



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales
Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

PRODUCCIÓN DE ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS POR BASIDIOMICETES
INCUBADOS EN RASTROJO DE MAÍZ Y ANÁLISIS DE LA BIOMASA
RESULTANTE COMO ALIMENTO EN RUMIANTES

Tesis para obtener el grado de Maestra en Ciencias Biológicas

Presenta

MVZ. Sierra Aguilar Yveet

Asesor

Dr. José Herrera Camacho

Co-Asesor

Dr. Gerardo Vázquez Marrufo

Morelia, Michoacán, agosto del 2018.

**PRODUCCIÓN DE ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS POR BASIDIOMICETES
INCUBADOS EN RASTROJO DE MAÍZ Y ANÁLISIS DE LA BIOMASA
RESULTANTE COMO ALIMENTO EN RUMIANTES**

Presenta.

MVZ. Yveet Sierra Aguilar

Asesor

Dr. José Herrera Camacho

Co-Tutor

Dr. Gerardo Vázquez Marrufo

Mesa Tutorial:

Dr. José Herrera Camacho, Dr. Gerardo Vázquez Marrufo, Dra. Liliana Márquez Benavides,
Dra. María José Ranilla García, Dra. Ma. Soledad Vázquez Garcidueñas.

Agradecimientos

Muchos son los fragmentos que custodian el sabor de la felicidad al culminar un proyecto, entre ellos resalto la compañía de mi amada familia, la inspiración de los nuevos y veteranos amigos durante la travesía, el conocimiento que me donaron mis asesores, las limitaciones a las que me enfrente, por supuesto las reflexiones que arremetieron sobre mi pensamiento y el dolor de la pérdida de un buen camarada, Chucho, a quien siempre recuerdo con amor.

A los impasibles

El mejor remedio contra la opresión

es fermentar rebeliones

con el pensamiento.

Quin oc ca tlamati noyollo:

Yehua niccaqui in cuicatl,

nic itta in xochitli:

maca in cuetlahuiya

Por fin lo comprende mi corazón:

Escucho un canto,

Contemplo una flor:

¡Ojalá no se marchiten!

-Nezahualcóyotl

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS.....	9
ÍNDICE DE FIGURAS.....	10
RESUMEN.....	12
SUMMARY	13
INTRODUCCIÓN.....	14
ANTECEDENTES	16
HIPÓTESIS	22
OBJETIVOS.....	22
Objetivo general	22
Objetivos particulares.....	22
MATERIAL Y MÉTODOS.....	23
Material biológico.....	23
Medios de cultivo	23
Obtención de inóculos	23
Condiciones de cultivo	24
<i>Ensayos de fermentación en medio líquido</i>	24
<i>Ensayos de fermentación en sustrato sólido (FSS)</i>	25
Determinación de las actividades enzimáticas de Lac y MnP	25
Análisis de la composición química de la fermentación líquida.....	26
Valoración nutritiva de los sustratos como alimento para ganado rumiante.....	26
<i>Análisis de la composición química de la fermentación sólida</i>	26
Evaluación de la producción de gas <i>in vitro</i>	27
Digestibilidad verdadera y aparente de la FDN <i>in vitro</i>	27
Análisis de la producción de CH ₄	28
Análisis de producción de Ácidos Grasos Volátiles (AGV's)	28
Análisis de producción de amoníaco (NH ₃ -N)	29
Diseño experimental y análisis estadístico.	29
Actividades enzimáticas en medio líquido.....	31
<i>Lacasa</i>	31
<i>Manganeso Peroxidasa</i>	34
Composición química del rastrojo obtenido de los ensayos de fermentación en medio líquido	39
Actividad enzimática en ensayos de fermentación en sustrato sólido (FSS).....	42

<i>Lacasa</i>	42
<i>Manganeso Peroxidasas</i>	44
Composición química del rastrojo residual obtenido de los ensayos de fermentación en sustrato sólido.	46
Fermentación ruminal <i>in vitro</i>	50
<i>Producción de gas</i>	50
Digestibilidad aparente (DIV), verdadera (TDIV) y de la FDN (dFDN) <i>in vitro</i>.	52
Producción de Metano, AGV's y Amoníaco (NH₃-N)	53
CONCLUSIONES	56
PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES.	57
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

ÍNDICE DE TABLAS

Número	Nombre	pp.
1	Composición química de la pared celular del rastrojo de maíz tratado con diferentes basidiomicetos después de 5 y 10 días de incubación en medio líquido.	40
2	Análisis químico del rastrojo de maíz tratado con distintas cepas de hongos basidiomicetes.	47
3	Pérdida de componentes celulares del rastrojo de maíz inoculado con hongos basidiomicetos a distintos tiempos.	48
4	Digestibilidad aparente (DIV), verdadera (TDIV) y de la FDN (dFDN) de los tratamientos de rastrojo de maíz con hongos de pudrición blanca a 24 h de incubación en base seca (MS).	52
5	. Acumulación de gas, producción de metano y amoníaco (NH ₃ -N) del tratamiento de rastrojo de maíz con distintas cepas de basidiomicetes después de 24 h de incubación.	54
6	Producción de ácidos grasos volátiles (AGV's) de los tratamientos de rastrojo de maíz con hongos basidiomicetes a las 24 h de incubación.	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Número	Nombre	pp.
1	Crecimiento del micelio de cepas de basidiomicetos en medio agar papa dextrosa (PDA). Dichas colonias fueron la fuente de inóculos para los ensayos en medios CR (Caldo de Rastrojo), PDB (<i>Caldo papa dextrosa</i>) y MSF (<i>Medio solido rastrojo</i>).	24
2	Ejemplo de la segmentación del micelio de las cepas de estudio para la inoculación del rastrojo en ensayos de fermentación en sustrato sólido.	24
3	Actividad enzimática de lacasa de <i>T. versicolor</i> (a) y <i>Ganoderma sp.</i> (b) en medio PDB y CR (6.6 % (p/v). Los cultivos se incubaron a 28 °C y 120 rpm.	31
4	Actividad enzimática de MnP de <i>T. versicolor</i> (a), <i>Ganoderma sp.</i> (b), <i>I. lacteus</i> (c) y <i>Phlebiopsis sp.</i> (d) en medios PDB y CR (6.6% p/v). Los cultivos se incubaron a 28 °C y 120 rpm	36
5	Actividad enzimática de MnP y lacasa y la relación de componentes celulares del rastrojo de maíz inoculado con <i>T. versicolor</i> (a), <i>Ganoderma sp.</i> (b), <i>I. lacteus</i> (c) y <i>Phlebiopsis sp.</i> (d) en medio CR (6.6% p/v). FDN: Fibra Detergente Neutro, CNE: Carbohidratos No Estructurales, MnP: Manganese peroxidasa.	41
6	Actividad enzimática de lacasa de <i>T. versicolor</i> y <i>Ganoderma sp.</i> inoculado con rastrojo de maíz en medio sólido. Los cultivos se incubaron sin agitación a 28 °C.	43

7	Actividad enzimática de MnP de <i>T. versicolor</i> , <i>Ganoderma sp.</i> , <i>I. lacteus</i> y <i>Phlebiopsis sp.</i> inoculados con rastrojo de maíz en medio sólido. Los cultivos se incubaron a 28 °C.	45
8	Producción de gas <i>in vitro</i> a 144 h de los tratamientos de rastrojo de maíz con hongos de pudrición blanca.	51

RESUMEN

Se analizó la inducción enzimática extracelular de lacasa (Lac) y manganeso peroxidasa (MnP) de los basidiomicetes: *Trametes versicolor*, *Irpex lacteus*, *Ganoderma sp.* y *Phlebiopsis sp.* inoculados en rastrojo de maíz (*Zea mays* L.), en medio líquido (ML) y sólido (FSS). Cuantificando los cambios químicos de la pared celular del pretratamiento resultante y su desempeño *in vitro* como alimento para rumiantes. La producción de enzimas fue mayor en ML en comparación al FSS. La mayor producción de Lac y MnP la tuvo *T. versicolor*, aumentando su producción 27 y 34 veces respectivamente ($P \geq 0.05$). *I. lacteus* y *Phlebiopsis sp.* no presentaron actividad de Lac. Hubo cambios en la pared celular en ambos medios de cultivo. En SSF la mayor pérdida de lignina fue con *Ganoderma sp.* en 2.29 %. Disminuyó la cantidad de carbohidratos no estructurales en el rastrojo inoculado con las cepas de 10 a 20%. La biomasa resultante se sometió a fermentación ruminal por la técnica de producción de gas *in vitro*, donde disminuyó la digestibilidad verdadera 54% en el rastrojo tratado con *I. lacteus*, aumentando la producción de metano comparado con el control ($P \geq 0.05$). Lo anterior muestra que el rastrojo de maíz induce la actividad enzimática de Lac y MnP. Debido a la pérdida de carbohidratos no estructurales, la biomasa resultante es de poco valor nutricional de acuerdo a los valores de fermentación *in vitro* para los rumiantes. No se descarta que en estudios posteriores, modificando las condiciones de cultivo y con las cepas de hongos aquí empleadas, incrementen el valor nutricional del rastrojo de maíz para su uso en la alimentación de rumiantes.

Palabras clave: basidiomicetes, lignina, pretratamiento, esquilmo agrícola, enzimas ligninolíticas.

