido estudiado a fondo es el obtenido de la producción de hongos comestibles, el cual tiene un alto valor nutricional Lorenzana *et al.* (2023)

1.5.4 Producción de hongos cultivados en México

Entre los hongos de pudrición blanca que son capaces de utilizar el rastrojo de maíz como matriz sólida para su desarrollo y que han demostrado tener los efectos antes mencionados sobre el sustrato se encuentran *Pleurotus ostreatus* y *Lentinula edodes*, especies comestibles que se cultivan a escala comercial en casi todas las regiones del mundo (Andrade *et al.*, 2012).

En México, la producción nacional actual de hongos cultivados se estima en más de 55 mil toneladas, lo que lo ubica al país como el primer productor en América Latina de hongos comestibles al generar el 80.8 % de la producción; a nivel internacional, ocupa el décimo tercer lugar de los países productores (INECOL, 2017).

Se estima que se producen cinco kilogramos de residuos por cada kilogramo de hongos cultivados (Correa *et al.*, 2016). Tal cantidad de SRH impone la necesidad de la aplicación de un método de conservación del sustrato que permita su almacenamiento al tiempo que ofrezca una alternativa viable de consumo en la alimentación animal.

1.6 El ensilaje como método de conservación, almacenaje y alternativa de consumo del sustrato residual de la producción de hongos de podredumbre blanca en la alimentación animal

Los hongos de podredumbre blanca tienen la capacidad de desarrollarse sobre una gran variedad de residuos lignocelulósicos mediante fermentación en fase sólida,

sin embargo, uno de los problemas con este proceso es que estimula el crecimiento de bacterias y hongos de la pudrición (Reyes, 2013), lo que deteriora el producto resultante. Para corregirlo, estudios dirigidos a la implementación de estas tecnologías por los productores han sugerido hacerlo en dos etapas, combinando el proceso de fermentación al estado sólido con el proceso de ensilaje (Rosales *et al.*, 2005).

El proceso de ensilaje puede definirse como la fermentación de los carbohidratos solubles en los forrajes y se logra por medio de una fermentación láctica espontánea en condiciones anaeróbicas. Las bacterias epifíticas de ácido láctico fermentan los carbohidratos hidrosolubles del forraje produciendo ácido láctico y en menor cantidad, ácido acético. Al generar estos ácidos el pH del material ensilado baja a un nivel que inhibe la presencia de microorganismos que inducen la putrefacción (Garcés, 2004).

El producto final del proceso es conocido como ensilado y se refiere al material vegetal después de haber sido sometido a dicha fermentación ácida controlada dentro de un espacio llamado silo (Valencia, 2011). La conservación durante el proceso de ensilaje se realiza por la alta acidez obtenida (bajo pH) y por las condiciones anaeróbicas de la masa forrajera (Rees, 1997).

La fermentación ácida es una reacción de oxidación-reducción balanceada internamente, en la cual algunos átomos de la fuente de energía quedan reducidos y otros quedan oxidados. Solamente una pequeña cantidad de energía se libera durante la fermentación de la glucosa, la mayor parte de la energía permanece en el producto de fermentación reducido. La energía liberada en la fermentación de la glucosa a ácido láctico se conserva por fosforilaciones a nivel de sustrato en forma de enlaces fosfato de alta energía en el ATP (Garcés, 2004).

1.6.1 Generalidades del proceso de ensilaje

De manera general, el proceso se puede dividir en 4 etapas (Merry *et al.*, 1997):

1. Fase aeróbica.

El oxígeno atmosférico presente en la masa vegetal disminuye rápidamente debido a la respiración de los microorganismos aerobios y aerobios facultativos como las levaduras y enterobacterias (Garcés, 2004).

En esta actividad aeróbica y por acción de enzimas vegetales los azúcares son convertidos en dióxido de carbono, agua y calor, mientras que los carbohidratos de reserva y la hemicelulosa son transformados en azúcares, actividades que permiten prolongar la respiración celular (Muck, 1996).

Los procesos de oxidación reducen el nivel de oxígeno en la masa forrajera lo que causa lisis celular con liberación de proteasas, esto provoca el aumento de los niveles de nitrógeno no proteico a expensas de la proteína (Muck, 1996), además, a la par puede existir degradación parcial de azúcares solubles (Jiménez *et al.*, 2022).

Por lo anterior, procesos ineficientes de transporte y llenado del silo originan prolongadas fases aeróbicas (por arriba de las 5 horas), las cuales se acompañan de elevación de temperatura del forraje (daño por calor), e incremento de proteólisis, con elevadas pérdidas de energía y materia seca (Matta, 2005), lo que reduce el valor nutritivo del ensilado y genera compuestos tóxicos como aminas biogénicas y ácidos grasos de cadena múltiple (Jiménez *et al.*, 2022).

El tiempo óptimo de duración de la fase de respiración dependerá de la eficiencia del sellado del mismo y de la compactación del forraje (Duthil, 1980).

2. Fase de fermentación.

Se inicia al producirse un ambiente anaerobio. Generalmente esta fase tiene una duración que puede variar entre 10 y 25 días (Sánchez, 2002) dependiendo de las características del material ensilado y de las condiciones ambientales en el momento del ensilaje (Jiménez *et al.*, 2022).

Los cambios químicos que se presentan en la masa forrajera durante la fase anaeróbica del proceso son originados por microorganismos, los cuales pueden originar tres tipos de fermentación anaeróbica: acética, láctica y butírica, siendo láctica la fermentación ideal para el proceso de ensilaje (Matta, 2005). Sin embargo, algunas especies también producen ácido acético y etanol durante la fermentación, razón por la cual se clasifican en dos grupos: heterofermentativas y homofermentativas (Muck, 1996).

Una vez eliminado el oxígeno de la masa forrajera las bacterias heterofermentativas inician su multiplicación, convirtiendo los azúcares simples en ácidos orgánicos principalmente acético y láctico. El crecimiento y multiplicación de estas bacterias continúa hasta que el pH desciende a valores cercanos a 5 (Matta, 2005).

Los principales géneros de bacterias ácido-lácticas responsables de la fermentación en ensilajes son: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* y *Leuconostoc* (Muck, 1996), siendo sus características fundamentales fermentar azúcares hasta ácido láctico y ser todos ellos aeróbicos facultativos, pero con cierta preferencia por la condición anaerobia. La fermentación láctica que realizan los microorganismos da un valor agregado a los productos vegetales porque mejora su digestibilidad y palatabilidad (Garcés, 2004).

Cuando no se alcanza rápidamente un pH bajo (menor a 5 en las primeras 48 horas), se desarrollan microorganismos putrefactivos, principalmente los del género *Clostridium*. Estos atacan las proteínas y otros componentes

celulares, produciendo ácido butírico, así como diferentes aminas y sustancias tóxicas; por lo que, el contenido de ácido butírico en el ensilado es un indicador importante de la degeneración de la proteína del forraje (Jiménez *et al.*, 2022).

3. Fase estable

A pH igual o inferior a 5 las bacterias lácticas se constituyen en los microorganismos predominantes transformando azúcares en ácido láctico, cuyo nivel incrementa hasta inhibir el crecimiento microbiano (Matta, 2005). Una vez agotado su sustrato, la mayoría de estos microorganismos reducen su actividad; es entonces cuando el proceso se interrumpe y estabiliza completando la fase de fermentación (Jiménez *et al.*, 2022).

Algunas bacterias indeseables en esta etapa son las bacterias acidófilas, y ácido tolerantes ya que pueden iniciar una deterioración aeróbica, oxidando el lactato y el acetato y produciendo CO₂ y agua, aunque pueden permanecer también en estado inactivo; al mismo tiempo algunos otros microorganismos, como clostridios y bacilos, pueden sobrevivir como esporas (Silveira, 2006).

En este momento, se considera que el forraje ha sido fermentado y su calidad se mantendrá estable mientras continúe la ausencia de oxígeno.

4. Fase de deterioro aeróbico

Ocurre en todos los ensilajes al ser abiertos y expuestos al aire para su empleo, pero puede ocurrir antes por daño de la cobertura del silo (Jiménez *et al.*, 2022).

El período de deterioro puede dividirse en dos etapas:

- a) Se debe al inicio de la degradación de los ácidos orgánicos que conservan el ensilaje por acción de levaduras y ocasionalmente

bacterias que producen ácido acético, lo que aumenta el valor del pH (Silveira, 2006).

- b) Al aumento del valor del pH se le agrega un aumento de la temperatura, lo que desencadena el inicio de la actividad de microorganismos que deterioran el ensilaje (bacilos, mohos y levaduras) que pueden ocasionar pérdidas graves de materia orgánica (Silveira, 2006).

Los mohos son organismos aerobios que se desarrollan en cualquier sitio del ensilado que se encuentre en contacto con oxígeno, incluso con una buena técnica de ensilaje, es común que ocurra sobre la capa exterior del material ensilado al inicio del almacenamiento; en caso de un deficiente manejo del ensilado, el moho puede invadir toda la masa vegetal almacenada (Oude *et al.*, 2023). Las especies que se presentan frecuentemente pertenecen a los géneros *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Mucor* y *Trichoderma*. (Nout *et al.*, 1993).

Los mohos no sólo disminuyen el valor nutritivo y la palatabilidad del ensilaje, sino que también son un riesgo para la salud de los animales y las personas (Oude *et al.*, 2023). Algunos problemas de salud asociados con los mohos se relacionan con las micotoxinas (Auerbach, 1998) y dependiendo de la cantidad y tipo presente los problemas de salud pueden variar desde ligeras molestias digestivas y problemas de fertilidad hasta daños serios al hígado o a los riñones. Algunas especies de hongos que producen micotoxinas son: *Aspergillus fumigatus* y *Penicillium roqueforti*. Está confirmado que la aflatoxina B1, una micotoxina de *Aspergillus flavus*, puede ser transferida del ensilaje a la leche (Scudamore *et al.*, 1998).

Todavía existen muchas dudas sobre cuáles son las condiciones bajo las que se producen las micotoxinas en el ensilaje. No todos los ensilajes fuertemente infestados por mohos tienen forzosamente una gran cantidad de

micotoxinas, y no todos los tipos de micotoxinas que pueden producir los mohos se encuentran necesariamente en un ensilaje infestado (Nout *et al.*, 1993).

Como ya se mencionó anteriormente, la fermentación bacteriana que se busca durante el proceso de ensilaje es la fermentación láctica ya que esta permite el aprovechamiento sin pérdidas importantes de una mayor cantidad de nutrientes del material ensilado dando como resultado ácido láctico (Jiménez *et al.*, 2022). Las bacterias lácticas pueden asimilar sustancias orgánicas como aminoácidos, péptidos y polipéptidos, y sustancias inorgánicas como sales de amoníaco, si bien algunas bacterias ácido-lácticas desdoblan las proteínas hasta aminoácidos, ninguna las degrada nunca hasta amoníaco. Al respecto, la acidez del sustrato es importante para que cesen todos los procesos vitales y no se desarrollen las bacterias de la fermentación acética o butírica que provocan la pérdida de gran parte de las proteínas y de los aminoácidos, así como del valor energético (Silveira, 2006).

La fermentación butírica es una fermentación indeseable que perjudica la calidad del ensilado. Los productos finales de esta fermentación son los ácidos acéticos, propiónico, fórmico y algunos ácidos volátiles. Una especie patógena de los animales y el hombre es *Clostridium botulinum*, que sintetiza potentes exotoxinas es la más representativa de este grupo (Valencia, 2011).

La fermentación acética se considera como parte normal del proceso de un ensilado de buena calidad siempre que se produzca en un tiempo limitado, su duración prolongada es considerada indeseable ya que las bacterias lácticas competirán con las de este grupo (bacterias lácticas heterofermentativas, ej. *Acetobacter*) por sustrato, lo que podría reducir el número de bacterias lácticas homofermentativas, poniendo en riesgo el resto del proceso (Jiménez *et al.*, 2022).

1.6.2 Evaluación de las características de la materia vegetal ensilada

Posterior al proceso de ensilaje y preferentemente previo a ofrecer el ensilado como alimento a los animales, es necesario realizar una evaluación del material vegetal con la finalidad de conocer su calidad.

La calidad del forraje puede definirse por el potencial que tiene de producir la respuesta deseada en el animal; entre los factores que pueden determinarla se encuentran el contenido de nutrientes, la digestibilidad, la palatabilidad, el nivel de consumo y la ausencia de factores antinutricionales o potencialmente tóxicos (Ball *et al.*, 2001).

Por otro lado, el proceso de ensilaje en su totalidad también es susceptible de evaluación a partir de los metabolitos de fermentación de la materia vegetal contenidos en el ensilado y de sus características organolépticas (Ledezma, 2018).

1.6.2.1 Evaluación química del ensilado.

La evaluación química engloba una serie de pruebas a nivel de laboratorio encaminadas a conocer el contenido de nutrientes. De forma general, estas pruebas incluyen la estimación de la materia seca, contenido de proteína cruda, lípidos (extracto etéreo), elementos libres de nitrógeno, cenizas y fibra cruda (Ball *et al.*, 2001).

Si bien estas determinaciones son de gran utilidad para caracterizar los alimentos, en el caso de los forrajes (frescos o conservados) conocer las características nutricionales particulares de la pared vegetal es de suma importancia para evitar una sobreestimación de su aporte nutricional, por lo que, a las determinaciones mencionadas debe agregarse la estimación de la fibra detergente neutro, fibra detergente ácido y el contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina (Waldron *et al.*, 2003). A las pruebas anteriores también podría sumarse la determinación del grado

de digestibilidad de la materia vegetal que aporta información sobre el potencial nutritivo del ensilado (Ball *et al.*, 2001).

Los cultivos bacteriológicos y pruebas toxicológicas (análisis microbiológicos) descartan la presencia de agentes o compuestos potencialmente tóxicos, sin embargo, no se consideran pruebas de rutina. A pesar de ello, es altamente recomendable realizarlas para prevenir intoxicaciones o enfermedades dentro del hato asociadas al consumo de ensilado.

Por otro lado, los metabolitos de fermentación más comúnmente usados para determinar la calidad del proceso de ensilaje son el pH, el ácido láctico y los ácidos grasos volátiles totales (Ledezma, 2018); todos ellos en conjunto ofrecen un cuadro muy completo del patrón de fermentación y consecuentemente de la calidad del proceso y su producto final.

1.6.2.2 Evaluación física (organoléptica) del ensilado.

El patrón de fermentación del material ensilado imparte al producto final características especiales de humedad, olor, color y consistencia (parámetros organolépticos) susceptibles de ser evaluadas, mismas que a nivel de campo constituyen la principal herramienta para determinar, aunque de manera muy subjetiva, la calidad, probable nivel de consumo y posibles riesgos de su inclusión en la dieta animal (Chaverra, 2000).

2. HIPÓTESIS

La elaboración de ensilados a partir del sustrato agotado de la producción de hongos de podredumbre blanca (*Lentinula edodes L5* y *Pleurotus ostreatus IAP*) permitirá la conservación de las características nutricionales de los residuos y su aprovechamiento en la alimentación animal.

3. OBJETIVO GENERAL

Identificar y caracterizar la formulación con mejores características fisicoquímicas y organolépticas para la elaboración de ensilado a partir del sustrato agotado de rastrojo de maíz empleado para la producción de hongos de podredumbre blanca (*Lentinula edodes L5* y *Pleurotus ostreatus IAP*).