SUMMARY

Extracellular Laccase (Lac) and Manganese (MnP) enzyme production was evaluated from the strain of basidiomycetes: *Trametes versicolor*, *Irpex lacteus*, *Ganoderma sp.* and *Phlebiopsis sp.*, they were inoculated in corn stover (*Zea mays* L.), in liquid medium (ML) and solid-state fermentation (SSF) assay. Chemical changes on the cell wall after fungal corn stover pretreatment were quantified and their performance *in vitro* for ruminal feed applications. The activity of Lac and MnP was significantly lower in FSS assays. Maximum Lac and MnP production was detected on *T. versicolor*, folded 27.79 and 32 times respectively ($P \geq 0.05$). *I. lacteus* and *Phlebiopsis sp.* did not show Lac activity. There were changes in cell wall in both mediums. *Ganoderma sp.* caused the higher delignification with 2.29%. There was a loss from 10 to 20% of non-structural carbohydrates. The resulting biomass was subjected to ruminal fermentation by the gas production *in vitro* technique, decreasing the true digestibility 54% in corn stover with *I. lacteus*, increased the methane production compared with control ($P \geq 0.05$). The results show that corn stover induces activity of Lac and MnP. Also there is a loss of non-structural carbohydrates, decreasing their nutritional quality, according to the ruminal fermentation values *in vitro*. It is not rejected that subsequent studies with modified incubation conditions in order to optimize the delignification of the corn stover by the strains of the study, increase the nutritional value of corn stover for feeding of ruminants.

Key words: basidiomycetes, lignin, pretreatment, agricultural waste, ligninolytic enzymes.

INTRODUCCIÓN

El maíz (*Zea mays* L.) es uno de los principales cultivos de México, con una producción calculada de 44 millones de toneladas en el año 2017 (SIAP, 2017). Se estima que en la producción de dicho cereal se obtiene un kg de rastrojo por cada kg cosechado (Macedo, 2000), constituyendo así el 63% del total de residuos agrícolas del país (SIAP, 2014). Este subproducto es utilizado como insumo para satisfacer la demanda de forraje para la alimentación de los rumiantes como bovinos, ovinos, caprinos, entre otras especies (Graminha *et al.*, 2008), especialmente durante la temporada de estiaje cuando la cantidad y calidad de forrajes disminuyen.

Los rumiantes, gracias a la simbiosis que establecen en su sistema digestivo con microorganismos como bacterias, hongos y protozoarios, pueden aprovechar los polisacáridos de la pared celular de las plantas como celulosa y hemicelulosa, convirtiéndolos en azúcares simples. Entre los polímeros que conforman la pared celular vegetal, la lignina puede constituir del 20 al 30%, representando una de las limitantes más importantes para el aprovechamiento del rastrojo como alimento animal (Chaturvedi y Verma, 2013), pudiendo incluso disminuir la digestión y el aprovechamiento de nutrientes (Arora *et al.*, 2011). Por esta razón, se han empleado métodos físicos, químicos y biológicos para eliminar el contenido de lignina de la biomasa vegetal, con el objetivo de mejorar la calidad nutricional del rastrojo de diferentes especies vegetales, haciendo accesibles los polisacáridos a la degradación de la microbiota ruminal.

Los tratamientos mecánicos de molienda o picado de rastrojo que se acompañan de tratamientos químicos presentan un aumento en la digestibilidad que va del 5 al 13% (Liu *et al.*, 1999; Fuentes *et al.*, 2001). No obstante, el uso de sustancias alcalinas como el NH₃ puede llegar a intoxicar al animal (Sundstol y Owen, 1984). En relación al tratamiento biológico, el pretratamiento de los esquilmos agrícolas con hongos basidiomicetos es un método sin repercusiones en la salud animal, reportando incrementos en la digestibilidad del rastrojo de 10% a 30% (Okanoa *et al.*, 2009; Sharma y Arora, 2010; Shrivastava *et al.*, 2012). La habilidad de los hongos del grupo Basidiomycota para degradar lignina se basa en su capacidad para secretar enzimas extracelulares oxidativas como lacasa (Lac), lignin peroxidasa (LiP), manganeso peroxidasa (MnP) y peroxidasa versátil (PV), las cuales atacan tanto las estructuras fenólicas como no fenólicas de la lignina (Pointing, 2001; Tian *et al.*, 2012; Soccol *et al.*, 2017).

El patrón de actividad de estas enzimas, y por lo tanto la delignificación de la pared celular vegetal, depende del género y especie de hongo, la estructura particular de la lignina de acuerdo a la especie vegetal y la edad de la planta, así como de las condiciones de cultivo que se emplean para que el hongo crezca sobre el material vegetal (Moldes *et al.*, 2004; Ding *et al.*, 2012; Fang *et al.*, 2015). Lo anterior se refleja en una gran variabilidad de resultados de delignificación que se reporta en distintos estudios, documentándose pérdidas de lignina de 46.7% en rastrojo de maíz con *Irpex lacteus*, hasta menos de 1% con *Ganoderma lobatum* (Saha *et al.*, 2016). En el caso de paja de trigo, se han reportado valores de delignificación desde un 11.7% con *G. lucidum*, hasta un 62.4% con *T. versicolor* (Tuyen *et al.*, 2012). Por lo anterior, es importante buscar la mejor relación cepa fúngica/material vegetal con la finalidad de obtener resultados óptimos en el proceso de delignificación (Saha *et al.*, 2016).

En términos del proceso de delignificación del rastrojo destinado a la alimentación de rumiantes, la mayoría de los estudios evalúan el tratamiento fúngico empleando como sustrato a la paja de trigo (Tuyen *et al.*, 2012; Shrivastava *et al.*, 2012); aunque también se han analizado esquilmos de arroz, cedro o bamboo (van Kuijk *et al.*, 2015). Así mismo, los trabajos en los que se emplea rastrojo de maíz se limitan a evaluar su delignificación (Yang *et al.*, 2010; Song *et al.*, 2013; Tirado-González *et al.*, 2016) sin abordar aspectos sobre los patrones de fermentación ruminal *in vitro* del material vegetal tratado; algo importante para determinar el valor nutritivo de los alimentos para rumiantes (Goering y Van Soest 1970; Theodorou, 1994)

Por lo anterior, en el presente trabajo se evaluó la delignificación del rastrojo de maíz (*Zea mays* L.) mediante el empleo de cepas de las especies de basidiomicetes *I. lacteus*, *T. versicolor*, *Phlebiopsis sp.*, *Ganoderma sp.* Se determinó la capacidad de dichas cepas para producir enzimas ligninolíticas extracelulares en presencia de rastrojo de maíz y se analizó el valor nutricional final y parámetros de fermentación ruminal *in vitro* de la biomasa resultante del tratamiento con las cepas fúngicas de estudio.

ANTECEDENTES

Los residuos de la cosecha de distintas especies plantas de relevancia agrícola o comercial, denominados genéricamente esquilmos, pajas, zacates, pasturas y hasta basura agrícola, desempeñan un papel preponderante en los sistemas mixtos agrícolas y pecuarios del mundo. En México, el mayor volumen de rastrojo se obtiene de los cereales, principalmente del maíz (*Zea mays* L.), el cual es el más cultivado ya que constituye la base en la alimentación de la población del país. Su producción anual es de 28, 250, 783 ton, creciendo anualmente un 14.4 %. Además, se cosecha maíz forrajero para el ganado, con una producción de 16,164, 604 ton y un crecimiento anual del 13.2% (SIAP, 2017). Como es lógico, la cantidad de rastrojo se asocia con la cantidad del producto cosechado (Sánchez *et al.*, 2012) y conforme aumenta la cantidad de grano para satisfacer la demanda alimenticia de la población y el maíz forrajero usado para el ganado, aumenta su disponibilidad (Macedo, 2000).

De acuerdo con varios autores, los distintos tipos de rastrojo tienen tres usos fundamentales:

1. Para mejorar y conservar los suelos agrícolas, ya que son la principal fuente de cobertura del suelo en la agricultura en laderas, representando una de las tecnologías más efectivas para regular la humedad y temperatura del mismo, amortiguar la erosión hídrica, y en el control de la maleza, aportando materia orgánica (MO) y nutrientes al suelo (Eyhorn *et al.*, 2002).
2. Es la materia prima para la fabricación de textiles, papel y espesantes, siendo utilizado también como recurso para la producción de energía renovable como biocombustibles (Cosgrove, 2005; Chen *et al.*, 2013).
3. Constituyen un insumo para la alimentación de rumiantes, ya sea en pastoreo directo, o bien cortado, picado y empacado, suministrado como suplemento económico en la dieta de los animales, sobre todo en tiempo de sequías (Graminha *et al.*, 2008).

Una de las principales limitantes para el empleo del rastrojo en algunos de los rubros anteriormente mencionados es la estructura lignocelulósica que compone su pared celular. Los polímeros mayoritarios de dicha estructura son celulosa, hemicelulosa y lignina (Sun *et al.*, 2011). Mientras que los primeros dos son polisacáridos con diferencias en la composición monomérica y de complejidad estructural, la lignina es un heteropolímero polifenólico con gran

variación en los tipos de enlaces de sus unidades básicas. El contenido y proporción de estos tres polímeros varía dependiendo de la especie vegetal, pero también dentro de una misma especie dependiendo del tejido y el estado fenológico de la planta. Así, los constituyentes lignocelulósicos varían entre plantas herbáceas y arbóreas, incluso entre especies de estos grupos, así como de factores bióticos y abióticos, incluyendo estrés medioambiental (Falace *et al.*, 2017).

En el rastrojo de maíz de variedad no identificada se reporta una composición de 36.3-38.4% celulosa, 23-31.4% hemicelulosa y 17.2-20.2% de lignina (Wan y Li, 2010; Saha *et al.*, 2016). La heterogeneidad estructural de la hemicelulosa permite desglosar el porcentaje anterior en 18.5-24.5%, principalmente xilanos y en menor cantidad por arabinoxilanos y mananos. Por otra parte, el tallo está conformado de 35 tipos de células vegetales, las cuales varían en tamaño, forma, posición y características de la pared celular, dando como resultado una conformación o lignificación diferente (Cosgrove, 2005). Adicionalmente, en plantas maduras el contenido de lignina es mayor que en plantas juveniles; por ejemplo, el tallo del rastrojo de maíz a los 37 días tiene un contenido de lignina de 1.89%, mientras que a los 149 días es de 6.39% (Amador y Boschini, 2000).

En comparación de otros animales, los rumiantes son los herbívoros que utilizan una mayor proporción de carbohidratos fibrosos de las plantas como celulosa y hemicelulosa. Esto es gracias a la simbiosis con bacterias, hongos y protozoarios en su sistema digestivo, pudiendo convertir estos polisacáridos en azúcares simples para usarlos indirectamente como fuente de energía. También pueden aprovechar con mayor facilidad los carbohidratos no estructurales del material vegetal que se encuentran en el protoplasma de la célula, como azúcares simples y almidones. Sin embargo, el principal obstáculo para el aprovechamiento de nutrientes vegetales por parte de los rumiantes es la presencia de lignina (van Soest, 1994; Chaturvedi y Verma, 2013).

La correlación entre la cantidad de lignina y la digestión de la pared celular de las plantas, así como con el aprovechamiento de los demás componentes celulares en los forrajes que consumen los animales es negativa, con un valor reportado de R^2 de 0.69 (Jung y Vogel, 1986). Así, la presencia de lignina en el material vegetal impide su colonización por los microorganismos del rumen, además, la unión covalente entre la lignina y los polisacáridos disminuye la eficiencia del ataque enzimático microbiano a estos últimos, por lo que también

se afecta la utilización de los carbohidratos no estructurales de la planta, retardando el tiempo que pasa el alimento en el rumen antes de pasar al omaso y abomaso, lo que repercute en pérdidas de energía bruta (EB) para el animal (van Soest, 1994; Morgavi *et al.*, 2010).

Entre los diferentes parámetros de la fermentación ruminal que se utilizan para evaluar la calidad de la digestión de los nutrientes ingeridos por el animal se encuentra la medición de metabolitos secundarios, como la proporción y cantidad de ácidos grasos volátiles (AGV's), que depende de la proporción de microorganismos ruminales. Por otra parte, el contenido de amoníaco ($\text{NH}_3\text{-N}$) indica el crecimiento microbiano en el rumen, mientras que el metano (CH_4) representa la pérdida de energía hasta en un 16% (Moss *et al.* 2000). Estos parámetros dan un panorama completo de la eficiencia con la que se utiliza el alimento indirectamente para que el animal pueda crear musculo, leche y satisfaga sus necesidades metabólicas básicas (Baldwin, 1984; van Soest, 1994).

En los últimos años se han evaluado alternativas para lograr un rompimiento efectivo de las estructuras poliméricas recalcitrantes del complejo lignocelulósico. El objetivo de estos es remover la lignina para dejar expuestas las moléculas de celulosa y hemicelulosa, mejorando la digestibilidad del sustrato y obteniendo así una conversión eficiente de energía para el animal. Sin embargo, los procesos propuestos tienen obstáculos técnicos y económicos que aún no se han resuelto del todo (Geng *et al.*, 2014).

Los métodos para remover la lignina incluyen procesos físicos, químicos, físico-químicos y biológicos, o sus combinaciones. Normalmente los tratamientos físicos de molienda o picado van acompañados de tratamientos químicos que implican el uso de NaOH o NH_3 , los cuales han mostrado aumento en la digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS) (Liu *et al.*, 1999). Por ejemplo, en el caso de los tratamientos químicos se ha observado un incremento de un 64.67% en rastrojo de maíz sin tratar, a un 71.94 % DIVMS en el rastrojo procesado con NH_3 (Fuentes *et al.*, 2001). Sin embargo, la aplicación de estos químicos conlleva un alto riesgo para el animal, pudiendo intoxicarlo (Sundstol y Owen, 1984). En el tratamiento biológico de los residuos lignocelulósicos para su uso en la nutrición de rumiantes se han utilizado especies y cepas el grupo Basidiomycota, entre los que destacan los hongos de pudrición blanca (van Kuijk *et al.*, 2015). En dichos estudios se ha observado una correlación positiva entre la pérdida de lignina del material vegetal que va de un 9 a 70% y el aumento de la digestibilidad en un 10 a 30% (Okano *et al.*, 2009; Sharma y Arora, 2010; Tuyen *et al.*, 2012; Shrivastava *et al.*, 2012).

Entre el principal factor para lograr la delignificación por hongos de pudrición blanca se encuentra un sistema extracelular de enzimas oxidativas que incluye principalmente a la lignin peroxidasa (LiP), la peroxidasa dependiente de manganeso (MnP), la lacasa (Lac) y, de más reciente descripción, a la peroxidasa versátil (PV). Estas enzimas denominadas genéricamente ligninasas o enzimas ligninolíticas, son de particular relevancia dado que por su falta de especificidad y alto potencial redox son capaces de actuar sobre una gran variedad de compuestos aromáticos (Kuhar y Papinutti 2014; Chen *et al.*, 2015; Tian *et al.*, 2012).

Entre las variables asociadas a la producción de enzimas ligninolíticas se encuentran, entre otras, el género y la especie fúngica involucrada, ya que algunos patrones de secreción de las enzimas son diferentes debido a la presencia o ausencia de los genes codificantes correspondientes. Así, mientras que algunas especies como *Phanerochaete chrysosporium* pueden producir LiP, MnP y no Lac, otras como *Agaricus bisporus* secretan MnP y Lac, pero no LiP (Leonowicz *et al.*, 1999; Erden *et al.*, 2009; Fonseca *et al.*, 2016; Janusz *et al.*, 2017). Incluso la expresión enzimática es específica de las características fisiológicas de cada cepa. Por ejemplo, en presencia de rastrojo de trigo la producción de enzimas cambia entre especies del género *Trametes*, observándose una producción máxima de Lac de 995 U L^{-1} , una actividad de MnP de 5684 U L^{-1} y una delignificación de 31.3% en *Trametes multicolor* (Knežević *et al.*, 2016). Mientras que *Trametes gibbosa* no produce Lac, presenta una actividad de MnP de 5030.6 U L^{-1} y muestra una delignificación mayor del 51.8% (Knežević *et al.*, 2016).

El material vegetal empleado también representa un factor de variabilidad respecto a los patrones de actividad de las enzimas ligninolíticas, debido a las diferencias cualitativas y cuantitativas de la estructura de la lignina entre los tipos de biomasa empleados (Songulashvili *et al.*, 2007). Otras variables como las condiciones de cultivo, particularmente la relación carbono/ nitrógeno (C: N), el tiempo y condiciones de incubación y la presencia de inductores enzimáticos orgánicos o inorgánicos en el medio (Kirk *et al.*, 1978; Fang *et al.*, 2015; Knežević *et al.*, 2016). Las variables anteriormente mencionadas influyen en el sistema de transcripción para la síntesis y actividad de las enzimas ligninolíticas (Collins y Dobson, 1997), además de afectar otros procesos fisiológicos en las células fúngicas. Todo lo anterior contribuye a explicar por que existen trabajos en los que se documenta una correlación entre los altos niveles de actividad enzimática con los niveles de delignificación, mientras que en otros no se presenta dicha correlación. Por ejemplo, Sun *et al.* (2011) no encuentran relación entre el pico de

actividad enzimática de Lac al día 7 con 0.8 U g^{-1} y el máximo rango de delignificación en el rastrojo de maíz, el cual se da después de este día (degradación máxima de $3.83\% \text{ día}^{-1}$). Por otra parte, Čilerdžić *et al.* (2016) encuentran que la máxima producción de Lac es al día 14 de incubación con $3\,000 \text{ U L}^{-1}$ y se da a la par con una pérdida mayor de lignina (22%).

Así mismo, la elección del tipo de sustrato empleado en estudios de delignificación de rastrojo depende en gran medida de la región geográfica de interés, dada la relevancia de distintos tipos de cultivo o la disponibilidad de sustrato entre países y regiones geográficas. Por ejemplo, en países europeos se ha evaluado con mayor detalle la delignificación fúngica del rastrojo de trigo (Tuyen *et al.*, 2012; Rouches *et al.*, 2016; Čilerdžić *et al.*, 2016; Knežević *et al.*, 2016), debido a que es el cultivo de mayor preponderancia. En regiones como Asia se han evaluado sustratos alternativos como el bambú, tallos de algodón o rastrojo de arroz (Shi *et al.*, 2007; Okano *et al.*, 2009; Meehnian *et al.*, 2017), así como algunos más convencionales como el rastrojo de maíz y de trigo (Sun *et al.*, 2011; Arora y Sharma 2011; Song *et al.*, 2013; Niu *et al.*, 2018). En el caso de Latinoamérica, los estudios han incluido licor de maíz fermentado, rastrojo de maíz, paja de sorgo, paja de trigo o rastrojo de cebada (Díaz-Godínez y Sánchez, 2002; Soto- Sánchez *et al.*, 2015; Fonseca *et al.*, 2016, Villegas *et al.*, 2010, Tirado- González *et al.*, 2016).

En procesos de delignificación de biomasa vegetal se puede optar por realizar los procesos en cultivo líquido o sumergido y la fermentación en sustrato sólido (FSS), ambos con ventajas y limitaciones. Por ejemplo, la FSS tiene la ventaja de necesitar menos energía, ya que el cultivo en medio líquido requiere aireación y agitación, mientras que el medio sólido permite una rápida difusión de oxígeno (Sun *et al.*, 2011; Zeng *et al.* 2017). En nutrición animal, el efecto de cepas de basidiomicetos sobre la digestibilidad del rastrojo se ha evaluado mediante FSS, reportándose un aumento en la digestibilidad *in vitro* de 172 g kg^{-1} a 287 g kg^{-1} cuando se compara paja de trigo sin tratar con aquella inoculada con *Phlebia brevispora*, respectivamente (Sharma y Arora, 2010). La evaluación *in vivo*, muestra resultados positivos empleando FSS al aumentar el peso en cabras un kg, con dieta que incluía paja de trigo inoculado con *Ganoderma* sp.; sin embargo, los estudios presentan limitantes en los datos de digestión, parámetros de la fermentación y ganancias de peso (van Kuijk *et al.*, 2015).