Objetivos específicos

- Evaluar las características organolépticas (físicas) de los ensilados realizados con el sustrato agotado de los hongos *Lentinula edodes L5* y *Pleurotus ostreatus IAP* en sus diferentes formulaciones.
- Evaluar las características químicas de los ensilados realizados con el sustrato agotado de los hongos *Lentinula edodes L5* y *Pleurotus ostreatus IAP* en sus diferentes formulaciones.
- Caracterizar los compuestos fenólicos totales de los ensilados.
- Evaluar el efecto de los diferentes ensilados sobre la fermentación ruminal *in vitro*.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

El protocolo empleado en el presente estudio fue revisado y aprobado por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales (CICUA) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México con el número 711.

4.1 Localización

Los análisis químicos se realizaron en el Laboratorio de Bromatología II del Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica (FMVZ-UNAM). El estudio de digestibilidad *in vitro* se llevó a cabo en el Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Sanidad Animal (CEPIPSA, FMVZ-UNAM) ubicado en San Miguel Topilejo en la alcaldía Tlalpan, Ciudad de México, con una altitud de 2283 msnm y una temperatura promedio de 17.6°C

4.1.2 Obtención de sustrato residual de la producción de hongos comestibles

El sustrato residual de la producción de hongos comestibles (SRH) se obtuvo en el laboratorio 324 del conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM. Los SRH empleados en el presente estudio se utilizaron para la producción de hongos *Lentinula edodes L5* y *Pleurotus ostreatus IAP*. En el Cuadro 1 se presenta la formulación para la obtención de los sustratos residuales de hongos empleados para este estudio.

Cuadro 1. Formulación de sustrato para la obtención de hongos comestibles.

Ingredientes	Composición de sustrato (%) BS
Rastrojo de maíz	80
Sorgo molido	6
Salvado de trigo	4
Gluten de maíz	5
CaCO ₃	4
CaSO ₄	1
Total	100

4.2 Elaboración de ensilados

El SRH se transportó al Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Sanidad Animal (CEPIPSA, FMVZ-UNAM), donde se elaboraron los microsilos experimentales empleando SRH de *Lentinula edodes* L5 y *Pleurotus ostreatus* IAP dispuestos en cuatro formulaciones con cuatro repeticiones para cada una de las cepas. En el Cuadro 2 se muestra la formulación de los microsilos.

Cuadro 2. Formulación de los microsilos.

Tratamiento	SRH	SRH	Maíz amarillo
	L5	IAP	molido
% de inclusión			
1	100		0
2	90		10
3	80		20
4	70		30
5		100	0
6		90	10
7		80	20
8		70	30

Los microsilos se elaboraron en frascos de plástico opacos con capacidad de 2 litros cada uno, con tapa de rosca hermética y se mantuvieron a la sombra en un lugar seco a temperatura ambiente por 35 días, cada bote fue identificado con la fecha de elaboración, cepa, tratamiento y repetición correspondiente. La elaboración de todos los microsilos respondió a la metodología propuesta en el Manual de Prácticas de Producción y Aprovechamiento de Forrajes del Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica (UNAM) que se describe a continuación:

1. Estandarización del tamaño del SRH a menos de 2.5 cm y contenido de humedad entre el 60-70 % aplicando la prueba de presión.
2. Homogeneización de todo el SRH y grano de maíz molido según el tratamiento.

3. Llenado del frasco con el material a una décima parte de su capacidad para luego compactarlo con un apisonador eliminando así la mayor cantidad de aire del material y repitiendo este paso hasta dejar solo 2 cm de distancia entre el SRH y el tope del frasco.
4. Colocación de la tapa y sellado del frasco con cinta y silicón para evitar la entrada de aire.

4.2.1 Análisis de los microsilos

Las características organolépticas y el pH de todos los microsilos fueron evaluados al momento de abrirse. Posteriormente a esta evaluación se obtuvieron las muestras necesarias para el análisis de las determinaciones correspondientes a la composición química del ensilado, mismas que se llevaron a cabo en el Laboratorio de Bromatología, Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. El análisis químico contempló la determinación de humedad, cenizas, nitrógeno total, extracto etéreo, extracto libre de nitrógeno, fibra detergente neutro, fibra detergente ácido, celulosa, hemicelulosa, lignina, compuestos fenólicos totales, taninos, saponinas, concentración de ácido láctico, presencia de micotoxinas y digestibilidad *in vitro*.

4.2.1.1 Evaluación del pH y las características organolépticas

Fundamento

El patrón de fermentación del material ensilado imparte al producto final características especiales de color, olor y textura, las cuales sirven como indicador de calidad y de un nivel probable de consumo (Chaverra, 2000).

La medición de pH se realizó de acuerdo al método de Tejeda Hernández (1983).

Para la evaluación de las propiedades organolépticas de los ensilados de SRH se utilizó la metodología propuesta por el Departamento de Nutrición Animal y

Bromatología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, en el Manual de Prácticas de Producción y Aprovechamiento de Forrajes (2017) con ligeras modificaciones (Diagrama de Flujo 1); la humedad por su parte fue evaluada a nivel de laboratorio. A cada parámetro le fue otorgado un valor numérico y con base en ello una calificación final a cada ensilado.



Figura 1. Diagrama de flujo para la toma de muestras, determinación de pH y evaluación de las propiedades organolépticas

4.3 Evaluación de la composición química de los ensilados

4.3.1 Determinación de humedad por secado en estufa

Fundamento

Este método se basa en la pérdida de peso de la muestra por evaporación del agua libre durante el proceso (Nollet, 1996). Es indispensable conocer el porcentaje de

humedad de la muestra para poder dar un valor real a la cantidad presente de los nutrientes en la muestra (A.O.A.C, 2015).

A continuación, se resume el procedimiento en forma de diagrama de flujo para obtener el % de humedad.

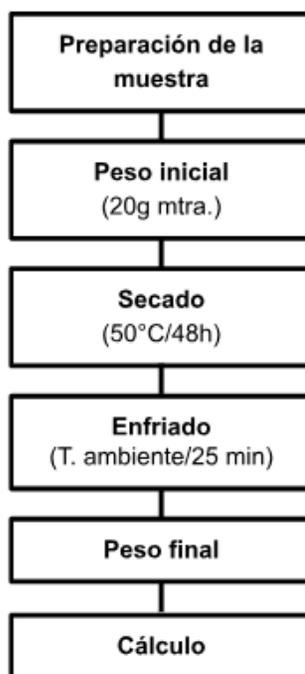


Figura 2. Diagrama de flujo para la determinación del porcentaje de humedad en una muestra.

Cálculo:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100$$

Donde:

P_i: Peso en gramos de la muestra al inicio

P_f: Peso en gramos de la muestra después del enfriado

La porción de la muestra que no corresponde a la humedad y donde se concentran los nutrientes es conocida como Materia Seca (MS) y se obtiene de la siguiente manera:

$$\% \text{ Materia Seca} = \% 100 - \% \text{ Humedad}$$

Una vez determinada la humedad, la materia seca fue molida en un molino THOMAS WILEY con criba de 1mm y almacenada en frascos de vidrio con tapa hermética con la identificación correspondiente.

4.3.2 Determinación de cenizas en seco

Fundamento

Se basa en la oxidación de la materia orgánica de un alimento en ausencia de flama a una temperatura que va desde los 550-600°C. Se entiende como cenizas al residuo inorgánico que queda después de la calcinación (Nollet, 1996).

Es importante señalar que las próximas determinaciones se hacen utilizando la materia seca molida obtenida luego de la determinación de humedad.

El siguiente diagrama de flujo resume el procedimiento para la determinación de cenizas totales en seco.

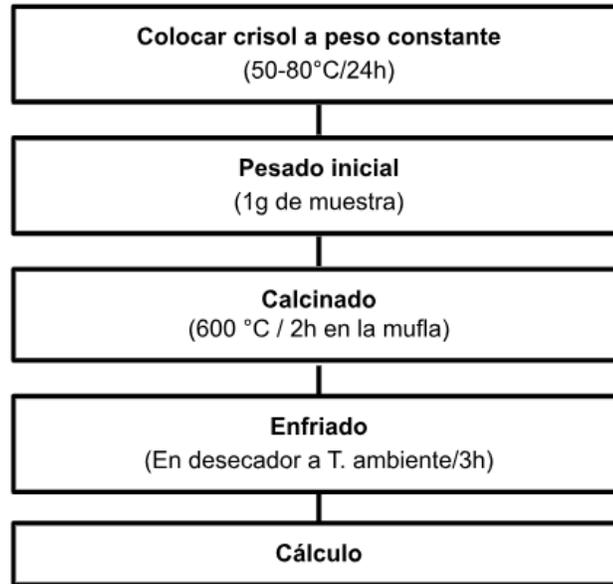


Figura 3. Diagrama de flujo para la determinación del porcentaje de cenizas totales en seco de una muestra.

Cálculo:

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{P_f - P_i}{m} \times 100$$

Donde:

Pf: Peso en gramos del crisol con la muestra después de calcinar

Pi: Peso en gramos del crisol a peso constante

m: Peso en gramos de la muestra seca

4.3.3 Determinación de extracto etéreo por el método Soxhlet

Fundamento.

Está basado en la extracción de lípidos de un alimento al ponerse en contacto con disolventes orgánicos y ser solubilizados, por lo tanto, se cuantifican las sustancias extraíbles en éter etílico por pérdida de peso de la muestra (Nielsen, 1998).

A continuación, se resume el procedimiento en forma de diagrama de flujo para la determinación del extracto etéreo.



Figura 4. Diagrama de flujo para la determinación del porcentaje de extracto etéreo de una muestra.

Cálculo:

$$\% \text{ E.E.} = 100 - \left[\frac{Pf - Pi}{m} \times 100 \right]$$

Donde:

Pf: Peso en gramos del cartucho de celulosa más muestra desengrasada seca

Pi: Peso en gramos del cartucho de celulosa a peso constante

m: Peso en gramos de la muestra seca

4.3.4 Determinación del nitrógeno total por método Kjeldahl para calcular el porcentaje de proteína cruda (PC).

Fundamento.

Este método determina el nitrógeno total en forma de amonio de los alimentos sin diferenciar si es nitrógeno basado en proteína o nitrógeno no proteico. Posteriormente el contenido de proteína verdadera del alimento se estima multiplicando el contenido de nitrógeno por un factor general de conversión (FGC) de nitrógeno a proteína, generalmente establecido en 6.25, que supone que el contenido de nitrógeno de las proteínas es del 16 % (Sáez-Plaza *et al.*, 2019).

El método consta de las siguientes etapas (Pearson, 1993):

a. Digestión

Consiste en la oxidación de la materia orgánica en un tratamiento con ácido sulfúrico concentrado en ebullición y en presencia de un catalizador, lo que conduce a la formación de dióxido de carbono, dióxido de azufre y sulfato de amonio.

b. Destilación

A la muestra digerida se le adiciona una disolución alcalina de hidróxido de sodio que produce la liberación de amonio en forma de gas. Posteriormente el amoniaco se condensa y es fijado con una disolución de ácido bórico como borato de amonio.

c. Titulación

La disolución de borato de amonio se titula con una disolución de ácido clorhídrico, produciendo cloruro de amonio y ácido bórico. Finalmente se determina el nitrógeno total considerando el volumen gastado de ácido clorhídrico y la estequiometría de toda la reacción.

A continuación, se resume el procedimiento en forma de diagrama de flujo para la determinación de nitrógeno total.

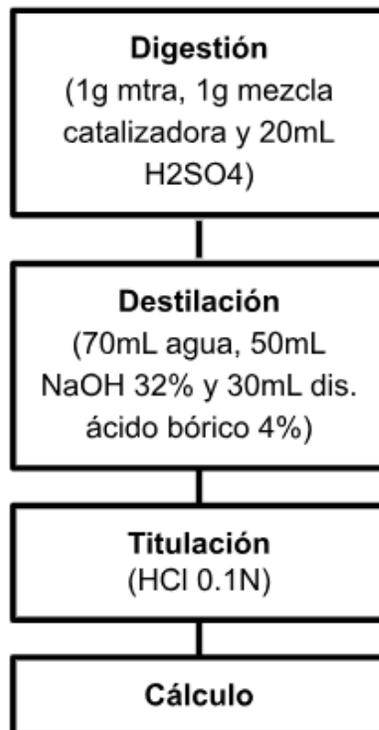


Figura 5. Diagrama de flujo para la determinación del porcentaje de nitrógeno total de una muestra.

Cálculo del contenido de nitrógeno en la muestra:

$$\% \text{ Nitrógeno} = \frac{(A - B) \times N \times meq}{m} \times 100$$

Donde:

A: mL de HCl gastado en la titulación de la muestra

B: mL de HCl gastado en la titulación sin muestra (blanco)

N: Normalidad del ácido clorhídrico (0.1)

meq: miliequivalentes de nitrógeno (0.014)

m: peso en gramos de la muestra seca

Cálculo del %PC aplicando el factor general de conversión:

$$\% \text{ PC} = \% \text{ Nitrogeno} \times \text{FGC}$$

4.3.5 Determinación de la fibra cruda y sus fracciones.

Fundamento

El método de Van Soest es una cuantificación global de la pared celular utilizada para medir por gravimetría todos los componentes de la pared celular (celulosa, hemicelulosa, lignina, compuestos solubles y cenizas) (Van Soest *et al.*, 1991).

4.3.5.1 Determinación de la fibra detergente neutro (FDN)

Fundamento

Usando una solución detergente neutro se obtiene, mediante la disolución de las proteínas, hidratos de carbono y lípidos de las células de las plantas, un residuo que contiene intactas para su cuantificación a la hemicelulosa, celulosa y lignina (Van *et al.*, 1991).

4.3.5.2 Determinación de la Fibra Detergente Ácido (FDA)

Fundamento

Usando una solución detergente ácido se obtiene, mediante la disolución de la hemicelulosa, un residuo fibroso compuesto por celulosa y lignina, además de una porción de cenizas y silicatos. La FDA se determina gravimétricamente como residuo de la extracción (Van *et al.*, 1991).

4.3.5.3 Determinación de lignina

A partir del residuo fibroso de FDA se solubiliza la lignina a través de oxidación en una disolución de permanganato de potasio amortiguada con ácido acético y sales permaneciendo la celulosa y los minerales insolubles. El contenido de lignina se determinó por diferencia de peso entre la muestra de FDA y el residuo de esta determinación que representa el contenido de celulosa y minerales.

Cálculo:

$$\% \text{ Lignina} = \frac{P1 - P2}{P3} \times 100$$

Donde:

P1: Peso en gramos del crisol y de la fibra seca (FDA)

P2: Peso en gramos del crisol después de la oxidación con permanganato (celulosa)

P3: Peso en gramos de la muestra seca utilizada en el método de FDA

4.3.5.3 Determinación de celulosa y hemicelulosa

Celulosa

Se incineró la muestra procedente de la determinación de lignina a 500°C por 24 hora, posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente en un secador por 25 min. El contenido de celulosa se calcula por diferencia de peso.