Una desventaja adicional del tratamiento de rastrojo empleando FSS es que se ha demostrado que los hongos consumen una proporción de nutrientes más accesibles que la lignina

durante periodos tempranos de crecimiento, como los carbohidratos no estructurales de la planta (Niu *et al.*, 2018). En el estudio de Villegas *et al.* (2010), se encontró un menor valor de DIV en la paja de sorgo tratada con hongos, disminuyendo de 53.49% en el caso del control a 43.24% y 36.47% a 20 días de incubación, dependiendo de la cepa, lo que se atribuye al consumo de celulosa, hemicelulosa o azúcares simples.

Como se mencionó anteriormente, los reportes sobre la inducción de enzimas ligninolíticas y la eficiencia de delignificación al emplear distintos tipos de residuos vegetales o especies fúngicas, muestran resultados contrastantes (Arora y Gill, 2001; Wan y Li, 2010; Knežević *et al.*, 2016; Songulashvili *et al.*, 2007). Por lo que en el estudio de nuevas cepas fúngicas y/o cepas aisladas en determinadas regiones geográficas, junto con su análisis del potencial para producir enzimas ligninolíticas y la delignificación de un tipo de biomasa distinto o variante vegetal regional no se debe asumir que se encontrarán los mismos resultados de estudios previos. Por lo anterior, en el presente trabajo se determinó la capacidad de cepas de las especies de basidiomicetos silvestres de Michoacán *Irpex lacteus*, *Ganoderma sp.*, *T. versicolor* y *Phlebiopsis sp.* para producir enzimas ligninolíticas extracelulares en presencia de rastrojo de maíz (*Zea Mays*) y se analizó el valor nutricional final y parámetros de fermentación ruminal *in vitro* de la biomasa resultante del tratamiento de rastrojo con las mismas cepas fúngicas de estudio..

HIPÓTESIS

Las cepas de hongos de interés incrementan significativamente la producción de enzimas ligninolíticas extracelulares en presencia de rastrojo de maíz (*Zea mais*) en relación a medio de cultivo sin el sustrato, modificando su valor nutricional y los parámetros de fermentación ruminal *in vitro* debido a los cambios estructurales celulares del mismo.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la actividad de enzimas ligninolíticas, delignificación, valor nutricional y parámetros de fermentación ruminal *in vitro* del rastrojo de maíz tratado con cuatro cepas de hongos basidiomicetos.

Objetivos particulares

- I. Cuantificar la actividad enzimática de Lac y MnP en cuatro cepas de distintas especies de basidiomicetes cultivadas con rastrojo de maíz como inductor.
- II. Comparar la capacidad de degradación de lignina, celulosa y hemicelulosa del rastrojo de maíz por parte de las cuatro cepas fúngicas de basidiomicetes de interés.
- III. Determinar el valor nutricional del subproducto de la delignificación del rastrojo de maíz tratado con las diferentes cepas de hongos basidiomicetos
- IV. Evaluar los parámetros de fermentación *in vitro* del rastrojo de maíz tratado con las cepas fúngicas de interés inoculadas en medio sólido.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico

Se emplearon cuatro cepas de hongos silvestres de las especies de basidiomicetes *Irpex lacteus* (cepa CMU-84/13), *Ganoderma* sp. (cepa CMU-02/13), *Trametes versicolor* (cepa CMU-TA01) y *Phlebiopsis* sp. (cepa CMU- 47/13), las cuales se encuentran depositadas en el Cepario Michoacano Universitario (CMU) del Laboratorio de Conservación y Biotecnología Microbiana del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología (CMEB) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH), localizada en Tarímbaro, Michoacán, México.

El sustrato que se utilizó como inductor de la actividad enzimática y para evaluar su delignificación, fue el rastrojo de maíz (*Zea mays*), de variedad no identificada, obtenido de Pátzcuaro, Michoacán ubicado a 19° 30' 59" N, 101° 36' 35" W a una altitud de 2140 msnm.

Medios de cultivo

El agar de papa y dextrosa (PDA Difco™, USA) se empleó para preservar las cepas durante el estudio y para la obtención de inóculos, mientras que para los ensayos en medio líquido se utilizó el caldo papa dextrosa (PDB, Difco™, USA), preparándose ambos de acuerdo a las instrucciones del proveedor. El caldo de rastrojo, denominado en adelante CR, se utilizó para evaluar la inducción de la actividad enzimática Lac y MnP de las cepas en rastrojo de maíz en medio líquido. Este medio se preparó con rastrojo de maíz en base seca con un tamaño de partícula <1 mm al 6.6% (p/v) y se añadió dextrosa al 0.5% (p/v). Todos los medios se esterilizaron en autoclave a 120 lb/in² durante 15 min.

Obtención de inóculos

Las cepas se mantuvieron permanentemente en crecimiento en medio de cultivo PDA a 28 °C en placas de Petri de 10 cm de diámetro. Para los ensayos en medio líquido, se obtuvieron inóculos cilíndricos del margen de cada colonia en fase logarítmica de crecimiento, empleando un sacabocados de 6 mm de diámetro interno. Para los ensayos de FSS, placas de Petri de 10 cm de diámetro con medio PDA se inocularon en el centro con un inóculo cilíndrico de las cepas de interés obtenido de la manera previamente descrita. Las placas así inoculadas se incubaron a 28 °C hasta que el micelio ocupó totalmente la caja, de tres a siete días dependiendo de la

velocidad de crecimiento de cada cepa de estudio (Figura 1). Una vez alcanzado este punto se realizaron cortes diagonales y transversales a lo largo de toda la colina de micelio para obtener fragmentos de 3 cm² (Fig.2).

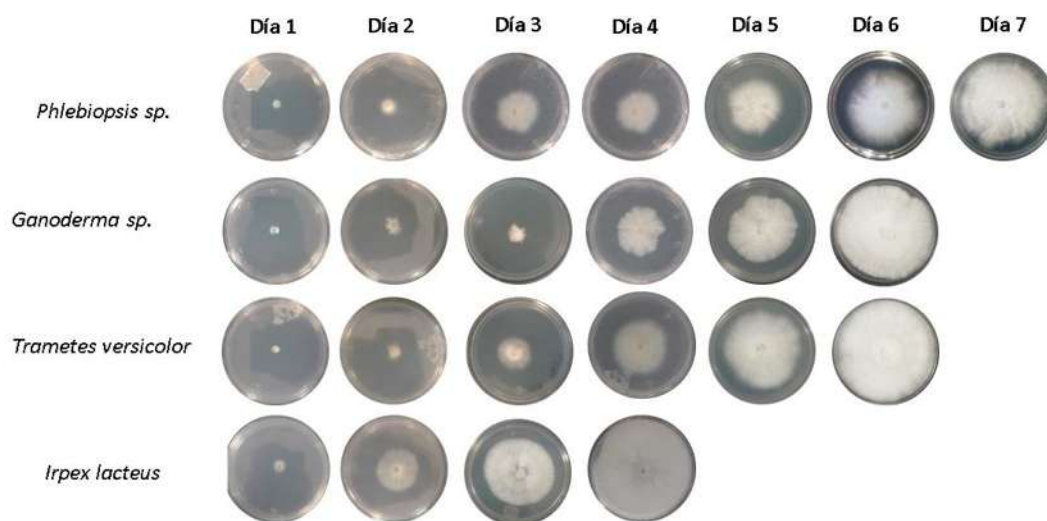


Figura 1. Crecimiento del micelio de las cepas de basidiomicetes e estudio en medio agar papa dextrosa (PDA). Las colonias en crecimiento exponencial de cada cepa se utilizaron como fuente de inóculos para los ensayos en medios CR (Caldo de Rastrojo) y PDB (Caldo papa dextrosa), así como para ensayos de FSS (Fermentación en sustrato sólido).

Condiciones de cultivo

Ensayos de fermentación en medio líquido

Matraces Erlenmeyer de 150 mL con 50 mL de medio PDB o CR se inocularon con cuatro inóculos cilíndricos de 6 mm de diámetro obtenidos de la manera anteriormente descrita. Los matraces con medio así inoculados se incubaron a 28 °C y 120 rpm en un agitador orbital (MaxQ™ 4000Thermo) durante 10 días. Se utilizaron cultivos control sin inóculo fúngico para obtener el blanco de los ensayos enzimáticos. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.



Figura 2. Ejemplo de la segmentación del micelio de las cepas de estudio para la inoculación del rastrojo en los ensayos de fermentación en sustrato sólido.

Ensayos de fermentación en sustrato sólido (FSS)

Para estos ensayos se colocaron 20 g de rastrojo de maíz en base materia seca (MS) con un tamaño de partícula entre 3 y 5 cm en frascos de vidrio de 1 L con tapón de rosca (Pyrex®, USA). A los frascos con rastrojo se agregaron 12.5 mL de agua desionizada con dextrosa al 0.01 % (p/v) y se esterilizaron tres veces en autoclave de la manera previamente descrita. Una vez enfriada la biomasa a temperatura ambiente, cada frasco se inoculó con los segmentos de micelio de 3 cm² de la colonia total de una caja de Petri obtenidos de la manera previamente descrita. Los frascos se incubaron a 28° C, en obscuridad y sin agitación, obteniendo muestras para su análisis a los 6, 12, 18, 24 y 30 días de incubación. Todos los ensayos para cada cepa de estudio se realizaron por triplicado y se incluyó un tratamiento control del rastrojo esterilizado e incubado durante el mismo periodo pero sin inocular.