Cálculo:

$$\% \text{ Celulosa} = \frac{P2 - P4}{P3} \times 100$$

Donde:

P2: Peso en gramos del crisol después de la oxidación con permanganato (celulosa)

P3: Peso en gramos de la muestra seca utilizada en el método de FDA

P4: Peso en gramos del crisol con las cenizas (principalmente silicio)

Hemicelulosa

El porcentaje de hemicelulosa de las muestras se obtuvo a partir de la diferencia entre la FDN menos la FDA, considerando que la FDN representa el contenido de lignina, celulosa y hemicelulosa y la FDA únicamente lignina y celulosa, además de cenizas y silicatos.

Cálculo:

$$\% \text{ Hemicelulosa} = \% \text{ FDN} - \% \text{ FDA}$$

Donde:

% FDN: porcentaje de la fibra detergente neutro

% FDA: porcentaje de la fibra detergente ácido

4.3.6 Determinación del extracto libre de nitrógeno (ELN)

Fundamento

Constituido por carbohidratos digeribles y compuestos orgánicos solubles no nitrogenados, se obtiene de restar a 100 los porcentajes calculados para cada nutriente (A.O.A.C, 2015).

Cálculo:

$$\% \text{ ELN} = 100\% - (A+B+C+D+E)$$

Donde:

A: contenido de humedad (%)

B: contenido de cenizas (%)

C: contenido de EE (%)

D: contenido de PC (%)

E: contenido de FC (%)

4.3.7 Determinación de compuestos secundarios

4.3.7.1 Determinación cualitativa de saponinas

Previamente se elaboró el extracto etanólico de los ensilados de cada cepa de hongo siguiendo el procedimiento descrito en el siguiente diagrama de flujo.

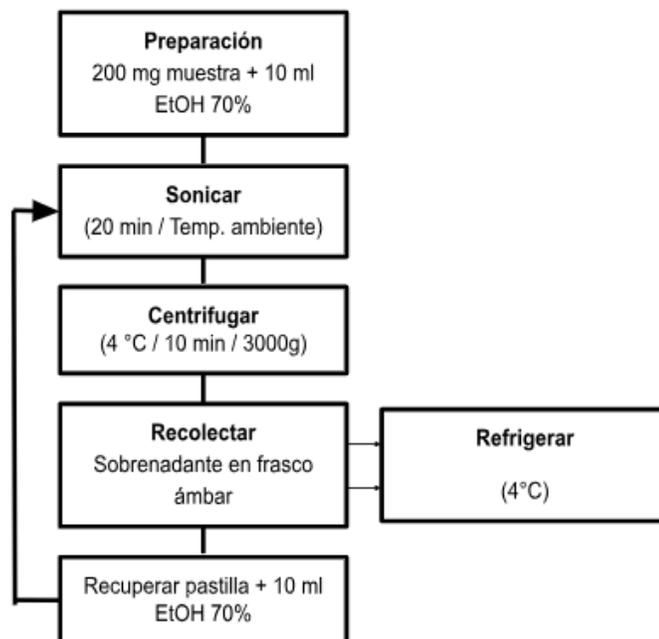


Figura 6. Diagrama de flujo para la elaboración del extracto etanólico de una muestra.

Fundamento

La detección preliminar de estos compuestos es posible mediante prueba de espumado y prueba de coloración. La primera está basada en la propiedad fisicoquímica que presentan las soluciones acuosas de saponinas para disminuir la tensión superficial de los líquidos, provocando abundante espuma por agitación (Enzio *et al.*, 2005). La segunda consiste en la reacción del ácido sulfúrico con el esqueleto esteroideal o triterpenoide de las sapogeninas mediante una modificación del método de Rosenthaler (Colina, 2016).

Los siguientes diagramas describen el procedimiento para la determinación de la presencia de saponinas:

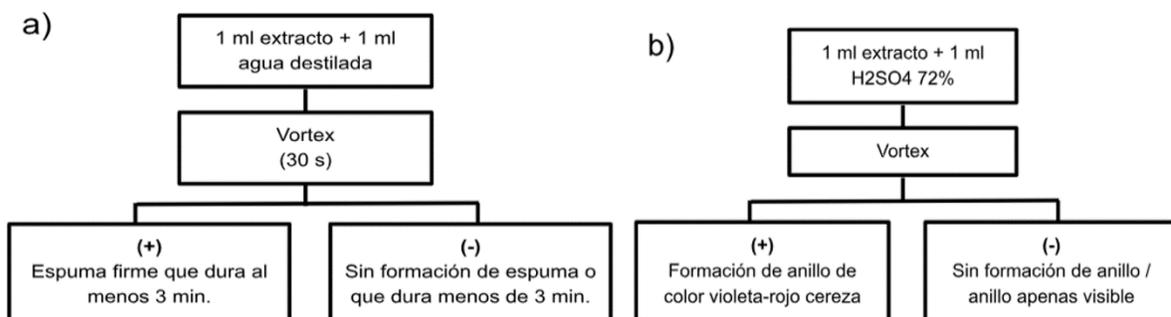


Figura 7. Diagrama de flujo para la determinación de la presencia de saponinas en ensilados por prueba de espumado (a) y prueba de coloración (b).

Para el control positivo, en ambas pruebas se comparó, por duplicado, la reacción de todas las muestras con la reacción de saponinas de Quillaja 100 % para determinar la presencia o ausencia de saponinas en los ensilados.

4.3.7.2 Determinación de compuestos fenólicos totales y taninos

Para su determinación se realizó previamente una extracción en acetona al 70 %, el siguiente diagrama de flujo explica detalladamente ese proceso:

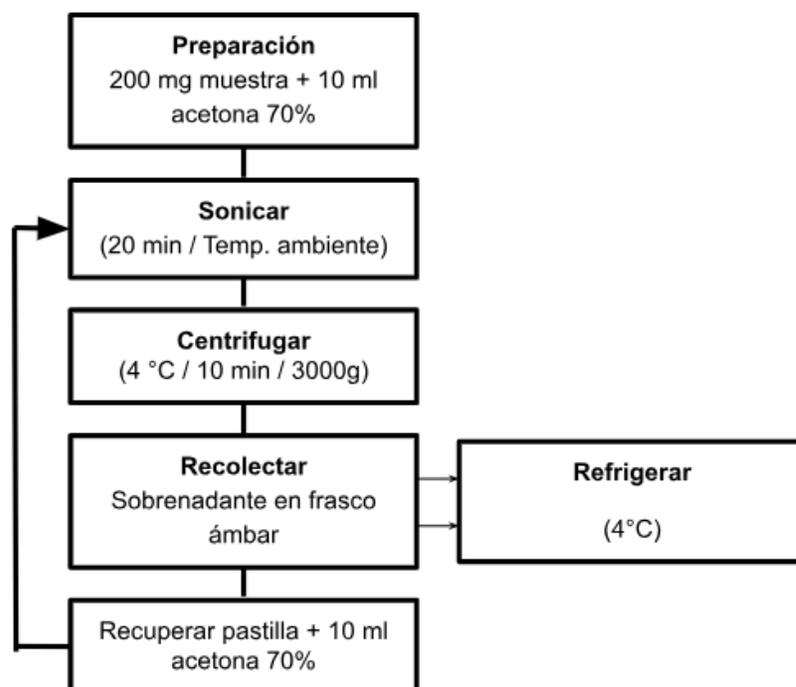


Figura 8. Diagrama de flujo para la elaboración del extracto de una muestra en acetona al 70 %.

Las determinaciones se evaluaron por duplicado para cada una de las muestras de cada cepa de hongo.

4.3.7.2.1 Determinación de compuestos fenólicos totales

Fundamento

El reactivo de Folin-Ciocalteu es una mezcla de tungstano y molibdato. El método se basa en la reducción de esta mezcla por los compuestos fenólicos generando una coloración azul en condiciones básicas, las cuales se logran por la adición de carbonato de calcio, posterior a la reacción, la determinación se realiza por espectrofotometría (García *et al.*, 2007).

El siguiente diagrama describe el procedimiento para la determinación de compuestos fenólicos totales.

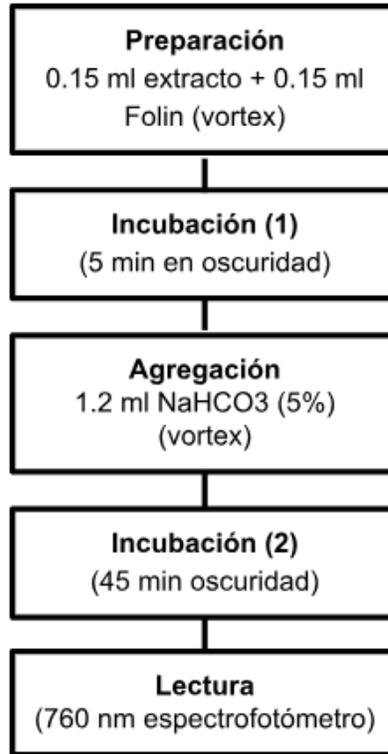


Figura 9. Diagrama de flujo para la determinación de compuestos fenólicos totales de una muestra por espectrofotometría.

Para su cuantificación se realizó una curva estándar de ácido tánico a concentraciones de 6.25, 12.5, 25, 50 y 100 [ug/mL]. La concentración de fenoles totales se expresó como [mg equivalentes de ácido tánico/g MS].

4.3.7.2 Determinación de taninos

Fundamento

Utilizando un polímero con alta capacidad de enlace de hidrógeno a derivados fenólicos (Polivinilpirrolidona) se logra la precipitación de los taninos, dejando libres para su medición al resto de los compuestos fenólicos (fenoles simples) en la muestra.

El siguiente diagrama de flujo describe el procedimiento para la determinación de taninos.

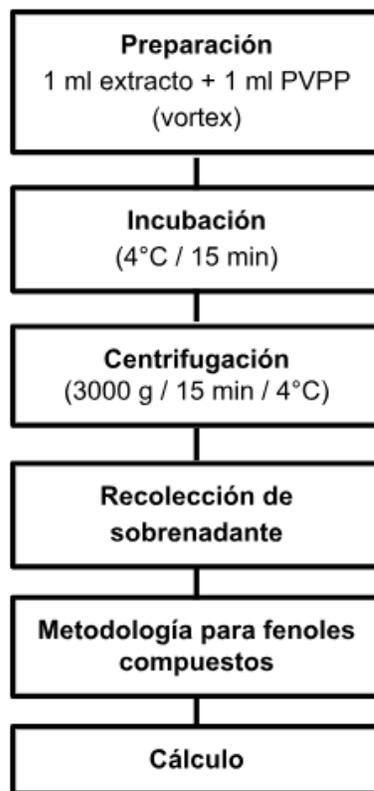


Figura 10. Diagrama de flujo para la determinación de taninos en una muestra.

Cálculo:

$$\text{Taninos} = \text{Fenoles totales} - \text{Fenoles Simples}$$

4.3.8 Determinación de micotoxinas por Cromatografía de Capa Fina (TLC).

Para la determinación de micotoxinas primeramente se realizó, a partir de la muestra de ensilado, la extracción de material biológico con solventes orgánicos para después hacer la determinación de micotoxinas mediante TLC.

1. Fundamento de la extracción de micotoxinas con solventes.

La separación de un compuesto por extracción se basa en la transferencia selectiva de un compuesto desde una mezcla sólida o líquida hacia una fase líquida (solvente orgánico) gracias a sus diferencias de solubilidad en el solvente elegido (Nichols, 2017).

El siguiente diagrama describe el procedimiento para la extracción de material biológico con solventes orgánicos.

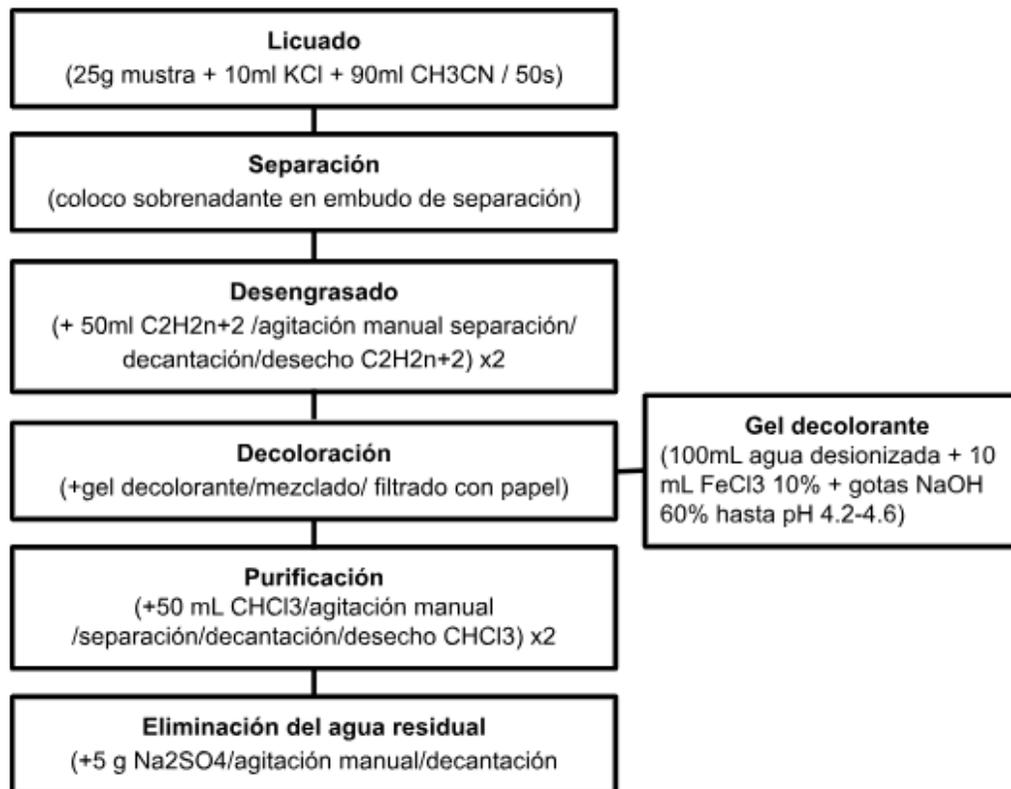


Figura 11. Diagrama de flujo para la extracción de material biológico de una muestra de ensilado utilizando solventes orgánicos.

2. Fundamento de la Cromatografía de Capa Fina (TLC)

Esta técnica se usa para separar mezclas de compuestos con base en diferencias de polaridad. El extracto a separar se aplica sobre una placa de

sílice (fase estacionaria), luego se pone en una fase móvil (solvente) que sube por capilaridad (Hahn-Deinstrop, 2007).

El siguiente diagrama describe el procedimiento para la determinación de micotoxinas por TLC.

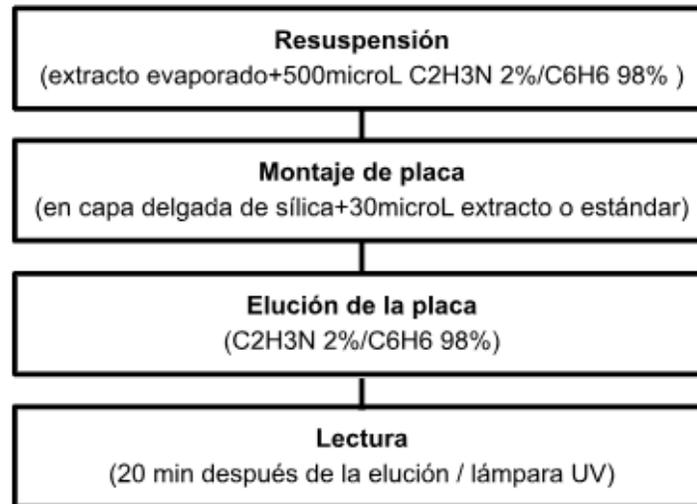


Figura 12. Diagrama de flujo para la determinación de la presencia de micotoxinas en ensilado por la técnica de cromatografía de capa fina.