Determinación de las actividades enzimáticas de Lac y MnP

Para las actividades enzimáticas en medio líquido PDB y CR, se tomaron alícuotas de 2 mL del sobrenadante cada 24 h durante 10 días. Para los ensayos de fermentación en sustrato sólido (FSS), a los frascos de incubación se les adicionaron 200 mL de agua desionizada estéril y se agitaron a 28° C y 100 rpm durante 40 min. Del agua de lavado se tomaron alícuotas de 2 mL para las mediciones de la actividad enzimática de MnP y Lac.

La actividad de MnP se determinó de acuerdo al método modificado de Heinfling *et al.*, (1998) utilizando de 500 a 5 µL del sobrenadante de las muestras de los ensayos en medio líquido y sólido (dependiendo el día de incubación y la cepa utilizada), previamente centrifugado a 15 000 rpm por 10 min en una microcentrifuga con un rotor de capacidad de 24x1.5-2 MI ClickSeal™ (Thermo Scientific, USA); midiendo mediante la formación de Mn³⁺-tartrato después de dos minutos de incubación a partir de 100 µL a 10 mM de MnSO₄ usando 200 µl de buffer de tartrato de sodio (pH 4.5) y como iniciador de la reacción 80 µl a 5 mM de H₂O₂ ($\epsilon_{469}=18.3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) con un volumen total de reacción de 1 mL. La actividad de Lac se determinó de acuerdo a Nagai *et al.*, (2002), utilizando de 100 a 0.1 µL del sobrenadante de las muestras de los ensayos en medio líquido y sólido (dependiendo el día de incubación y la cepa utilizada), previamente centrifugado como se explico anteriormente; midiendo la oxidación de 100 µL a 10 mM de 2,20-azino-bis-3-ethylbenzotiazolina-6-sulfonato (ABTS) a un pH de 4.0 con 500 µL de citrato para monitorear la formación del radicales cationicos de ABTS con un

tiempo de incubación de 20 min a 30° C ($\epsilon_{420}= 36.0 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$), con un volumen total de reacción de 1 mL.

La actividad enzimática de 1 U es definida como la cantidad de enzima que oxida 1 mmol de sustrato por minuto. Todas las actividades enzimáticas se determinaron a 25° C . Los reactivos utilizados para los ensayos enzimáticos fueron adquiridos de la marca Sigma-Aldrich (USA). Las actividades enzimáticas fueron leídas en un Espectrofotómetro UV-vis (Thermo Scientific, USA), analizadas por triplicado junto con un análisis estadístico que se describe posteriormente

Análisis de la composición química de la fermentación líquida

A las muestras de rastrojo provenientes de los ensayos de fermentación en medio líquido tratadas con las distintas cepas de interés en los días 5 y 10 de incubación, se les determinó el contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina, mediante el método de fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácido (FDA) de acuerdo a Van Soest *et al.*, (1991) con modificaciones del proveedor ANKOM y la lignina, con fibra lignina ácida (Van Soest *et al.*, 1991).

Valoración nutritiva de los sustratos como alimento para ganado rumiante

Análisis de la composición química de la fermentación sólida

Al residuo vegetal obtenido de los ensayos de FSS se le eliminó el exceso de agua mediante filtración a través de papel Whatman No. 1 y se secó a 70 °C por 24 h. La biomasa seca obtenida se molió a un tamaño de partícula $\leq 1\text{mm}$ y se almacenó en bolsas de plástico en ambiente de baja humedad para su análisis posterior.

A las muestras de rastrojo obtenidas del tratamiento con cada cepa de estudio e incubada durante 6, 12 y 18 días, se les determinó el contenido de proteína cruda de acuerdo al método Kjeldahl, mediante la determinación del nitrógeno orgánico. Para estimar el contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina de las muestras se utilizó el método de fibra detergente neutro (FDN), mientras que el contenido de celulosa y lignina se determinó empleando el método de fibra detergente ácido (FDA) (Van Soest *et al.*, 1991). En ambos métodos se aplicaron las modificaciones del proveedor ANKOM; la hemicelulosa se calculó con las diferencias entre FDN y FDA (Mertens, 1992). La lignina se determinó con fibra lignina ácida (Van Soest *et al.*, 1991).

Evaluación de la producción de gas *in vitro*

Para estimar la digestibilidad y fracciones de degradación de los tratamientos en los días de incubación 6, 12 y 18 en los ensayos de FSS de todas las cepas, se utilizó la técnica de producción de gas *in vitro* descrita por Goering y Van Soest (1970), sin la adición de tripticasa.

Se incubaron 0.4 g en base seca de cada tratamiento en frascos de vidrio con capacidad de 125 mL para cultivo, con medio de cultivo no limitante para el crecimiento de microorganismos ruminales y líquido ruminal como agente inoculante en relación 5:1 (v/v), mantenido en anaerobiosis con flujo constante de CO₂. Se dispensaron 40 mL de este medio en cada frasco de vidrio, sellándolos con tapón de caucho y finalmente se incubaron a 39° C.

Para cuantificar metano (CH₄), ácidos grasos volátiles (AGV's) y amoníaco, se incubaron frascos inoculados de la manera anteriormente descrita por 24 h, con cuatro réplicas por tratamiento. Otras cuatro réplicas se incubaron a 144 h para medir la acumulación de gas, la cinética de fermentación, la materia orgánica (MO) y la desaparición del sustrato. Con tal finalidad se hicieron lecturas a las 3, 6, 9, 12, 16, 21, 26, 31, 36, 48, 60, 72, 96, 120 y 144 h de incubación, utilizando un medidor de presión (Delta OHM) con una sonda de presión manométrica acoplado a una aguja.

El líquido ruminal para todos los ensayos se obtuvo de cuatro ovejas (*Ovis aries*) de raza Assaf en ayunas, a través de cánulas ruminales, las cuales tenían una alimentación en base de forraje y concentrado (50:50). El líquido fue filtrado por una doble capa de gasa, manteniéndolo en termos hasta su utilización. Al finalizar la incubación de 144 h, los frascos se filtraron en crisoles y el residuo se utilizó para obtener el valor de la desaparición del sustrato en materia seca. Posteriormente la biomasa resultante se calcinó a 550° C por 24 h, pesando el residuo y obteniendo la materia orgánica (MO).

Para obtener la ecuación de sustitución de psi a mL, se registraron los mL obtenidos de las presiones leídas con ayuda de jeringas y se construyó una curva de referencia, obteniendo la ecuación fórmula: $\text{mL} = 6.2202 * (\text{psi}) + 0.1622$ con una R² de 0.99.

Digestibilidad verdadera y aparente de la FDN *in vitro*

Se colocaron 0.25 g de muestra de los tratamientos en bolsas filtro F57 ANKOM y se sometieron a una digestión durante 24 h en una incubadora Daisy^{II} por el método del proveedor ANKOM, con medio de cultivo no limitante y líquido ruminal en proporción 5:1 (v/v) antes

descrito. Al finalizar, las bolsas se secaron por 24 h a 70° C obteniendo el peso para calcular la digestibilidad aparente (DIV) con la diferencia entre el peso de la muestra original y el peso al término del secado. Posteriormente las bolsas se digirieron con FDN por una hora de acuerdo a la técnica Van Soest *et al.* (1991) modificada del proveedor ANKOM, para obtener la digestibilidad verdadera (TDIV) mediante el cálculo de la diferencia entre el peso de la muestra original y el peso después de la digestión de fibra. Con este peso también se obtuvo la digestión de la fibra FDN (dFDN), obtenida por la diferencia del valor inicial de FDN de la muestra y el peso después de la digestión de FDN.

Análisis de la producción de CH₄

Se capturaron 10 mL de biogás obtenido de la producción de gas *in vitro* a las 24 h, en tubos vacutainer® de 10 mL. Para la lectura del CH₄ se utilizó un cromatógrafo de gases modelo GC-14B Shimadzu (Japón). Para construir las curvas de referencia y obtener la ecuación de sustitución del área de metano a mL se inyectaron en el cromatógrafo CH₄ a distintos volúmenes, obteniendo la ecuación $mL = 3 \times 10^{-7} * (\text{área de CH}_4) + 1 \times 10^{-4}$ con una R² de 0.99.

Análisis de producción de Ácidos Grasos Volátiles (AGV's)

Se obtuvieron alícuotas de 2 mL del sobrenadante de los frascos de la producción de gas *in vitro* a las 24 h, centrifugando a 6000 rpm por 15 min a 4° C con una centrifuga Heraeus Multifuge X1R con un rotor modelo BIOShield 720, tomando 0.8 mL del sobrenadante y mezclando con 0.5 mL solución acidificante para la desproteinización de la muestra con solución de ácido metafosfórico-crotónico (0.06 g de ácido crotónico y 10 g de ácido metafosfórico en 100 mL de agua miliQ), dejando en refrigeración por 24 h. Posteriormente se centrifugó de la manera descrita anteriormente para colocar el sobrenadante en viales y proceder a hacer las mediciones. Las lecturas de los AGV's se procesaron en un cromatógrafo de gas GC-2010 Shimadzu, que cuenta con un inyector automático, un detector de ionización de llama y una columna semicapilar TR-FFAP de 30 m x 0.53 mm x 1 µm (Supelco, Barcelona, España). Los datos se analizaron en tiempo real con el software GCsolution versión 2.30.00.

Se generó una lectura patrón con concentraciones conocidas de los AGV's: acético (49.81 mmol/L), propiónico (13.48 mmol/L), butírico (11.38 mmol/L), isobutírico (3.51 mmol/L), valérico (3 mmol/L), isovalérico (2.97 mmol/L) y capróico (1.82 mmol/L).

Análisis de producción de amoníaco (NH₃-N)

La cantidad de NH₃ se obtuvo por colorimetría siguiendo la técnica descrita por Weatherburn (1967) midiendo la formación de indofenol a partir del NH₃ presente en 20 µL de muestra en presencia de fenol e hipoclorito sódico (NaClO) después de 20 minutos de incubación a 37° C. Las lecturas se realizaron a un λ de 650 nm. Se hizo una recta patrón con concentraciones de 50 a 600 mg/L de nitrógeno para poder sustituir los datos obtenidos.