Los estándares utilizados para esta prueba fueron los correspondientes a Aflatoxina B1, Zearalenona y Ocratoxina A, se realizó una extracción y determinación sencilla por cada tratamiento para ambas cepas.

4.3.9 Estimación de la digestibilidad *in vitro* por la técnica de producción de gas

Fundamento

Para esta determinación se empleó la técnica propuesta por Theodorou *et al.* (1994) que permite determinar la extensión y cinética de la degradación de un alimento directamente como producto de su fermentación e indirectamente desde el fluido ruminal neutralizado en un lapso de tiempo (Posada *et al.*, 2005) (Figura 13).

La digestibilidad *in vitro* de la materia seca es una determinante de la calidad de los alimentos y puede utilizarse como un estimador de la digestibilidad *in vivo* (López *et al.*, 2018).

La presión de gas se transformará a volumen por medio de la ecuación de regresión lineal propuesta por Ørskov y McDonald (1979). Las variables de la cinética de producción de gas: volumen máximo de gas producido (Vmax), fase de retardo (L) y tasa de producción de gas (S), se obtendrán mediante un modelo logístico (Pitt *et al.*, 1999).

Se empleará un diseño experimental de bloques completamente al azar. Las variables se analizarán con el procedimiento MIXED de SAS, la comparación de medias se realizará con la prueba de Tukey.

El cálculo del porcentaje de la digestibilidad *in vitro* a partir de la técnica de producción de gas es el siguiente:

$$\% \text{ DIVMS} = \frac{\text{Peso final de la bolsa} - \text{Peso de la bolsa vacía}}{\text{Peso de la muestra}} \times 100$$

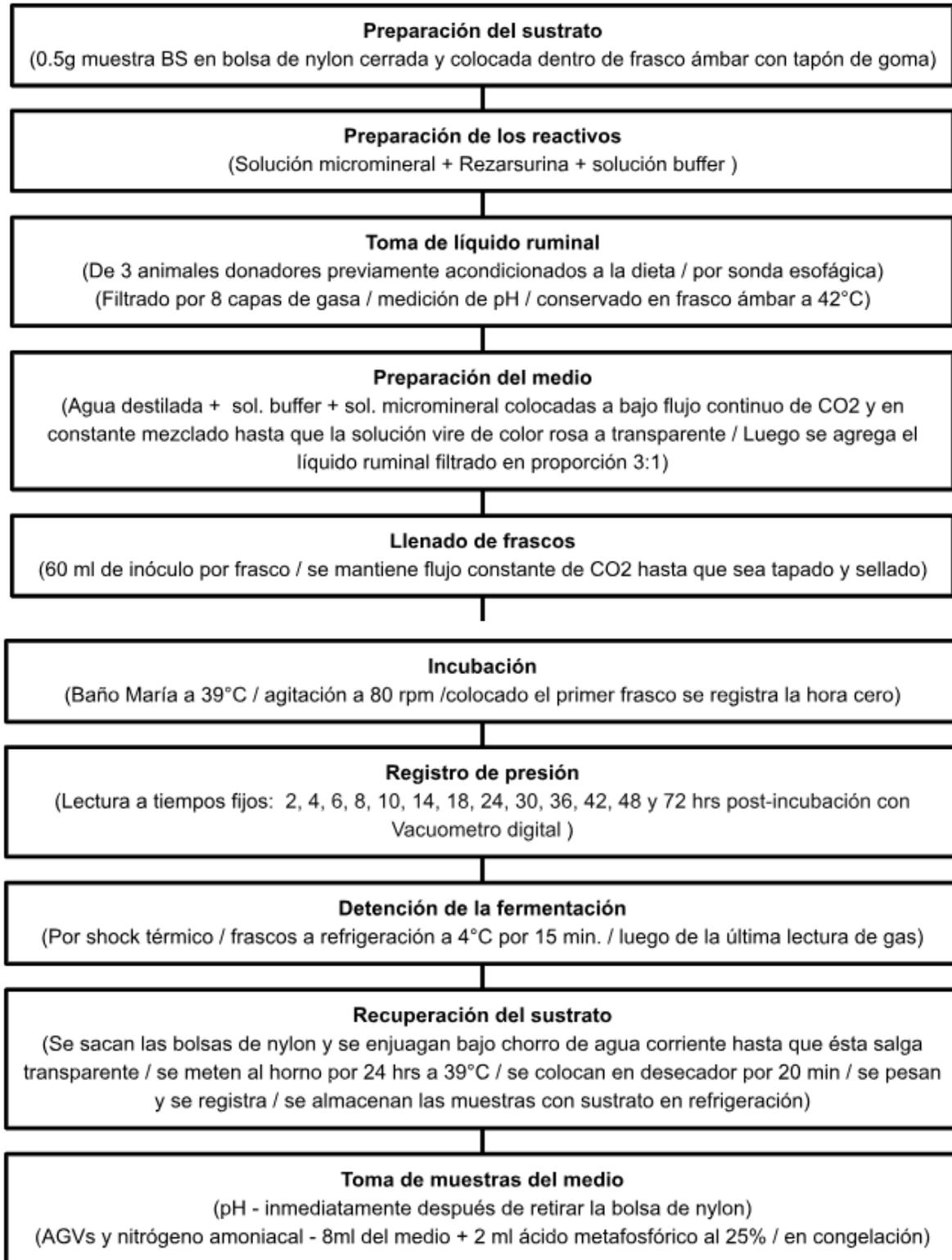


Figura 13. Diagrama de flujo para la determinación de la digestibilidad *in vitro* de una muestra por la técnica de producción de gas.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Evaluación de las características organolépticas (físicas) de los ensilados realizados con el sustrato agotado de los hongos *Pleurotus ostreatus* y *Lentinula edodes* en sus diferentes formulaciones.

En el Cuadro 3 se presentan los resultados de la evaluación de las características organolépticas de los ensilados, como se puede observar la principal diferencia entre los ensilados fue el olor, donde los ensilados elaborados con SRH de *Pleurotus ostreatus* (IAP) recibieron una calificación superior a los elaborados con SRH de *Lentinula edodes* (L5), lo que coincide con lo reportado por (Chen *et al.*, 2016) que menciona el aroma único de los hongos de la familia *Lentinula spp* como una de sus principales características, es importante resaltar que el olor detectado en este ensilado se asocia principalmente a la cepa de hongo y no a un mal proceso de ensilaje. Lo anterior puede corroborarse con los valores de pH, el cual disminuye de manera directamente proporcional al porcentaje de inclusión de maíz en cada tratamiento así, los ensilados T3 (70 % SRH, 30 % maíz) de ambas cepas presentan valores de pH (<4) inferiores a los valores de pH (>5) de los ensilados C (100 % SRH). Al respecto, Schneider *et al.* (2021) señalan que valores de pH entre 3.6 y 4.2 son indicativos de un buen proceso de conservación de los ensilados, lo que se relaciona directamente con una fermentación de la materia vegetal de tipo láctica y con una mayor calidad de la materia final ensilada.

Por lo tanto, de acuerdo con la calificación obtenida de sus propiedades organolépticas y su nivel de pH, el ensilado T3 de SRH de *Pleurotus ostreatus* IAP es el que exhibe mayores posibilidades de tener un mejor nivel de aceptación y consumo por parte de los animales.

Cuadro 3. Evaluación de características organolépticas de los ensilados

CEPA	TRAT.	HUM.	M. B.	COLOR	T. PART.	OLOR	M. N.	COEF.	CALIF.	pH
SRH	C	1.00	0.75	1.00	0.88	0.5	0.88	0.83	83.33	5.14 ± 0.04
L5	T1	0.75	0.88	0.94	0.88	0.5	1.00	0.82	82.29	4.15 ± 0.02
	T2	0.75	0.94	0.75	1.00	0.5	1.00	0.82	82.29	4.04 ± 0.01
	T3	0.75	0.88	0.94	1.00	0.5	1.00	0.84	84.38	3.91 ± 0.01
SRH	C	0.75	0.75	1.00	1.00	0.75	0.75	0.83	83.33	5.33 ± 0.02
IAP	T1	0.75	0.88	1.00	1.00	0.75	0.88	0.88	87.5	4.13 ± 0.01
	T2	0.75	0.81	1.00	1.00	0.88	1.00	0.91	90.63	4.06 ± 0.01
	T3	0.75	0.75	1.00	1.00	1.00	1.00	0.92	91.67	3.98 ± 0.01

TRAT: tratamiento. HUM: humedad. M.B: manchas blancas. T. PART: tamaño de partícula. M.N: manchas negras. COEF: coeficiente. CALIF: calificación expresada en %. C: ensilado formulado con 100 % de inclusión de SRH y 0 % de maíz molido. T1: ensilado formulado con 90 % de inclusión de SRH y 10 % de maíz molido. T2: ensilado formulado con 80 % de SRH y 20 % de maíz molido. T3: ensilado formulado con 70 % de SRH y 30 % de maíz molido.

5.2 Evaluación de las características químicas de los ensilados realizados con el sustrato agotado de los hongos *Pleurotus ostreatus* y *Lentinula edodes* en sus diferentes formulaciones.

En el Cuadro 4 se presentan los resultados de la composición nutrimental de los ensilados, como puede observarse, la materia seca (MS) de todos los ensilados oscila entre un 31.2 y 42.4 %, de acuerdo con Waldo (1977) el rango deseable de MS va de un 30 a 40 %, valores en los cuales existe un efecto positivo en el consumo de ensilado (Duthil, 1980). Además, con estos valores de humedad la fermentación láctica se ve favorecida y se evita el desarrollo de bacterias como *Clostridium* (Jiménez *et al.*, 2022). Si bien dos de los ensilados (*L5T3*, *IAPT3*) sobrepasan el valor de 40 % de MS, ambos exhiben un pH por debajo de 4, lo que indicaría una fermentación predominantemente ácido láctica.

Lorenzana *et al.* (2023) reportan un valor de proteína cruda (PC) para el rastrojo de maíz de apenas 7.40 %, por otro lado, Valencia (2016), indican que el contenido de PC en ensilados de maíz de planta entera se encuentra del 8-10 %, así mismo la Asociación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal (FEDNA, 2023) reporta un valor máximo de PC de 8.78 % en ensilados de maíz de buena calidad. Los ensilados elaborados en este estudio presentan un valor de PC entre los 8.26 y 12.0 %, valores superiores al de rastrojo de maíz y valores incluso superiores a los reportados para el ensilado de maíz de planta entera. Además, de manera general puede observarse una relación directamente proporcional entre la cantidad de PC y el porcentaje de inclusión de SRH en los ensilados; de tal manera que los ensilados elaborados con 100 % de SRH muestran tener un mayor porcentaje de PC que los ensilados elaborados con 70 % de SRH.

Tales porcentajes de PC y su comportamiento pueden explicarse ya que los sustratos utilizados para el crecimiento de los hongos fueron invadidos por su micelio, el cual aporta una cantidad de proteína extra (dependiendo la cepa de hongo) al ensilado Lorenzana *et al.* (2023), además por su parte el maíz es deficitario en proteína (FEDNA, 2023).

Con respecto a los valores de PC por cepa, puede observarse que los ensilados elaborados con SRH *IAP* tienen una mayor cantidad de PC por tratamiento a comparación de los ensilados elaborados con SRH *L5*, estos valores difieren de los reportados por Lorenzana *et al.* (2023) de 6.9 % y 10.7 % de PC para los SRH de *IAP* y *L5* respectivamente. Esto probablemente se deba a la diferencia en las condiciones ambientales durante la etapa de invasión y fructificación de los hongos en ambos estudios, lo que da como resultado sustratos distintamente invadidos por el micelio y por lo tanto desigualmente agotados.

Con respecto al extracto etéreo (EE) en los ensilados, puede observarse que el porcentaje de lípidos aumenta conforme se eleva el porcentaje de inclusión de maíz en las formulaciones. El maíz tiene un contenido apreciable de lípidos que puede

llegar a ser hasta de un 3.3 % (FEDNA, 2023), lo que explica por qué los ensilados formulados con 70 % SRH y 30 % maíz molido obtuvieron un mayor porcentaje de EE que el resto de los ensilados en el estudio (3.91 % EE *L5*, 3.24 % EE *IAP*). Las proporciones de este componente son superiores a la base de 2.1 % indicada por Santos *et al.* (2010) en ensilados de buena calidad elaborados con forrajeras tropicales.

Por otra parte, puede verse que los valores de las cenizas (Cen) son menores conforme disminuye el porcentaje de inclusión del SRH de ambas cepas, además los ensilados elaborados con SRH *IAP* muestran valores mayores a los de los ensilados elaborados con SRH *L5*. Al respecto, Lorenzana *et al.* (2023) reportaron un aumento ($p < 0.05$) en la cantidad de minerales en el sustrato agotado de tres cepas distintas de hongos de podredumbre blanca en comparación con sustrato no invadido, entre ellas, *Lentinula edodes L5*. A partir de ese resultado podemos inferir que el aumento de esta fracción en los ensilados de SRH de *IAP* también es consecuencia de la invasión del sustrato por el micelio del hongo.

Los valores del extracto libre de nitrógeno (ELN) en todos los ensilados muestran ser mayores conforme aumenta la inclusión de maíz en su formulación, así los ensilados elaborados del tratamiento 3 contienen la mayor cantidad de ELN (70.19 % SRH *L5* y 69.72 % SRH *IAP*). Por su parte el contenido de fibra cruda (FC) en los ensilados muestra un comportamiento contrario, es decir, disminuye su valor en los ensilados conforme aumenta la participación del maíz en las formulaciones por lo que los tratamientos 70 % SRH:30 % maíz molido presentan los menores valores de FC. En este sentido, el maíz es el grano de cereal de mayor valor energético por su alto contenido de almidones y lípidos además de contener un bajo nivel de fibra (FEDNA, 2023).

Se puede observar que los valores de FC de los ensilados del tratamiento C son menores (19.01 % *L5* y 13.99 % *IAP*) que los reportados por Lorenzana *et al.* (2023) para los sustratos agotados de los mismos hongos sin ensilar (20 % para ambas cepas), esta reducción en la cantidad de FC puede deberse directamente al proceso

de ensilaje y puede sugerir un mayor consumo de materia seca por animal al día (Sousa, 2017).

El valor de la fibra detergente neutro (FDN) representa la pared celular total (FDA más hemicelulosa) y está directamente relacionada con la cantidad de forraje que puede consumir un animal, cuanto mayor sea su valor, los animales consumirán menor cantidad (Del Pozo, 1971). Por otro lado, la fibra detergente ácido (FDA) hace referencia a las porciones de la pared celular compuestas por celulosa y lignina, por lo que está relacionada con la capacidad del animal para digerir el forraje; cuanto mayor sea el contenido de FDA, menor será la digestibilidad de los alimentos y la energía que contienen (Logan *et al.*, 1971). De manera general puede observarse una disminución en el contenido de FDN y FDA de los ensilados conforme se aumenta el contenido de maíz molido, estos valores alcanzan su nivel más bajo en las formulaciones del T3 para ambas cepas. Lorenzana *et al.* (2023) reportaron valores de 45.4 % FDN y 38.1 % FDA para SRH L5 y 62.1 % FDN y 41.9 % FDA para SRH IAP, todos ellos por encima de los encontrados en este estudio para los ensilados 70 % SRH:30 % maíz molido de este experimento (L5: 43.1 % FDN, 17.1 % FDA / IAP: 32.1 % FDN, 21.2 % FDA).

La disminución de la FDA para ambas cepas está dada por la reducción de los valores de celulosa y lignina conforme disminuye la inclusión de SRH en las formulaciones y por la poca cantidad de lignina que aporta el maíz a los ensilados, 0.1 % (López-Herrera, 2019) en comparación con la cantidad de lignina de los sustratos agotados, 15.3 % L5 y 12.1 % IAP (Lorenzana *et al.*, 2023).

Por lo tanto, los ensilados elaborados con 70 % SRH:30 % maíz molido mostrarían un mayor consumo por el animal y mayor digestibilidad en comparación con los SRH sin ensilar y con el resto de los ensilados elaborados en este estudio. Además, los valores de FDN y FDA de estos ensilados muestran valores similares a los reportados por López-Herrera *et al.* (2021) que evaluó la calidad de la fibra en ensilados de leguminosas con diferentes fuentes de carbohidratos.

Cuadro 4. Composición nutricional de los ensilados.

CEPA	TRAT	MS	PC	EE	CEN	FC	ELN	FDN	FDA	CEL	HEMI	LIG	
<i>Lentinula edodes</i> <i>L5</i>	SRH	C	31.23	11.58	3.22	19.21	19.01	46.98	50.42	41.45	21.44	8.97	13.3
		T1	36.93	11.40	3.63	16.45	18.24	50.28	53.11	39.60	16.07	13.51	9.34
		T2	38.40	9.84	3.86	13.41	10.57	62.32	53.67	22.94	12.72	30.73	7.12
		T3	42.43	8.26	3.91	9.46	8.18	70.19	43.06	17.14	7.59	25.91	6.99
<i>Pleurotus ostreatus</i> <i>IAP</i>	SRH	C	31.70	12.00	1.86	22.11	13.99	50.04	44.55	37.33	18.93	7.22	13.50
		T1	32.09	11.15	1.96	16.63	11.32	58.94	43.11	32.14	16.99	10.97	11.57
		T2	36.12	10.18	2.21	13.06	10.74	63.81	47.68	27.67	15.83	20.00	11.46
		T3	42.37	9.06	2.24	10.61	8.37	69.72	32.14	21.36	11.58	10.77	7.85
*EEM			0.861	0.253	0.285	0.723	0.754	1.491	1.546	1.613	0.768	1.725	0.529

C: ensilado formulado con 100 % de inclusión de SRH y 0 % de maíz molido. T1: ensilado formulado con 90 % de inclusión de SRH y 10 % de maíz molido. T2: ensilado formulado con 80 % de SRH y 20 % de maíz molido. T3: ensilado formulado con 70 % de SRH y 30 % de maíz molido. MS: % materia seca. PC: % proteína cruda. EE: % extracto etéreo. CEN: % cenizas. FC: % fibra cruda. ELN: % extracto libre de nitrógeno. FDN: % fibra detergente neutro. FDA: % fibra detergente ácido. CEL: % celulosa. HEMI: % hemicelulosa. LIG: % lignina.

5.3 Caracterización de los metabolitos secundarios de los ensilados

A continuación, se presentan los resultados de la caracterización de los metabolitos secundarios presentes en los ensilados realizados en el estudio.

5.3.1 Fenoles y taninos totales

Como se puede observar en el Cuadro 5 que presenta los valores de fenoles y taninos totales, los ensilados de *L5* presentan un contenido 1.33 veces mayor ($p < 0.05$) de compuestos fenólicos totales en comparación con los ensilados de *IAP*. Se ha reportado que los SRH contienen una alta cantidad de compuestos bioactivos

(Elsakhawy *et al.*, 2020) dada por la cantidad de micelio que permanece en estos después de la cosecha. El contenido de estos compuestos varía de acuerdo con la cepa de hongo; (Reis *et al.*, 2012) indican que *P. ostreatus* presenta un menor contenido de compuestos fenólicos en comparación con *L. edodes* lo que coincide con lo observado en el presente estudio.

Además, observamos que conforme disminuye la concentración de SRH en el ensilado la concentración de fenoles totales disminuye, que era de esperarse en consecuencia de la incorporación de maíz en la formulación.

Finalmente, la cantidad de taninos encontrados en todos los ensilados de hongo son similares y no muestran diferencia significativa entre ellos. Lo anterior puede explicarse ya que si bien se ha reportado que *Lentinula edodes* contiene mayor cantidad de compuestos fenólicos totales en el micelio que *Pleurotus ostreatus* (Reis *et al.*, 2012), estudios recientes han demostrado la capacidad que tienen los hongos de podredumbre blanca para degradar taninos condensados (Lucas *et al.*, 2000) disminuyendo así su cantidad total en los ensilados del estudio.

Cuadro 5. Fenoles y taninos totales de los ensilados elaborados con SRH.

% INCL	100%		90%		80%		70%		CEPA	
	L5	IAP	L5	IAP	L5	IAP	L5	IAP	L5	IAP
Fenoles	9.00	6.53	8.63	6.44	8.17	6.32	8.21	6.16	8.50 ^a	6.36 ^b
Taninos	1.26	0.79	1.31	1.17	1.00	1.04	0.52	0.81	1.02	0.95

% INC SRH									
	100%	90%	80%	70%	*EEM	P	Hongo	Inclusión	Hongo: inclusión
Fenoles	7.70 ^a	7.53 ^{ab}	7.24 ^b	7.19 ^b	0.15		0.001	0.007	0.38
Taninos	1.03	1.24	1.02	0.67	0.07		0.74	0.29	0.64

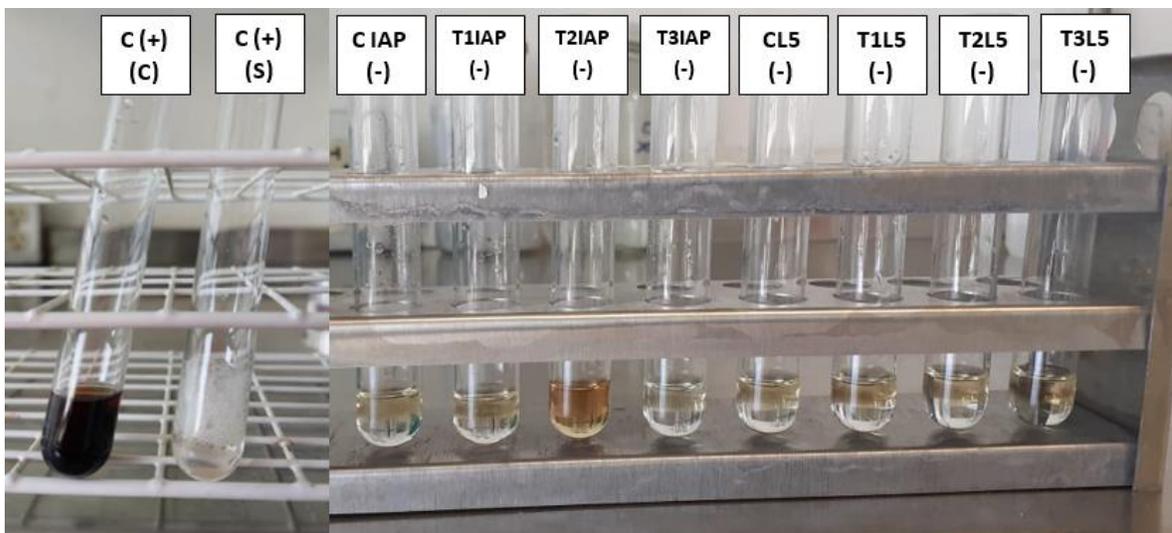
Los valores son la media (n= 64), EEM: error estándar de la media. Letras diferentes en columnas indican diferencia significativa. IAP: *Pleurotus ostreatus*. L5: *Lentinula edodes*

5.3.2 Saponinas

Como puede observarse en la Figura 14, los resultados de las pruebas cualitativas para la determinación de saponinas (colorimetría y espumado) son negativos para todos los ensilados de *Pleurotus ostreatus* y *Lentinula edodes*.

Aunque varios estudios como Dandapat *et al.* (2015) han reportado la presencia de saponinas en cuerpos fructíferos de hongos, aún no hay evidencia que indique la presencia de estos compuestos en el micelio de los mismos (Ratnaningtyas *et al.*, 2022) por lo que su presencia y determinación son un campo de estudio activo.

Figura 14. Resultados de las pruebas de colorimetría y espumado para la detección de saponinas en ensilados de SRH.



C(+)(C): control positivo por prueba de colorimetría. C(+)(S): control positivo por prueba de espumado.

C IAP/L5: ensilado elaborado con 100% de SRH IAP/L5. T1 IAP/L5: ensilado elaborado con 90% SRH IAP/L5 y 10% de maíz molido. T2 IAP/L5: ensilado elaborado con 80% SRH IAP/L5 y 20% de maíz molido. T3 IAP/L5: ensilado elaborado con 70% SRH IAP/L5 y 30% de maíz molido. (-): resultado negativo.

5.4 Evaluación del efecto de los diferentes ensilados sobre el porcentaje de digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS), cinética de la fermentación, producción de nitrógeno amoniacal y pH.

Como puede observarse en el Cuadro 6 que muestra la digestibilidad de la materia seca, la cantidad de nitrógeno amoniacal y el pH ruminal luego de las pruebas *in vitro*, existe una diferencia en la digestibilidad ($p < 0.05$) como resultado de la disminución del porcentaje de inclusión de SRH en los ensilados elaborados para este estudio de tal forma que el ensilado T3 de ambas cepas 33 % más digestible que el elaborado con 100 % de SRH. El porcentaje de DIVMS que presentaron los ensilados con mayor digestibilidad (74.1 %) se encuentra por arriba del valor de digestibilidad reportado por Pozo *et al.* (2021) para el ensilado de maíz (73.8 % DIVMS), el cual es considerado como el de mejor calidad cuando el proceso de ensilaje se realiza de manera óptima.

Guerrero-Rodríguez *et al.* (2023) mencionan un valor mínimo de 47.3 % DIVMS para el rastrojo de maíz, mientras que García *et al.* (2017) reportaron un porcentaje de 67.51 % DIVMS para el maíz molido; estos valores pueden explicar que, al aumentar la inclusión de este último ingrediente en la formulación de los ensilados, el porcentaje de digestibilidad *in vitro* también aumentara.

La disminución en el potencial de hidrógeno ($p < 0.05$) en los ensilados se asocia con la creciente cantidad de maíz molido en las formulaciones. El maíz molido es considerado un carbohidrato de fácil digestibilidad, por lo que dentro del rumen es rápidamente degradado por las bacterias generando ácido láctico, favoreciendo la disminución del pH (Jaramillo *et al.* 2017). Los valores de pH del líquido ruminal correspondiente a los ensilados elaborados con 80 y 70 % de SRH están dentro del rango de 6-6.9 de propuesto por Van Soest (1994) dentro del que se encuentra una óptima actividad y crecimiento de microorganismos en el rumen.

Por otra parte, los ensilados realizados a partir del SRH *L5* presentaron una digestibilidad 2.5 % mayor ($p < 0.05$) que los elaborados con SRH de *Pleurotus ostreatus IAP*. Este resultado concuerda con lo reportado por Lorenzana *et al.* (2023) quienes evaluaron la DIVMS de distintos SRH de podredumbre blanca y donde el SRH *L5* mostró ser 4.1 % más digestible que el SRH *IAP*.

De manera general, se ha comprobado el aumento en la digestibilidad de diversos forrajes después de ser sometidos al proceso de ensilaje concluyendo que un correcto proceso fermentativo puede elevar la calidad de los piensos conservando sus características y la disponibilidad de los nutrientes en ellos (de Oliveira *et al.*, 2016).

También puede observarse que la disponibilidad de nitrógeno amoniacal aumenta ($p < 0.05$) de manera directamente proporcional a la inclusión de SRH en la formulación de los ensilados, de tal manera que los tratamientos C (100 % de SRH) contienen una mayor cantidad de nitrógeno amoniacal que los tratamientos T3 (70 % de SRH) de ambas cepas. Este comportamiento se asocia con la mayor cantidad de proteína reportada en el análisis químico proximal de este estudio para los ensilados elaborados con 100 % de SHR en comparación con los elaborados con 70 % de SRH.

El nitrógeno amoniacal liberado en el rumen a partir de la proteína de la dieta es captado por grupos bacterianos que sintetizan a partir de él proteína para su propio crecimiento, eventualmente la mayor parte de estas bacterias llega a intestino delgado donde sus compuestos nitrogenados (proteína bacteriana) son absorbidos en beneficio del animal (Moraes *et al.*, 2019). Los valores de nitrógeno amoniacal obtenidos de los ensilados de este estudio están por arriba del valor reportado por Mehrez *et al.* (1977) de 23 mg/dL como valor mínimo para obtener una actividad fermentativa ruminal máxima a partir del sustrato y maximizar la síntesis de proteína microbiana.

Puede observarse que los ensilados formulados con 100 % de inclusión de SRH produjeron un volumen máximo (V_{max}) menor (116.7 mL) ($p < 0.05$) que los elaborados con 70 % SRH (283.5 mL). Puede observarse también que los ensilados de SRH L5 produjeron un 19.63 % más de gas ($p < 0.05$) que los elaborados con SRH IAP. Además, la cepa L5 mostró un efecto significativo ($p < 0.05$) a un 70 % de

inclusión de SRH cuyo Vmax de gas es superior al resto de los ensilados elaborados en este estudio (304.88 mL).

El aumento en el Vmax de gas obtenido del ensilado SRH L5 (70 % SRH) puede deberse primero, a que al aumentar la disponibilidad de carbohidratos no estructurales (maíz molido), se aumenta la densidad energética, lo que promueve un rápido crecimiento bacteriano incrementando la producción de ácidos grasos volátiles y el volumen final de gas. (Noguera *et al.*, 2006) Por otro lado, el maíz molido tiene una superficie de contacto mucho mayor que el SRH por lo que los microorganismos ruminales tendrían una mayor posibilidad de atacar las moléculas de almidón del maíz fermentando más rápidamente este tipo de carbohidratos y en consecuencia produciendo mayores volúmenes de gas (Velásquez *et al.*, 2013).

Por otro lado, Lorenzana *et al.* (2023) reportaron una DIVMS mayor del SRH para la cepa L5 en comparación con el SRH de IAP (58.9 y 56.6 % respectivamente), de tal forma que podemos asumir que, a mayor digestibilidad del sustrato, la producción de gas a partir de su fermentación también puede verse aumentada. Al respecto Velásquez *et al.* (2013) mencionan que el volumen de gas producido y la degradación de la MS presentan una correlación positiva que implica que, al aumentar la degradación de la MS, aumenta la producción de gas.