Diseño experimental y análisis estadístico.

Todos los experimentos se diseñaron factorialmente con tres réplicas por tratamiento y por triplicado utilizando el paquete estadístico JMP 6.0.0 (© SAS Institute Inc., 2005).

1.- Cinética enzimática. Se realizó un análisis con estadística descriptiva para conocer su media y la desviación estándar entre días de incubación. Se compararon los tratamientos con y sin rastrojo de cada cepa fúngica mediante un análisis varianza (ANOVA) de una vía y posteriormente se realizó una comparación de medias con t de Student's, con el siguiente modelo estadístico:

$$\gamma_{ij} = \mu + \alpha_i + e_{ijk}$$

Donde:

γ_{ijk} = Actividad enzimática de acuerdo al tipo de cepa utilizada

μ = Media de general

α_i = Efecto del tratamiento (con y sin rastrojo) sobre la respuesta

e_{ijk} = Error aleatorio

Para saber el día de mayor producción enzimática de cada cepa de estudio y de cada tratamiento se realizó un análisis de ANOVA factorial con dos factores, comparando medias con la prueba de Tukey, con el siguiente modelo estadístico:

$$\gamma_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + e_{ijk}$$

Donde:

γ_{ijk} = La respuesta de la actividad enzimática

μ = Media de general

α_i = Efecto del día

β_j = Efecto del tratamiento (con o sin rastrojo)

$\alpha\beta_{ij}$ = Interacción entre día de incubación y el tratamiento

e_{ijk} =Error aleatorio

2,3,4.-Delignificación y digestibilidad del rastrojo. Para conocer diferencia entre composición de lignina, celulosa, hemicelulosa, DIV, TDIV, dFDN, acumulación de biogás *in vitro* a las 144 h, metano, AGV's y $\text{NH}_3\text{-N}$ se realizó un análisis ANOVA de una vía, comparando las medias con Tukey, con el siguiente modelo estadístico:

$$\gamma_{ij}=\mu+\alpha_i+e_{ijk}$$

Donde:

γ_{ijk} = respuesta de porcentaje de lignina, FDA, FDN, DIV, TDIV, dFDN, acumulación de biogás *in vitro* a las 144 h, metano, AGV's o $\text{NH}_3\text{-N}$

μ = Media de general

α_i = Efecto del tratamiento (hongo con rastrojo a distintos tiempos de incubación)
sobre la respuesta

e_{ijk} =Error aleatorio

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Actividades enzimáticas en medio líquido

Lacasa

La actividad enzimática de Lac en medios PDB y CR se observó únicamente en las cepas de *T. versicolor* y *Ganoderma* sp. (Fig. 3). En *T. versicolor* la actividad se detectó desde el segundo día de incubación, en ambos cultivos. En medio PDB la máxima actividad se midió entre el cuarto y el quinto día de incubación con valores de 314.96 ± 59.21 y 293.87 ± 44.75 U mL⁻¹, respectivamente. La máxima actividad de Lac de *T. versicolor* en medio CR se determinó entre el séptimo y el noveno día de incubación con 8754.62 ± 697.74 , 8368.83 ± 1682.54 y 8685.19 ± 1993.19 U mL⁻¹, respectivamente. Dichos valores muestran que la máxima actividad enzimática de Lac en *T. versicolor* se incrementó 27.79 veces en medio CR en relación al medio PDB ($p < 0.05$).

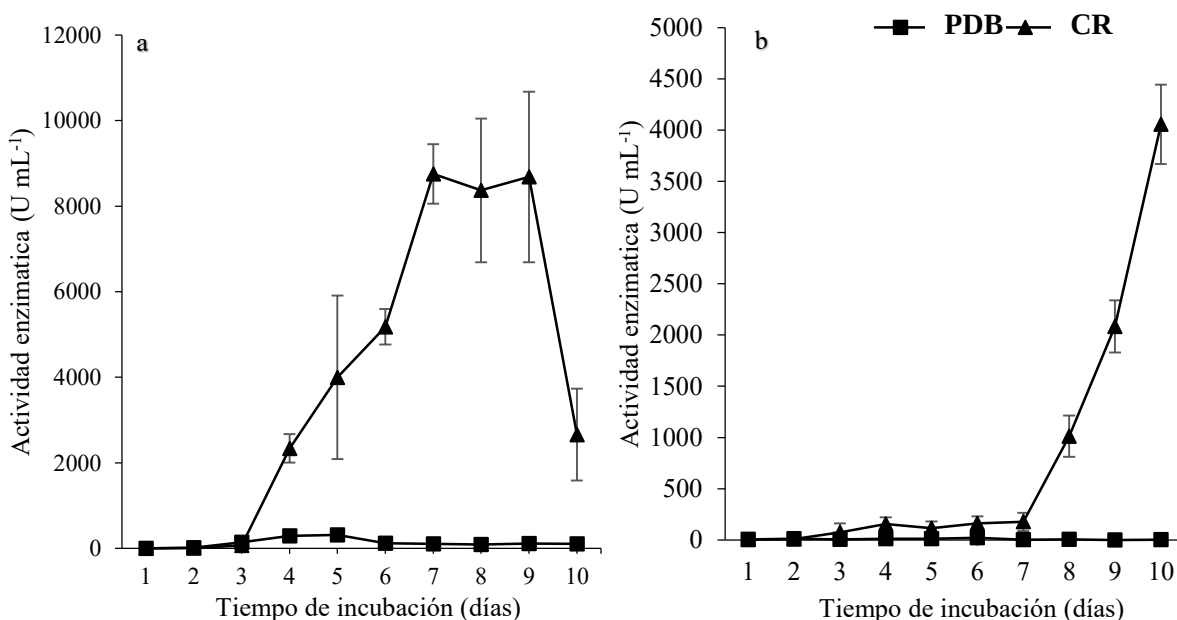


Figura 3. Actividad enzimática de lacasa de *T. versicolor* (a) y *Ganoderma* sp. (b) en medios PDB y CR. Los cultivos se incubaron a 28 °C y 120 rpm

La producción de enzimas ligninolíticas de la cepa de *T. versicolor* empleada en este trabajo ha sido previamente evaluada en medio PDB suplementado con pulpa kraft y en presencia de CuSO₄, encontrándose una actividad máxima de Lac al décimo día de incubación, con $68.37 (\pm 4.35)$ U mL⁻¹ (Damián-Robles *et al.*, 2017). El contraste entre la baja actividad

encontrada en dicho estudio y el presente trabajo muestra que los sustratos agrícolas no procesados son mejores inductores de la actividad de Lac extracelular en la cepa de estudio que la lignina kraft.

Estudios previos documentan la actividad de enzimas ligninolíticas de *T. versicolor* y otras del mismo género, cultivadas en presencia de distintos esquilmos agrícolas. No obstante, hasta donde se pudo documentar en el presente trabajo, no existen reportes previos en los que se analice la producción de enzimas ligninolíticas extracelulares de dicha especie en medio líquido con rastrojo de maíz como sustrato. La secuenciación del genoma de *T. versicolor* ha generado información respecto a la evolución de la degradación de madera por dicha especie, encontrando relación entre la capacidad ligninolítica y la secreción de enzimas como la LiP, MnP y Lac (Floudas *et al.*, 2012).

Al comparar los resultados de actividad enzimática del presente trabajo con los de estudios previos es importante considerar que se utilizan diferentes cantidades de inóculo, la biomasa empleada es distinta, el tiempo de incubación en el que se realizan las determinaciones es diferente, y en algunos el medio se suplementa con una fuente de carbono extra como glucosa, así como con vitaminas y minerales. Así, en trabajos que emplean *T. versicolor* inoculado en olote de maíz como sustrato se encuentran valores de Lac de 75 U L⁻¹. Cuando esta misma especie se incuba en presencia de rastrojo de cebada (*Hordeum vulgare* L.) la actividad de Lac es aún mayor, con valores de 2500 a 3200 U L⁻¹; sin embargo, esta actividad se alcanza hasta los días 20 y 35 de incubación (Moldes *et al.*, 2004). También en *T. troglitii* se ha visto una actividad mayor de Lac a la encontrada en el presente trabajo, con un valor de 1262 U L⁻¹ en cultivos líquidos estáticos usando rastrojo de trigo como única fuente de carbono (Gai *et al.*, 2014).

En varios estudios se ha detectado la actividad de Lac en *T. versicolor* después del segundo día de incubación (Collins y Dobson, 1997; Moldes *et al.*, 2004), lo cual concuerda con el presente estudio. Sin embargo, Rodríguez -Couto *et al.*, (2002) observan que cuando *T. versicolor* se inocula en rastrojo de cebada la actividad de lacasa aparece hasta el tercer día de incubación con un valor de 279 U L⁻¹, alcanzando un máximo hacia el día 18 con un valor de 591 U L⁻¹. Mientras que la incubación de dicha especie en rastrojo de trigo, muestra actividad de Lac desde el tercer día de incubación (195 U L⁻¹), alcanzando un máximo hacia el día 17 con 490 U L⁻¹ (Rodríguez -Couto *et al.*, 2002)

Otro factor de variación en el patrón y los valores de actividad enzimática en los ensayos realizados con distintos tipo de biomasa, pueden ser las diferencias en los niveles de expresión de las isoenzimas de Lac presente en *T. versicolor*. Por ejemplo, se ha visto que la producción de dos isoenzimas (Lac I y Lac II) de *T. versicolor* cambia dependiendo el material lignocelulósico en el que se incuba, con proporciones de actividad entre isoenzimas (LacI /LacII) de 0.9 en cebada a 4.4 en tallos de uva (Moldes *et al.*, 2004). El nivel de transcripción de genes de isoenzimas de lacasa como *lcc1*, *lcc2*, *lcc3* en *T. versicolor* (Terrón *et al.*, 2004) incrementa al aumentar la inclusión de cobre, nitrógeno y compuestos aromáticos (Collins y Dobson, 1997; Terrón *et al.*, 2004).