Con respecto a la colonización del sustrato (L, h) y la velocidad con la que se llega al punto máximo de producción de gas (S_{μ}), puede observarse que a medida que el porcentaje de inclusión de maíz molido aumenta en los ensilados, el inicio de la fermentación es más rápido y la rapidez con la que se alcanza el punto más alto de producción de gas es mayor ($p < 0.05$). Resultados similares son reportados por Velásquez *et al.* (2013) en un estudio comparativo para determinar el efecto del procesamiento del grano de maíz sobre la cinética de degradación y fermentación de la materia seca *in vitro* donde concluyen que el tiempo de colonización tiene una relación directa con el tamaño de la partícula y su tipo de procesamiento, resultando

este tiempo menor en los tratamientos donde el grano ha sido molido fino y/o ensilado.

También puede observarse de manera general, que los ensilados de SRH *L5* presentan una fase de colonización más corta y una velocidad de producción de gas más alta en comparación con los ensilados de SRH *IAP* ($p < 0.05$), lo que también puede asociarse con la mayor DIVMS de esta cepa.

Cuadro 6. Digestibilidad *in vitro*, producción de gas, nitrógeno amoniacal y pH de los ensilados elaborados con SRH.

% INCL	100%		90%		80%		70%		CEPA	
CEPA	<i>L5</i>	<i>IAP</i>								
DIVMS (%)	59.13 ^{ab}	52.16 ^b	63.68 ^{ab}	65.55 ^{ab}	68.91 ^{ab}	69.92 ^{ab}	75.34 ^a	72.79 ^a	66.73 ^a	65.10 ^b
Vmax	131.82 ^e	101.60 ^f	198.62 ^d	146.17 ^e	245.56 ^b	221.85 ^c	304.88 ^a	262.03 ^b	220.22 ^a	184.08 ^b
S(μ)	0.025 ^d	0.025 ^d	0.034 ^c	0.030 ^c	0.043 ^{ab}	0.041 ^b	0.046 ^a	0.042 ^{ab}	0.042 ^a	0.034 ^b
L	7.88 ^b	9.45 ^a	1.15 ^f	1.72 ^{ef}	1.61 ^{ef}	2.62 ^{cd}	2.01 ^{de}	2.92 ^c	3.16 ^a	3.56 ^b
N-NH ₃ (mg/dL)	33.61 ^a	33.61 ^a	32.33 ^{ab}	32.33 ^{ab}	30.67 ^b	30.67 ^b	31.97 ^{ab}	31.97 ^{ab}	32.15 ^a	32.15 ^a
pH	7.02 ^b	7.05 ^a	6.95 ^c	6.96 ^c	6.91 ^d	6.89 ^e	6.86 ^f	6.84 ^f	6.93 ^a	6.93 ^a
% INC SRH										
	100%	90%	80%	70%	*EEM	P	Hongo	Inclusión	Hongo: inclusión	
DIVMS (%)	55.65 ^d	64.57 ^c	69.41 ^b	74.06 ^a	1.56		0.015	0.001	0.001	
Vmax	116.71 ^d	172.39 ^c	233.71 ^b	283.46 ^a	5.58		0.001	0.001	0.002	
S(μ)	0.025 ^c	0.032 ^b	0.042 ^a	0.044 ^a	0.003		0.001	0.001	0.27	
L	8.43 ^a	1.42 ^c	2.11 ^b	2.46 ^b	0.31		0.001	0.001	0.001	
N-NH ₃ (mg/dL)	33.61 ^a	32.33 ^{ab}	31.97 ^{bc}	30.67 ^c	0.36		1.00	0.001	1.00	
pH	7.04 ^a	6.95 ^b	6.90 ^c	6.85 ^d	0.006		0.8	0.001	0.001	

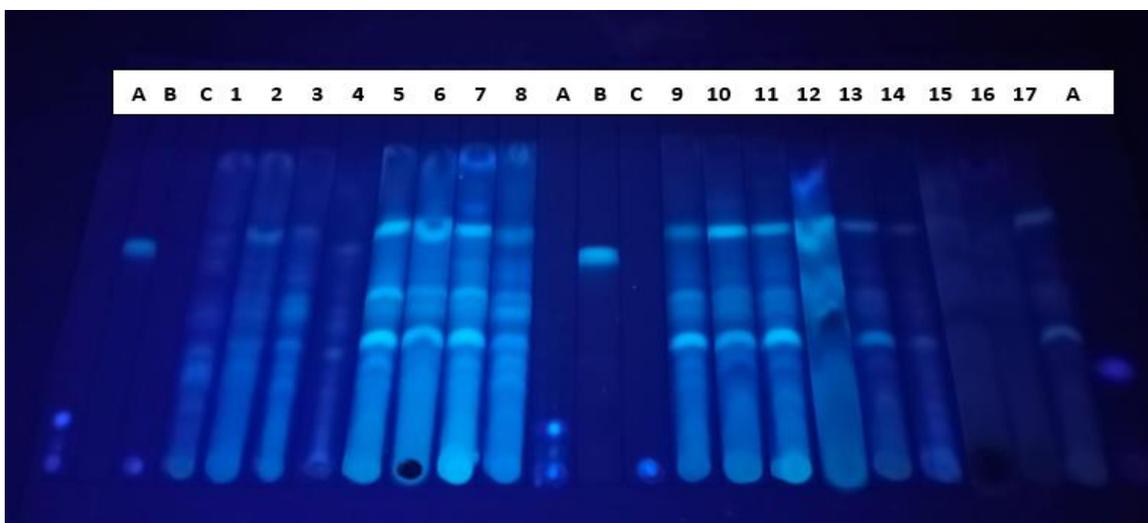
Los valores son la media (n= 194), EEM: error estándar de la media. Letras diferentes en columnas indican diferencia significativa. *IAP*: *Pleurotus ostreatus*. *L5*: *Lentinula edodes*.

5.5 Evaluación de la presencia de micotoxinas en ensilados de SRH de *Lentinula edodes* L5 y *Pleurotus ostreatus* IAP.

Cómo puede observarse en la Figura 15 que presenta los resultados para la presencia de micotoxinas, no existe coincidencia entre los carriles estándar (Aflatoxina B1, Zearalenona y Ocratoxina A) y los carriles correspondientes a los de los ensilados de SRH IAP y L5. Además, tampoco se encuentra coincidencia entre los estándares y el rastrojo de maíz utilizado originalmente como sustrato para la inoculación de ambas cepas ni sus correspondientes sustratos agotados.

Los resultados de esta prueba muestran que en ninguno de los insumos utilizados para la elaboración de los ensilados de este estudio existía contaminación previa por micotoxinas y que el proceso de ensilaje tampoco favoreció su aparición, sin embargo, estos resultados no descartan la presencia de hongos filamentosos productores de micotoxinas en los insumos o el producto final tal como lo menciona Solís (2016).

Figura 15. Resultados de la detección de micotoxinas en .SRH y ensilados de SRH por prueba de cromatografía de capa fina.



A: estándar de Aflatoxina B1. B: estándar de Zearalenona C: estándar de Ocratoxina A. 1: rastrojo de maíz sin inocular. 2: SRH L5. 3: SRH IAP. 4: Ensilado C IAP. 5: Ensilado T1 IAP. 6: Ensilado T2 IAP. 7: Ensilado T3 IAP. 10: Ensilado C L5. 11: Ensilado T1 L5. 12: Ensilado T2 L5. 13: Ensilado T3 L5.

6. CONCLUSIÓN

- Para el ensilaje de los sustratos residuales de la producción de hongos de podredumbre blanca *Lentinula edodes L5* y *Pleurotus ostreatus IAP* es necesaria la inclusión de una fuente de carbohidratos de fácil fermentación para obtener ensilados de calidad.
- La formulación 70:30 (SRH:maíz molido) produce un ensilado que potencialmente puede ser consumido por los animales, además, los ensilados de SRH *IAP* (70:30) mostraron mejores propiedades organolépticas en comparación con los ensilados de SRH *L5* ya que de manera general los ensilados elaborados con SRH *L5* mostraron un olor característico del hongo que podría ocasionar rechazo por parte de los animales.
- Los ensilados elaborados con SRH de *Lentinula edodes L5* mostraron tener una mejor calidad nutricional en comparación con los elaborados con SRH de *Pleurotus ostreatus IAP*.
- Los ensilados elaborados con SRH de *Lentinula edodes L5* mostraron tener una concentración más alta de compuestos fenólicos totales que los ensilados elaborados con *Pleurotus ostreatus IAP*, lo que indicaría que son una mejor fuente de antioxidantes que los ensilados de *IAP*.
Por otro lado, en ninguno de los ensilados elaborados en este estudio se demostró la presencia de saponinas.
- Los valores de digestibilidad *in vitro* de todos los ensilados de este estudio fueron superiores a los porcentajes de digestibilidad *in vitro* reportados para los sustratos residuales de la producción de hongo de ambas cepas (*Lentinula edodes L5* y *Pleurotus ostreatus IAP*), este aumento puede relacionarse con la inclusión de maíz molido en las formulaciones, así como, con el proceso de fermentación de los sustratos a través del ensilaje. El mayor valor de digestibilidad *in vitro* y por consiguiente volumen máximo de gas fue presentado por el ensilado con 70 % de SRH *Lentinula edodes IAP* y 30 % maíz molido.

- No se encontró presencia de micotoxinas (Aflatoxina B1, Ocratoxina A y Zearalenona) en ninguno de los ensilados evaluados en este estudio, por lo que el uso de estos sustratos ensilados en la alimentación animal es factible, sin embargo, su elaboración supone el mismo cuidado que para cualquier otro forraje para evitar su posible contaminación.

La transformación de los desechos de la producción de hongos de podredumbre blanca de *Lentinula edodes* L5 y *Pleurotus ostreatus* IAP a través del ensilaje permite mejorar las características finales del material vegetal, su calidad nutricional y su digestibilidad, por lo que, su uso en la alimentación animal podría ser factible. Además, el empleo de estos sustratos en la alimentación animal permitiría alargar su ciclo de vida contribuyendo a mitigar sus efectos en el medio ambiente y favoreciendo la soberanía alimentaria de modo sostenible.

7. REFERENCIAS

- Agrios G. N. (2005). Plant Pathology, Elsevier Academic Press, EE. UU. 922 pp.
- Alapin, H. (2008). Rastrojos y algo más. Historia de la siembra directa en Argentina. Buenos Aires: Editorial Teseo – Universidad de Belgrano.
- Alexopoulos, C., Mims, C., Blackwell, M. (1996). Introductory mycology In: 4th John Wiley and Sons.
- Aro N., Pakula T. & Penttilä M. (2005). Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. FEMS. Microbiology reviews. 29(4), 719-739.
- Álvarez, A. E. B., Guerra, I. E., Álvarez-Perdomo, G. R., & Villacis, M. L. M. (2022). Degradabilidad ruminal *in vitro* de zea mays. Revista De Investigación Talentos, 9(2), 77-83. <https://doi.org/10.33789/talentos.9.2.171>
- Andrade G. R. H., Mata G. S. (2012). La producción iberoamericana de hongos comestibles en el contexto internacional. 9-16.
- Aqueveque, P.; J. Becerra; G. Palfner; M. Silva; J. Alarcón; T. Anke; O. Sterner. (2006). «Antimicrobial Activity of Metabolites from Mycelial Cultures of Chilean Basidiomycetes», J. Chil. Chi. Soc. 51 (4): 1057-1060, Chile.
- Auerbach, H., Oldenburg, E., & Weissbach, F. (1998). Incidence of *Penicillium roqueforti* and roquefortin C in silages. *J. Sci. Food Agr.*, 76: 565-572.
- Avila, D., Bobadilla, A., Castrejón, F., Melgarejo, L., Meraz, E. (2017). Prácticas de Producción y Aprovechamiento de Forrajes. DNAB. UNAM. ISBN:978-607-02-9698-7
- Ball, D., Collins, M., Lacefield G., Martin, D., Mertens, K., Olson, D., Putnam, D., Wolf, W. (2001). Understanding Forage Quality. American Farm Bureau Federation Publication 1-01, Park Ridge, IL.
- Banda, C. (2010). Producción de compuestos secundarios como alternativa de cultivos tradicionales. Anales De La Universidad De Chile, 0(11). <https://doi.org/10.5354/0365-7779.2000.2511>
- Barr, D., Aust, S. (1994). Mechanisms white-rot fungi use to degrade pollutants. *Environ Sci Technol*; 28(2):78A-87A.
- Barthes, P. (1992). Role, transformations et devenir des lignines en melieu ruminal. These Doctorat de l' Unversitate Paul Sabatier

Borja, M., Reyes, L., Espinoza, J., Velez, A. (2016). Estructura y funcionamiento de la cadena productiva de esquilmos agrícolas como forraje en la región del Bajío, México. *Revista Mexicana de Agronegocios*, vol. XX, núm. 39, pp. 451-464. Sociedad Mexicana de Administración Agropecuaria A.C.

Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., Gontier, E. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Sci.* 161:839-851. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(01\)00490-3](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00490-3)

Candia-Sanchez, L. F., Álvarez-Cervantes, J., Díaz, R., & Díaz-Godínez, G. (2017). Uso potencial de biorreactores para la producción de lacasas de hongos basidiomicetos. *Mexican Journal of Biotechnology*, 2(1), 15-36. <https://doi.org/10.29267/mxjb.2017.2.1.15>

Castañeda F., y Monroy V. (1984). Métodos de procesamiento de subproductos agrícolas para elevar su valor nutricional. Chapingo, México: Centro de Ganadería, Colegio de Postgraduados.

Chaverra, H., Bernal, J. (2000). El ensilaje en la alimentación del ganado vacuno. IICA. Recuperado el 28 de noviembre de 2023 de: [El ensilaje en la alimentación del ganado vacuno \(iica.int\)](http://www.iica.int)

Chen, L., Gong, Y., Cai, Y., Liu, W., Zhou, Y., Xiao, Y., Ma, X. (2016). Genome sequence of the edible cultivated mushroom *lentinula edodes* (shiitake) reveals insights into lignocellulose degradation. *Plos One*, 11(8), e0160336. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160336>

Colina, A. (2016). Análisis fitoquímico, determinación cualitativa y cuantitativa de flavonoides y taninos, actividad antioxidante, antimicrobiana de las hojas de "Muehlenbeckia hastulata (J. E. Sm) I.M. Johnst" de la zona de Yucay (Cusco). Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

Collins P. J. & Dobson A. (1997). Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. *Applied and Environmental Microbiology*. 63(9), 3444-3450

Correa, L. (2008). Pastoreo de rastrojos de maíz y soja en cría bovina intensiva. Publicación Miscelánea Nº 41. EEA Oliveros, Centro Regional Santa Fe, Argentina: IMTA.

Correa, R., Da Silva, B., Castoldi, R., Kato, C., Sa-Nakanishi, A. y Peralta, R. (2016). Spent mushroom substrate of *Pleurotus pulmonarius*: a source of easily hydrolyzable lignocellulose. *Folia Microbiol*, 61(5): 439-48.