En *Ganoderma* sp. la actividad de Lac se detectó desde el primer día de incubación en ambos medios de cultivo. La máxima actividad se determinó en medio CR al décimo día de incubación, siendo de $4055.55 \pm 386.04 \text{ U mL}^{-1}$, mientras que en medio PDB fue de solo $21.99 \pm 7.07 \text{ U mL}^{-1}$ al sexto día. Aunque la actividad enzimática respecto a *T. versicolor* fue menor, la inducción fue mayor en *Ganoderma* sp., aumentando 184 veces en medio CR en comparación del medio PDB ($p < 0.05$). En distintas especies del género *Ganoderma* se ha documentado la actividad de Lac en medio líquido empleando distintos sustratos vegetales (Teerapatsakul *et al.*, 2007; Ding *et al.*, 2012; Fang *et al.*, 2015). Fang *et al.* (2015) estudian a *G. lucidum* incubado en salvado de trigo (3% p/v) y harina de cacahuete (3% p/v) obteniendo una actividad de Lac de 141.1 U mL^{-1} al sexto día de incubación, menor a la determinada en el presente estudio. Sin embargo, con cáscara de pomelo (*Citrus paradisi* L.) se ha visto una mayor inducción de Lac, con una producción de $11,842.13 \text{ U L}^{-1}$ al séptimo día, incluso utilizando bajas concentraciones de glucosa (Ding *et al.*, 2012)

En otros casos se documenta la producción de Lac en cepas de *Ganoderma* hasta el tercer día de incubación, estas variaciones entre el presente trabajo y reportes previos dependen en parte de la composición del medio de cultivo, ya que en estos reportes se utilizan medios suplementados con distintos nutrientes (Teerapatsakul *et al.*, 2007; Elissetche *et al.*, 2007; Fang *et al.*, 2015; Kumar *et al.*, 2015). Se ha observado que la producción de Lac en algunas cepas de *Ganoderma* sp. se incrementa significativamente en presencia de compuestos aromáticos a una concentración de 0.5 a 1 Mm (Kuhar y Papinutti 2014; Kumar *et al.*, 2015). Por lo anterior, es posible que al irse liberando compuestos fenólicos durante el proceso de delignificación, se induzca la actividad de Lac en la cepa aquí estudiada y por lo tanto sea detectada la actividad

de Lac desde el primer día. Un aspecto interesante que concuerda con los resultados en el presente trabajo es el hecho de que, en general, los valores de actividad de Lac de *T. versicolor* son mayores que los encontrados en cepas de *Ganoderma* sp. (Peláez *et al.*, 1995; Erden *et al.*, 2009).

El hecho de no encontrar actividad de Lac en *Phlebiopsis* sp. concuerda con el estudio previo de Damián-Robles *et al.* (2017), para esta misma cepa creciendo en PDB y pulpa kraft. También Żółciak *et al.*, (2008), encuentran que *P. gigantea* incubada en madera de pino no presenta actividad de Lac. El análisis genómico de *P. gigantea* muestra que esta especie no posee genes que codifiquen para Lac extracelular (Hori *et al.* 2014), lo que explica los resultados experimentales de diversos grupos de trabajo, incluidos los del presente estudio.

Manganeso Peroxidasa

La actividad enzimática de MnP se observó en los dos medios de cultivo líquido probados, para las cuatro cepas de estudio (Fig. 4).

La actividad de MnP se detectó desde el primer día de incubación en *T. versicolor*, alcanzando su valor máximo de $50.01 \pm 11.34 \text{ U mL}^{-1}$ al quinto día en medio PDB y $619.44 \pm 233.35 \text{ U mL}^{-1}$ en medio CR al décimo día. Aumentando 32 veces la actividad de MnP en medio CR en relación al medio control. Esto es, en esta cepa se presentó una mayor inducción de MnP que de Lac. Al igual que con la actividad de Lac en *T. versicolor*, se observan diferencias significativas en el valor máximo de actividad de MnP ($1,600 \text{ U mL}^{-1}$ en rastrojo) respecto a un estudio previo de Damián-Robles *et al.* (2017) al incubar la misma cepa en pulpa kraft (150 U mL^{-1}). Esto puede ser debido al tipo y cantidad de isoenzimas producidas por la cepa en presencia de rastrojo de maíz como ya se explicó anteriormente. Los resultados de Knežević *et al.*, (2016) muestran enzimas con diferentes puntos isoeléctricos (pI) correspondientes a diferentes perfiles de las isoformas de MnP en cepas de *Trametes* spp. en SFF con paja de trigo, dichos perfiles se relacionan en ausencia o presencia de compuestos como p-anisidina y alcohol veratrilico.

Entre otros factores, la variación en los niveles de actividad de MnP puede deberse a las concentraciones de iones divalentes en el medio, particularmente de Mn^{2+} y Cu^{2+} (Paice *et al.*, 1993; Fonseca *et al.*, 2016). Por ejemplo, en cepas de *Trametes* spp. se han observado diferencias en la capacidad para secretar MnP en un mismo medio de cultivo basal, pasando de

ser indetectable, a presentar niveles de actividad de 60.42 U mL^{-1} al añadir 0.2 mM de Cu^{2+} al medio (Fonseca *et al.*, 2016). Estos inductores metálicos se han encontrado en fibras de la pulpa kraft (Paice *et al.*, 1993) y se utilizan durante la fertilización del cultivo de maíz (Claro-Córtes *et al.*, 2002), por lo que se podrían encontrar en el rastrojo aquí empleado. Schlosser *et al.* (1997) miden actividad de MnP en *T. versicolor* al cuarto día de incubación empleando rastrojo de trigo, la cual se mantiene, como en este trabajo, hasta el doceavo día de incubación. Este resultado es interesante ya que no todas las cepas de basidiomicetes mantienen la actividad tantos días, lo que puede ser aprovechado en el diseño de fermentadores que permitan la obtención mantenida de esta actividad enzimática.

La actividad de MnP en *Ganoderma* sp. se detectó desde el primer día de incubación en ambos medios. En medio PDB la máxima actividad se registró el sexto día de incubación con $8.36 \pm 2.21 \text{ U mL}^{-1}$, mientras que en medio CR la máxima actividad se registró hasta el octavo día de incubación con $245 \pm 36.32 \text{ U mL}^{-1}$, no encontrando diferencias significativas desde dicho día hasta el décimo día de incubación. Así, los valores máximos de actividad muestran que en medio CR se presenta una inducción de 32 veces con respecto al medio control.

Ćilerdžić *et al.* (2016) documentan una actividad de MnP de $2\,500 \text{ U L}^{-1}$ después de diez días de incubación de *G. lucidum* en medio líquido suplementado con rastrojo de trigo. La actividad respectiva empleando paja de roble fue de $3\,500 \text{ U L}^{-1}$. La diferencia entre las actividades máximas de nuestro trabajo, es en parte explicable por el uso de medio de cultivo con una composición distinta, además del empleo de sustratos diferentes. En el trabajo de Ćilerdžić *et al.* (2016) se utilizan fuentes de glucosa y suplementos minerales. En dicho reporte también encuentran la producción de diferentes isoformas de MnP dependiendo del residuo de material vegetal, el día de incubación y el método utilizado (sumergido y SSF). Por ejemplo, en medio líquido con rastrojo de trigo hacia el día séptimo día de incubación, detectan dos isoformas de MnP con pI's de 46 y 5.9, mientras que en rastrojo de roble solo se detecta una isoforma de pI 5.9. Es necesario a futuro identificar el número de isoenzimas presentes en la cepa de *Ganoderma* sp. aquí estudiada y evaluar las condiciones de producción de cada una de estas, así como su posible relación con los niveles de actividad enzimática leída.