Correddu F., Lunesu M., Buffa G., Atzori A., Nudda A., Battacone G., Pulina G. (2020). Can Agro-Industrial By-Products Rich in Polyphenols be Advantageously Used in the Feeding and Nutrition of Dairy Small Ruminants? *Animals*. 10(1):131. <https://doi.org/10.3390/ani10010131>

- Dandapat, S., Sinha, M. (2015). Antioxidant and anti-inflammatory activity of *Pleurotus tuberregium* (Rumph. ex Fr.) Singer. *Adv. Biol. Res.* 9 (3), 140-145
- De Oliveira, J. S., Santos, E. M., & dos Santos, A. P. M. (2016). Intake and Digestibility of Silages. *InTech*. doi: 10.5772/65280
- Del Pozo, M. (1971). *La alfalfa: su cultivo y aprovechamiento*. MundiPrensa, Madrid
- Durazzo, A., Lucarini, M., Souto, E., Cicala, C., Caiazza, E., Izzo, A., Novellino, E., Santini, A. (2019) Polyphenols: A concise overview on the chemistry, occurrence, and human health. *Phytother Res.* 33:2221- 2243. <https://doi.org/10.1002/ptr.6419>
- Duthil, J. (1980). *Producción de forrajes*. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 303-369 pág.
- Elsakhawy T, ALKahtani MDF, Sharshar AAH, Attia KA, Hafez YM, Abdelaal KAA. (2020) Efficacy of Mushroom Metabolites (*Pleurotus ostreatus*) as A Natural Product for the Suppression of Broomrape Growth (*Orobanche crenata* Forsk) in Faba Bean Plants. *Plants (Basel)*. Sep 25;9(10):1265. doi: 10.3390/plants9101265. PMID: 32992725; PMCID: PMC7601409.
- Enzio, F., Mac, D., Cuyos, M., Dueñas, R. (2005). Extracción, identificación y evaluación de saponinas en *Agaricus bisporus*. *Biotempo*, vol. 5 31-36
- Eyhorn, F.; Heeb, M. y Weidmann, G. (2002). *Manual de capacitación en agricultura orgánica para los trópicos*. Bonn, Alemania: IFOAM/FiBL.
- Fang, C., Fernie, A., Luo, J. (2019) Exploring the diversity of plant metabolism. *Trends Plant Sci.* 24:83- 98. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.09.006>
- Feng, P., Hunt, C. W., Pritchard, G. T. y Julien, W. E. (1996). Effect of enzyme preparations on in situ and *in vitro* degradation and in vivo digestive characteristics of mature cool-season grassforage in beef steers. *Journal of Animal Science*, 74: 1349–1357.
- Field, J., Jong, E., Feijoo, G., de Bont, J. (1992) «Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by New Isolates of White Rot Fungi», *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2219-2226, EE. UU.
- Fondevila, M. (1998). Procesos implicados en la digestión microbiana de los forrajes de baja calidad. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 15 (1).
- Forano, E., Bera, C. (2003). Fibre degrading enzymes, their origin and diversity [on line]: Conference of Rumen microbial ecosystem Symposium. D[en línea] Conference of Rumen microbial ecosystem Symposium. Disponible en: <http://www.rkm.com.au/cell/plant/plantcellmembrane.html>

Forni, C., Facchiano, F., Bartoli, M., Pieretti, S., Facchiano, A., D'Arcangelo, D., Norelli, S., Valle G., Nisini, R., Beninati, S., Tabolacci, C., Jadeja, R. (2019) Beneficial role of phytochemicals on oxidative stress and age-related diseases. *BioMed Res Int.* 8748253:1-16. <https://doi.org/10.1155/2019/8748253>

Fuentes, J., Magaña, C., Suárez, L., Peña, R., Rodríguez, S. y Ortiz de la Rosa, B. (2001). Análisis químico y digestibilidad “*in vitro*” de rastrojo de maíz (*Zea mays* L.). *Agronomía Mesoamericana*, 12, 189-192.

García, A, Rivas, J, Rangel, J, Espinosa, JA, Barba, C, & De Pablos- Heredero, C. (2016). ‘A methodological approach to evaluate livestock innovations on small-scale farms in developing countries’, *Future Internet*, vol. 8, pp. 1–17

García, E., Fernández, S. (2007) Determinación de polifenoles totales por el método de Folin - Ciocalteu. Universidad Politécnica de Valencia.

García, U., Corona, L., Flores, J., Amesquita, A., Ronquillo, M. (2017). Digestión ruminal e intestinal del maíz (*Zea mays*) y Sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) utilizando diferentes técnicas de digestibilidad (in vivo, *in vitro* e in sacco). *Tropical and subtropical agroecosystems*. 20. 183-194.

Gardner, P.T., Wood, T.J., Chesson, A. & Stuchbury, T. (1999). Effect of degradation on the porosity and surface area of forage cell walls differing lignin content. *J. Sci. Food Agric.* 79: 11.

Garcés M., Berrio L., Ruíz S., Serna J., Buile A. (2004). Ensilaje como fuente de alimentación para el ganado. *Revista Lasallista de Investigación*, 1(1), 66-71.

Garzón, J. M., Miranda, J. P. R., & Gómez, H. (2017). Aporte de la biorremediación para solucionar problemas de contaminación y su relación con el desarrollo sostenible. *Universidad Y Salud*, 19(2), 309. <https://doi.org/10.22267/rus.171902.93>

Guerrero-Rodríguez, Juan de Dios, Muñoz-Tlahuiz, Faviola, López, Pedro Antonio, López-Sánchez, Higinio, Hernández Guzmán, J. Arahón, Gil-Muñoz, Abel. (2023). Digestibilidad del rastrojo de variedades locales de maíz en el altiplano Poblano-Tlaxcalteca. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 14(spe29), e3257. Epub 17 de noviembre de 2023. <https://doi.org/10.29312/remexca.v14i29.3527>

Gheshlagh, N., Paya, H., Taghizadeh, A., Mohammadzadeh, H., Palangi, V., Mehmannaavaz, Y. (2021). Efeitos comparativos dos polifenóis extraídos dos resíduos do chá preto e verde na fermentabilidade *in vitro* dos ingredientes da ração. *Semina: Ciências Agrárias*, 42(3Supl1), 2005–2022. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2021v42n3Supl1p2005>

Gómez, J. D., Monterroso, A. I., Toledo, M. L. y Tinoco, J. A. (2008). Sector Ganadero [en línea]. Universidad Nacional Autónoma de México [Consulta: 18 de octubre de 2013].

Gonzalez, L., Diaz, R., Castillo, C., Nieto, A., Méndez, D. (2017). Compuestos fenólicos: presencia, identificación y propiedades antioxidantes en plantas y frutos. *Mexican Journal of Biotechnology*, 2(1): 46-64. ISSN: 2448-6590

Hammel K. (1996) Extracellular free radical biochemistry of ligninolytic fungi. *New J Chem*;20 (2):195-198.

Hahn-Deinstrop, E. (2007). *Applied thin-layer chromatography: best practice and avoidance of mistakes*. John Wiley & Sons.

Hawksworth D. L. & Kalin-Arroyo M. T. (1995). Magnitude and distribution of biodiversity. *Global biodiversity assessment*. 107-199

Herrera T. & Ulloa M. (1990). *El reino de los Hongos. Micología básica y aplicada*. Universidad Nacional Autónoma de México.

Hibbett, D., *et al.* (2007). «A Higher Level Phylogenetic Classification of the Fungi», *Mycological Research* 111 (5): 509-547, Holanda.

Ick-Dong Y., Soo-Muk, C., Byeung-Wook P., Jae-Kuk Y., Nam-Doo H., Hwan-Mook K. & Chang-Woo L. (2005). Nuevo polisacárido inmunoestimulante procedente de la cepa de la especie *Phellinus*, y su uso. Patente 2241219

INECOL. (2017). Cultivo de hongos comestibles. 30/09/2019, de SEGOB y CONACYT, Sitio web: <https://www.inecol.mx/inecol/index.php/>

Infante, C., Cuadrado, B., De Arco, D., Perez, K., Barrera, E., & San Juan, M. (2016). Evaluación de tusa y cáscara de maíz como sustratos para el cultivo de *Pleurotus pulmonarius*. *Ciencia y Tecnología*, 32 (1), 31-46.

Jaramillo-López, Esaúl, Itza-Ortiz, Mateo F., Peraza-Mercado, Gwendolyne, & Carrera-Chávez, José M. (2017). Ruminal acidosis: strategies for its control. *Austral journal of veterinary sciences*, 49(3), 139-148. <https://dx.doi.org/10.4067/S0719-81322017000300139>

Jiménez, A., Rodríguez, R., Gonzalez, R. “Conservación de forrajes para mejorar la productividad del ganado”. Recuperado 15 de septiembre de 2022, de CONSERVACIONDEFORRAJES.pdf (jimenezmerino.com.mx)

Kirby, J., Aurilio, V., Mc Crae, S.J., Martín, J.C. & Flint, H.J. (1998). Plant cell wall degrading enzyme complexes from the cellulolytic rumen bacterium *Ruminococcus flavefaciens*. *Biochemical Society Transactions* 26: 169

Kirk, P. M.; P. F. Cannon; J. C. David; J. A. (2001) *Stalpers: Dictionary of the Fungi*, 9.a ed., CABInternational. Wallingford, Reino Unido, 655, pp.

Kirk, T. K.; R. L. Farrell (1987) «Enzymatic “Combustion”: the Microbial Degradation of Lignin», *Annu. Rev. Microbiol.* 41: 465-505, EE. UU.

Klopfenstein, T. (1980). Increasing the nutritive value of crop residues by chemical treatment. Animal Science Dept. University of Nebraska. Lincoln, Nebraska, USA. 81p.

Krause, D. O., Denman, S. E., Mackie, R., Morrison, M., Rae, A. L., Attwood, G. T. y McSweeney, C. S. (2003). Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology, and genomics. *FEMS Microbiology Reviews* 797: 1 – 31.

Kris-Etherton, P., Hecker, K., Bonanome, A., Coval, S., Binkoski, A., Hilpert, K., *et al.* (2002). Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *American Journal of Medicine* 113: 71-88.

Kuzhuppillymyal-Prabhakarankutty, L., Martínez-Meléndez, A., Cruz-López, F. (2023). Los metabolitos secundarios como agentes antimicrobianos. *Biología Y Sociedad*, 6(12), 33-40. <https://doi.org/10.29105/bys6.12-94>

Ledezma, W. (2018). Potencial de los forrajes para producir ensilaje de calidad. *Alcances Tecnológicos*, 12(1), 49-58. <https://doi.org/10.35486/at.v12i1.37>

Levin L., Forchiassin F. (2006) Aplicaciones biotecnológicas de los hongos lignocelulolíticos. *Industria y química. Revista de la Asociación Química Argentina.* ISSN 0368-0819 N. 352

Logan, V., Lister, E. (1971). *Grass silage for ruminants.* Agriculture Canada, Ottawa.

López-Herrera, M., Arias-Gamboa M., Alpizar-Naranjo A., Castillo-Umaña M. (2021). Calidad de fibra y producción de metano en ensilados de leguminosas con fuentes de carbohidratos. *Nutrición Animal Tropical* 15(2): 1-24 Julio-Diciembre. ISSN: 2215-3527 / DOI: 10.15517/nat.v15i2.47909

López, S., Guevara, H., Duchi, N., & Moreno, G. (2018). Evaluation of two "*in vitro*" digestibility tests with the "*in vivo*" test of alfalfa (*medicago sativa*) in guinea pig (*cavia porcellus*) feeding. *European Scientific Journal Esj*, 14(6), 399. <https://doi.org/10.19044/esj.2018.v14n6p399>

Lorenzana-Moreno AV, Leal Lara H, Corona L, Granados O, Márquez-Mota CC (2023) Production of 17 strains of edible mushroom grown on corn stover and its effect on the chemical composition and ruminal *in vitro* digestibility of the residual substrate. *PLoS ONE* 18(5): e0286514. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0286514>

López-Herrera, M. (2019). Informe final del proyecto 739-B7-069 “Degradabilidad *in vitro* del almidón en diferentes subproductos agrícolas e impacto sobre la producción de metano y parámetros de fermentación ruminal”. Universidad de Costa Rica. Costa Rica 11p.

Loyola, J. (2005). Química y síntesis de los principios activos aislados de hongos superiores: sus posibles aplicaciones farmacológicas. Tesis Doctoral. Universidad de La Laguna.

Lucas, S., Terrón, M., González, T., Zapico, E., Bocchini, P., Galletti, G., González, A. (2000). Biotreatment of tannin-rich beer-factory wastewater with white-rot basidiomycetecoriolopsis gallica monitored by pyrolysis/gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 14(10), 905-910. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0231\(20000530\)14:103.0.co;2-7](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0231(20000530)14:103.0.co;2-7)

Macedo, B. R. J. (2000). Análisis del sistema de alimentación pecuario rastrojo de maíz alimenticio pecuario (*Zea mays* L.) – pasto estrella (*Cynodon plectostachyus* P.) en la zona norte del estado de Colima. Tesis Doctoral. Universidad de Colima. Colima México. 126 p.

Machado, A. C., da Silva, D. A., de Castro, A. M., & Giordano, R. L. C. (2020). Challenges and perspectives in the production of lignocellulosic biomass hydrolyzing enzymes. *Biotechnology Advances*, 43, 107570. doi:10.1016/j.biotechadv.2020.107570

Makkar, H., Siddhuraju, P., Becker, K. (2007). Plant secondary metabolites. *Methods Molecular Biotechnology*; 393:1-122. doi: 10.1007/978-1-59745-425-4_1. PMID: 19238775.

Martin, Dario. (2018). Los Compuestos Fenólicos, Un Acercamiento A Su Biosíntesis, Síntesis Y Actividad Biológica. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*. 9. 10.22490/21456453.1968.

Matta, L. S. (2005). Estrategias modernas para la conservación de forrajes en sistemas de producción bovina tropical. *Ciencia Y Tecnología Agropecuaria*, 6(2), 69–80. https://doi.org/10.21930/rcta.vol6_num2_art:51

Mehrez, A. Z., Ørskov, E. R., & McDonald, I. (1977). Rates of rumen fermentation in relation to ammonia concentration. *British Journal of Nutrition*, 38(3), 437–443. <https://doi.org/10.1079/BJN19770108>

Meneses, J, Corrales, C, & Valencia, M. (2007). `Síntesis y caracterización de un polímero biodegradable a partir del almidón de yuca’, *Revista Escuela Ingeniería Antioquia*, vol. 8, pp. 57-67

Merry, R., Lowes, K., Winters, A. (1997). Current and future approaches to biocontrol in silage. En: Proceedings of the 8th International Symposium on Forage Conservation. (8: 1997: Pohorelice). Czech Republic: Research Institute of Animal Nutrition; 1997. p. 17-27.

Moore-Landecker J. (1996). Zoosporic fungi. Fundamentals of the fungi. In: 4th Prentice Hall, Totowa, NJ, 33-81.

Moraes, G., Ítavo, L., Ítavo, C., Dias, A., Niwa, M., Leal, E., Inada, A. (2019). extruded urea could reduce true protein source in beef cattle diets. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 103(5), 1283-1294. <https://doi.org/10.1111/jpn.13140>

Muck, R. (1996). Inoculation of silage and its effects on silage quality. Informational Conference with Dairy and Forage industries. US Dairy Forage Research Center. p.43

Muslera, P. y Ratera, G. (1984). Praderas y forrajes, producción y aprovechamiento. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 438-519 pág.

Nichols, L. (2017). Overview of Extraction. Organic Chemistry Laboratory Techniques. 2° Edition. pp. 201 Butte Community College.

Nielsen, S. (1998). Food Analysis Second Edition; An Aspen Publication, Gaithersburg, Maryland.

Nigam, P., Gupta, N., Anthwal, A. (2009). Pre-treatment of agro-industrial residues. In: Nigam PS, Pandey A, editors. Biotechnology for agro-industrial residues utilization. First ed. Netherlands: Springer, 13–33p.

Noguera RR, Ramírez IC, Bolivar DM. (2006). Efecto de la inclusión de papa (*Solanum tuberosum*) en la cinética de fermentación *in vitro* del pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*). Lives Res Rural Develop; 18(5). URL Disponible en: <http://www.lrrd.org/lrrd18/5/nogu18062.htm>.

Nollet, L. (1996). Handbook of food analysis. New York.M. Dekker.

Nout, M., Bouwmeester, H., Haaksma, J., van Dijk, H. (1993). Fungal growth in silages of sugar beet press pulp and maize. *J. Agr. Sci.*, 121: 323-326.

Núñez, D. (2012). Uso de residuos agrícolas para la producción de biocombustibles en el departamento del Meta. *Tecnura*, 16, 142-156

Official Methods of Analysis de la Association of Official Analytical Chemist (A.O.A.C) (2015).

Oksman-Caldentey, K., Inze, D. (2004) Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. *Trends Plant Sci.* 9:433-440. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.07.006>

Orozco, E. (2019) “Caracterización y evaluación de la digestibilidad *In Vitro* del sustrato residual de rastrojo de maíz empleado para la producción de hongos gourmet (*Lentinula edodes* y *Hericium sp*)”. Tesis Licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.

Ørskov, E., McDonald, I. (1979). The estimate of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighed according to rate of passage. *J. Agric. Sci.*, 92: 499-503.

Ortiz M. L. (2009). Aproximaciones a la comprensión de la degradación de la lignina. *Orinoquia.* 13(2), 137-144.

Oude, S., Driehuis, F., Gottschal, J., Spoelstra, F. Los procesos de fermentación del ensilaje y su manipulación. Institute for Animal Science and Health. FAO. Recuperado en línea el 08 noviembre de 2023 de: (fao.org)

Pardo, G., Martín-García, I., Arco, A., Yañez-Ruiz, D., Moral, R., Del Prado, A. (2016). Greenhouse-gas mitigation potential of agro-industrial by-products in the diet of dairy goats in Spain: a life-cycle perspective'. *Animal Production Science* , vol. 56, nº 3, pp. 646-654

Pearson, D. (1993). Técnicas de laboratorio para el análisis de alimentos. S.A. Zaragoza. España: Acribia.

Piña-Guzmán, A., Monteros, D., Robles-Martínez, F. (2016). Utilización de residuos agrícolas y agroindustriales en el cultivo y producción del hongo comestible seta (*pleurotus spp.*). *Revista Internacional De Contaminación Ambiental*, 32(Residuos sólidos), 141-151. <https://doi.org/10.20937/rica.2016.32.05.10>

Pitt, R., Cross, T., Pell, A., Shofield, P., Doane, P. (1999). Use of in vitro gas production models in ruminal kinetics. *Math. Biosci.* 159: 145–163.

Posada, S., Noguera, R. (2005). Técnica *in vitro* de producción de gases: Una herramienta para la evaluación de alimentos para rumiantes. *Livestock Research for Rural Development. Vol. 17, Art. 36.* Consultado el 16 de diciembre de 2023 desde: <http://www.lrrd.org/lrrd17/4/posa17036.htm>

Postemsky, P., López-Castro, R. (2016). Aplicaciones de sustrato residual del cultivo de hongos en la producción hortícola. *Horticultura Argentina* 35(86): 44-63.

Pozo-Leyva, Dixan, Chay Canul, Alfonso, López-González, Felipe, Cruz-Tamayo, Alvar A., Piñeiro-Vázquez, Ángel, & Casanova-Lugo, Fernando. (2021). Análisis productivo de la suplementación con ensilado de maíz en sistemas ganaderos de doble propósito. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 8(3), e3092. Epub 31 de octubre de 2022. <https://doi.org/10.19136/era.a8n3.3092>

Quintero, D., Juan, C., Feijoo, C., Lema, R., Juan, M. (2006). Producción de enzimas ligninolíticas con hongos basidiomicetos cultivados sobre materiales lignocelulósicos. *Vitae Medellín*. 13(2), 61-67

Ramírez, R., Ramírez, R.G., López, F. (2002). Factores estructurales de la pared celular que afectan su digestibilidad. *CIENCIA UANL*.5:18

Rangel, J, Espinosa, JA, De Pablos-Heredero, C, Rivas, J, Perea, J, Angón, E, García, A. (2017). `Is the increase of scale in the tropics a pathway to smallholders? Dimension and ecological zone effect on the mixed crop-livestock farms', *Spanish Journal of Agricultural Research*, vol. 15, nº 2, pp 1-10

Ratnaningtyas, N., Hernayanti, H., Ekowati, N., Husen, F., Maulida, I., Kustianingrum, R., Vidiyanti, V. (2022). Antioxidant activities and properties of coprinus comatus mushroom both mycelium and fruiting body extracts in streptozotocin-induced hyperglycemic rats model. *Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education*, 14(1), 9-21. <https://doi.org/10.15294/biosaintifika.v14i1.34244>

Rayners A. D. M. & Buddy L. (1988). Fungal communities in the decay of wood. *Advances. Microbiology. Ecol.* 10, 115-166.

Rees, T. (1997). The development of a novel antifungal silage inoculant. Review of literature. Doctoral Research Thesis. Cranfield University Biotechnology Centre, U.K.32 p.

Reis, F. S., Martins, A., Barros, L., & Ferreira, I. C. (2012). Antioxidant properties and phenolic profile of the most widely appreciated cultivated mushrooms: A comparative study between in vivo and *in vitro* samples. *Food and chemical toxicology*, 50(5), 1201-1207

Reyes, C. (2013). Propiedades antifúngicas diferenciadas de extractos vegetales como estrategia potencial para la prevención, manejo y control del "moho verde" (*Trichoderma* spp.) en el cultivo de hongos comestibles (*Lentinula*, *Pleurotus*). Tesis Doctoral. Colegio de Posgraduados, campus Puebla. Recuperado de: [Reyes-Quintanar, C. K. 2013 \(colpos.mx\)](https://colpos.mx) el 06 de noviembre de 2023.

Reyes, L., Camacho, T. y Guevara, F. (2013). Rastrojos: manejo, uso y mercado en el centro y sur de México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Libro Técnico Núm. 7. Aguascalientes, México: Pabellón de Arteaga.

Rivas, J., De Pablos-Heredero, C., Angón, E., García, A. (2019a), 'Canonical correlation of technological innovation and performance in sheep's dairy farms: Selection of a set of indicators', *Agricultural Systems*, vol. 176, pp. 102665

Rivas, J., De Pablos-Heredero, C., Angón, E., García, A. (2019b). 'Role of technological innovation in livestock breeding programmes: a case of cereal-sheep system', *Italian Journal of Animal Science*, vol. 18, nº 1, pp. 1049-1057

Rizki M., Tamai Y. (2011) Effects of different nitrogen rich substrates and their combination to the yield performance of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27 (7): 1695-1702.

Rodríguez, G., Martínez, D., Buglione, M., Filippi, M., Agüero, M. (2018). Cultivo de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer sobre orujo de pera: Evaluación de la productividad y composición química del sustrato biodegradado. *Universidad de Murcia; Anales de Biología*; 40; 21-30

Rosales, R., Pinzón, S. (2005). Limitaciones físicas y químicas de la digestibilidad de pastos tropicales y estrategias para aumentarla. *Ciencia Y Tecnología Agropecuaria*, 6(1), 69–82. https://doi.org/10.21930/rcta.vol6_num1_art:39

Salgado, L. (2011). Digestibilidad in situ de dietas con dos esquilmos agrícolas como fuente de fibras tratadas con una celulasa. Benemerita Universidad Autonoma de Puebla. Tesis profesional para obtener el título de Licenciatura en Ingeniería Agronómica y Zootecnia. Recuperado el 02 de noviembre de 2023 de: [content \(buap.mx\)](http://content.buap.mx)

Saenz-Plaza, P., Garcia A., Martin, J. (2019). An annotation on the Kjeldahl method. *ANALES RANF [Internet]. Royal National Academy of Pharmacy; An Real AcadFarm*, volume 85, issue 01:14-19.

Sánchez, A., Ortega, C., Mendoza, M., Montañez, V., Buntinx, D. (2012). Rastrojo de maíz tratado con urea y metionina. *Interciencia*, 37(5), 395-399.

Sánchez, A., Perea, J., Montenegro, L., Espinoza, I., Avellaneda, J., Barba, C. (2020). Cinética de degradación ruminal in situ de ensilado de rastrojo de maíz (zea mays) con niveles crecientes de urea. *Archivos de Zootecnia*, 69(267), 320-326. <https://doi.org/10.21071/az.v69i267.5351>

Sánchez, L.; Báez, F. (2002). Conservación de forrajes en sistemas de producción bovina del trópico de altura. En: *Alternativas tecnológicas para la producción competitiva de leche y carne en el trópico bajo. Plan de Modernización de la Ganadería Bovina Colombiana. CORPOICA, MADR, FEDEGAN, Fondo Nacional del Ganado*. p.17

Sánchez, C. (2010). Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85(5): 1321-1337

Sánchez, H. (2022). Los superpoderes de las plantas: los metabolitos secundarios en su adaptación y defensa. *Revista Digital Universitaria*, 23(2). <https://doi.org/10.22201/cuaieed.16076079e.2022.23.2.10>

Santos, MVF, Gómez-Castro, AG, Perea, JM, García, A, Guim, A & Pérez-Hernández, M. (2010). `Factores que afetam o valor nutritivo da silagens de forrageiras tropicais', *Archivos de Zootecnia* , vol. 59 (R), pp. 25-43

Schneider, C., Castagnara, D., Fernandes, T., Neres, M. (2021). Aerobic stability of tifton 85 silage with and without pre-drying in the sun. *Bioscience Journal*, 37, e37060. <https://doi.org/10.14393/bj-v37n0a2021-54036>

Scossa, F., Fernie, A. (2020) The evolution of metabolism: How to test evolutionary hypotheses at the genomic level. *Comput Struct Biotechnol J*. 18:482-500. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.02.009>

Scudamore, K., Livesey, C. (1998). Occurrence and significance of mycotoxins in forage crops and silage: a review. *J. Sci. Food Agr.*, 77: 1-7

SIACON-SIAP. (2012). Sistema de Información Agroalimentaria de Consulta, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). <http://www.siap.gob.mx/>.

Silveira, E., Franco, R. (2006). Conservación de forrajes: segunda parte. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, VII(11), 1-37.

Smânia, A.; C. Marques; E. Smânia; C. Zanetti; S. Carobrez; R. Tramonte; C. Loguercio-Leite. (2003) «Toxicity and Antiviral Activity of Cinnabarin Obtained from *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr.» , *Phytother. Res.* 17: 1069-1072, EE. UU.

Solís, C. (2016). Presencia de hongos y contaminación con micotoxinas en ensilajes para alimentación de rumiantes. artículo de revisión. *Revista Ciencias Veterinarias*, 33(1), 7. <https://doi.org/10.15359/rcv.33-1.1>

Sousa, D.O. (2017). Alteration of fiber digestibility for ruminants: effects on intake, performance, and ruminal ecosystem. Tesis Ph.D. Universidad de São Paulo. Brasil.

Suárez-Medina, K., Coy-Barrera, E. (2016). Diversidad de los compuestos orgánicos bioactivos de origen natural: una singularidad manifestada por la plasticidad en el metabolismo secundario. *Revista Facultad De Ciencias Básicas*, 12(2), 252–269. <https://doi.org/10.18359/rfcb.2031>

Südekum, K.H., Oestmann, A. & Stanggassinger, M. (1995). Role of lignin and phenolic monomers in feedstuffs for ruminants. II. Effects on digestion of plant cell wall components. *UBERS. TIERNÄHRUNG*. 23: 229.

Ten-Have, R., Teunissen, P. (2001). Oxidative mechanisms involved in lignin degradation by white-rot fungi. *Chemical Reviews* 101(11): 3397-414

Tetali, S. (2019). Terpenes and isoprenoids: a wealth of compounds for global use. *Planta*. 249:1-8. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-3056-x>

Theodorou, M., Williams, B., Dhanoa, M., McAllan, A., France, J. (1994). A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*. 48: 185-197.

Tuomela, M.; M. Vikman; A. Hattaka M. Itävaara: «Biodegradation of Lignin in a Compost Environment: a Review», *Bioresearch & Technology* 72: 169-183, China, 2000.

Valares-Masa, C. (2011). Variación del metabolismo secundario en plantas debida al genotipo y al ambiente [Memoria para obtener el grado de doctorado en Ciencias, Universidad de Extremadura, España]. Repositorio Institucional. <https://biblioteca.unex.es/tesis/9788469494332.pdf>.

Valencia, A., Hernández, A., López, L. (2011). El ensilaje: ¿qué es y para qué sirve? *Revista de divulgación científica y tecnológica de la Universidad Veracruzana*, XXIV (2) ISSN 0187 8786. <https://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol24num2/articulos/ensilaje/>

Valencia Ramírez, A. F. (2016). Los ensilajes una mirada a esta estrategia de conservación de forraje para la alimentación animal en el contexto colombiano. Retrieved from <https://ciencia.lasalle.edu.co/zootecnia/261>

Valenciaga, D., & Chongo, B. (2004). La pared celular. Influencia de su naturaleza en la degradación microbiana ruminal de los forrajes. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 38(4), 343-350.

Van, S., Robertson, J., Lewia, B. (1991). Methods for fiber, neutral detergent fiber and non starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Science*. 74: 3583-97

Van Soest, P.J. (1994). *Nutritional ecology of the ruminant*. 2a. ed., Ithaca. Cornell University Press, 476 p.-

Velásquez, V., Noguera, R., Ricardo, R., Posada, O. (2013). Procesamiento del grano de maíz sobre la cinética de degradación de la materia seca *in vitro*. *Revista MVZ Córdoba*, 18(3), 3877-3885. Retrieved February 27, 2024, from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-02682013000300018&lng=en&tlng=es

Villegas, G., Bolaños, A. y Olgún, P. (2001). *La ganadería en México*. (Plaza y Valdez, Ed.) (Primera edición., p. 163). México.

Waldron, K., Parker, M., Smith, A. (2003). Plant Cell Walls and Food Quality. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2: 128-146. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2003.tb00019>

Wariishi, H., Valli, K., Gold, M. (1992). Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Kinetic mechanism and role of chelators. *Journal of Biological Chemistry*. 267(33), 23688-23695.

Waldo, D.R. (1977). Potential of chemical preservation and improvement of forages. *Journal of Dairy Science* 60; 306 – 326.

Williams, K. (2003). The physiological and morphological effects of grazing on grasses. [en línea] An invitational Conference. Disponible en: <http://www.grc.uri.edu/programs/2003.html>

Wortmann, C., Klein, R. N. and Shapiro, C. A. (2012). Harvesting crop residues [en línea]. [Consulta: septiembre de 2023]. Disponible en: <http://www.ianrpubs.unl.edu/live/q1846/build/q1846.pdf>

Yazaki, K. (2004). Natural Products and Metabolites. In: Klee, H. and Christou, P., (Eds.) *Handbook of Plant Biotechnology*. John Wiley & Sons Ltd. 811–857 pp.