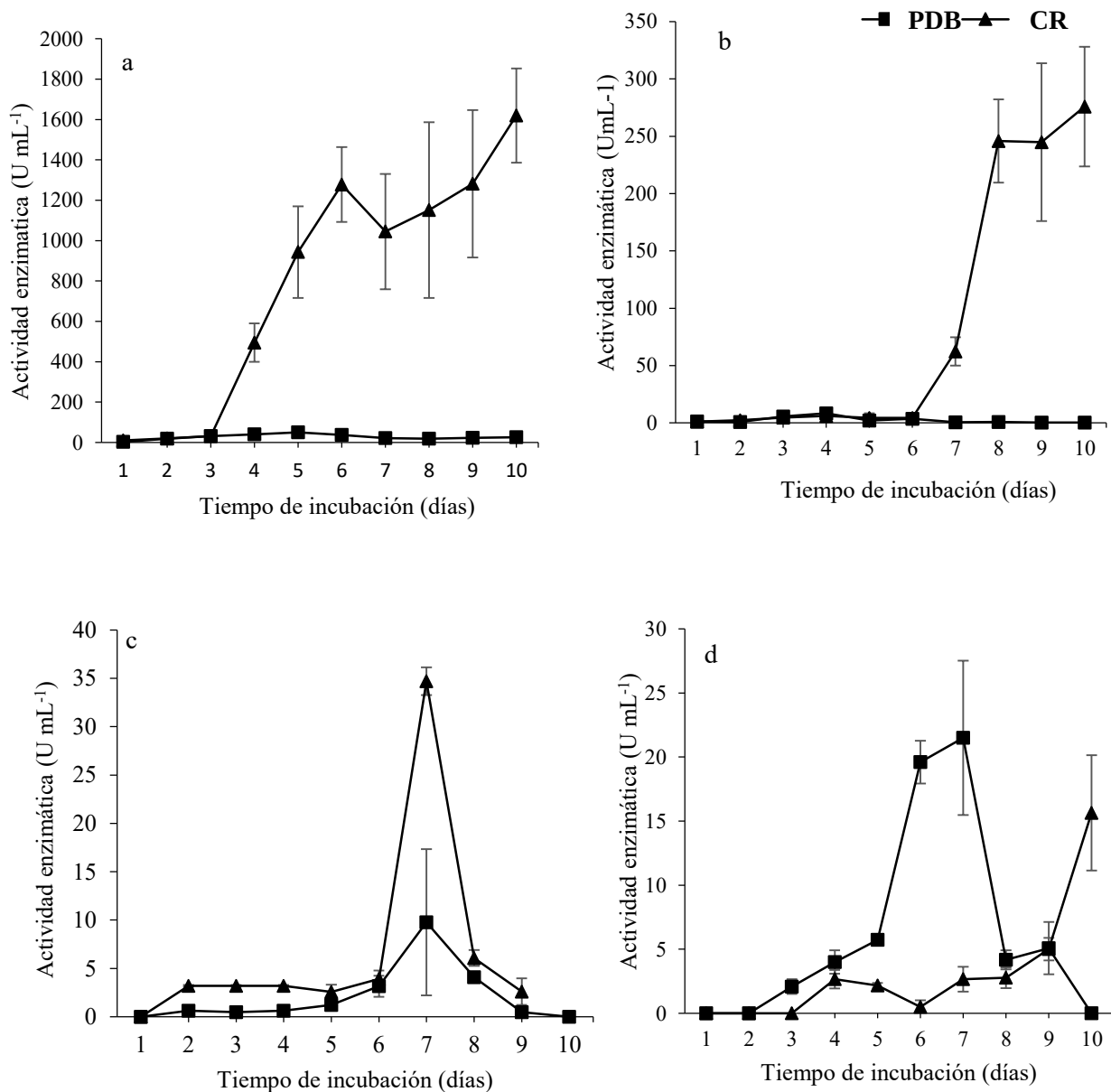


Figura 4. Actividad enzimática de MnP en las cepas de estudio. *T. versicolor* (a), *Ganoderma* sp. (b), *I. lacteus* (c) y *Phlebiopsis* sp. (d) en medio PDB y CR. Los cultivos se incubaron a 28 °C y 120 rpm.

En varios estudios no se ha detectado actividad de MnP en cepas de *Ganoderma* spp. Por ejemplo, en *G. applanatum* no se encontró dicha actividad enzimática cuando se incubó en maíz, salvado de soja, salvado de trigo, plátano y mandarina (Songulashvili *et al.*, 2007). Un resultado similar se obtuvo cuando se analizó a *Ganoderma australe* inoculado en materiales lignocelulósicos como con canelo (*Drimys winteri* F.) y eucalipto (*Eucalyptus globulus* L.) (Elissetche *et al.*, 2007). Por otra parte la máxima actividad de Lac sobre MnP aquí

documentada, concuerda con Elissetche *et al.* (2007) para otras especies de *Ganoderma*, quienes observan que Lac es la mayor enzima ligninolítica producida por *Ganoderma australe*. Las diferencias en los valores de actividad entre Lac y MnP para *T. versicolor* y *Ganoderma* sp., pueden atribuirse a factores intrínsecos de las cepas, como el tipo de isoenzimas producidas, por factores ambientales como los metales divalentes encontrados en el medio de cultivo, o por la estructura de la lignina del rastrojo empleado (Addleman y Archibald, 1993; Yang *et al.*, 2010; Fonseca *et al.*, 2016).

En *I. lacteus* la actividad enzimática de MnP se detectó después del segundo día de incubación, alcanzando un valor máximo de $9.76 \pm 7.56 \text{ U mL}^{-1}$ en PDB hacia el séptimo día de incubación. En medio CR se observó un valor máximo de actividad de $34.70 \pm 1.42 \text{ U mL}^{-1}$ el mismo día que en medio PDB, por lo que la inducción con respecto al medio basal fue de 3.55 veces. En esta misma cepa se ha documentado previamente la ausencia de actividad de Lac y MnP extracelular en medio basal PDB y en medio suplementado con pulpa kraft (Damián-Robles *et al.*, 2017). Como ya se comentó, las diferentes cantidades de inóculo empleadas o el medio inductor utilizado en los trabajos pueden ser el origen de estas inconsistencias observadas en la misma cepa de estudio.

Qin *et al.*, (2018) encuentran que *I. lacteus* crecido en presencia de rastrojo de maíz presenta una actividad máxima de MnP al tercer día de incubación con 158 U L^{-1} , lo que concuerda con este estudio en términos de que la MnP es la principal enzima ligninolítica de esta especie, aunque con diferencias en la actividad máxima y el tiempo en el que se alcanza. Es importante resaltar que en dicho trabajo, cuando *I. lacteus* crece en rastrojo de maíz, son cinco diferentes y únicas las isoenzimas de MnP las que se expresan, designadas como: MnP2, MnP3, MnP6, MnP1 y MnP4; esto en comparación cuando crece esta cepa con la sola presencia de glucosa, donde no son encontradas. Por otra parte, Rothschild *et al.*, (2002) reportan la producción de las enzimas de Lac, Lip y MnP por *I. lacteus* crecido en medio con limitación de nitrógeno, con una máxima producción de MnP (60 U L^{-1}) en el sexto al octavo día de incubación, encontrando cuatro isoenzimas de MnP en el décimo día 10, designadas MNP1, MNP2, MNP3 y MNP4. Adicionalmente, Salvachúa *et al.* (2013) han propuesto una secuencia de producción de peroxidasas extracelulares de *I. lacteus* que son relevantes en el proceso de delignificación de rastrojo de trigo. El hongo inicia la producción de MnP cuando se ha consumido la glucosa presente en el medio, esta actividad enzimática es tanto Mn dependiente

como independiente de dicho catión. En su esquema de fermentación de rastrojo de maíz en medio líquido, después de una reducción transitoria de la actividad, el hongo reinicia la producción de MnP hacia la tercera semana de incubación junto con un incremento significativo de la actividad de Dye Peroxidasa (DyP), descrita como una enzima fundamental en la delginificación del rastrojo en *I. lacteus*. A futuro sería interesante corroborar si dicho esquema de actividad enzimática se repite con la cepa aquí estudiada y su efecto en la delignificación del material vegetal.

A diferencia del resto de las cepas analizadas, *Phlebiopsis* sp. presenta mayor actividad de MnP en condiciones basales al compararlo con medio de rastrojo de maíz, encontrándose una actividad máxima de $21.49 (\pm 6.02) \text{ U mL}^{-1}$ en medio PDB hacia el séptimo día de incubación, mientras que en medio CR alcanza una máxima de $15.63 \pm 4.49 \text{ U mL}^{-1}$ hasta el decimo día. En estudios anteriores, la misma cepa mostró una actividad máxima de MnP de $75.69 \pm 7.94 \text{ U mL}^{-1}$ en presencia de pulpa kraft y prácticamente el doble de actividad en medio PDB que el aquí observado (Damián-Robles *et al.* 2017). Una explicación para la mayor producción de actividad enzimática en medio PDB en relación al medio CR en el presente estudio, así como para las diferencias en actividad entre el presente trabajo y el estudio previo, pueden ser los diferentes componentes liberados en los medios de cultivo que regulen la expresión de los genes involucrados. Por ejemplo, Hori *et al.*, (2014), encuentra que la transcripción de ciertos genes, como MOX (Phlg1_120749) en *P. gigantea* incubado en madera de pino, juegan un rol importante en la producción de H_2O_2 . El cual se asocia a la de-metilación de la lignina y tiene un papel clave en la actividad de enzimas peroxidases como la MnP. Por lo cual, se podría evaluar posteriormente la transcripción de este gen para cultivos con diferentes fuentes de lignina y carbono como con rastrojo de maíz y glucosa.

La baja actividad de Lac y MnP en medio PDB en las cepas *T. versicolor*, *Ganoderma* sp. e *I. lacteus* puede indicar represión catabólica o inhibición por la falta o presencia de algún componente del medio. Como ya se ha mencionado, la expresión de isoenzimas de MnP depende de la acumulación de específicos inductores en diferentes estados de degradación de la lignina. Schlosser *et al.*, (1997) documentan que la máxima actividad de lacasa de *T. versicolor* cultivado en presencia de rastrojo de trigo es al menos tres veces más alta que la observada en medio con glucosa. De la misma manera, la actividad y estabilidad de MnP depende de compuestos orgánicos o metales en el medio como Mn^{2+} , Co^{2+} o Cu^{2+} . Boer *et al.* (2006) encuentra que la

concentración de Co^{2+} a 5 mM aumenta la actividad de MnP, mientras que Bilal *et al.* (2015) muestran que el Mn^{2+} (20 mM) juega un rol principal en la actividad de MnP de *G. lucidum*, aunque también hay inducción por Cu^{2+} (20 mM). En dicho trabajo se observa que los cationes Zn^{2+} y Fe^{2+} inhiben la actividad de MnP y con K^{+} no se tienen efectos negativos a la hora de la lectura de la MnP. Por lo que a futuro sería interesante analizar en las cepas de estudio el efecto de distintos cationes divalentes en las actividades de las enzimas ligninolíticas, con la finalidad de optimizar su producción.

Composición química del rastrojo obtenido de los ensayos de fermentación en medio líquido

Los valores de FDN muestran que el consumo de azúcares simples en *T. versicolor* y *Phlebiopsis* sp. es mayor al quinto día de incubación. Dicho consumo disminuye al décimo día, lo que se refleja en una disminución en los valores de FDN (Tabla 1). El patrón de consumo de azúcares y valores de FDN en *Ganoderma* sp. es el opuesto al de las dos especies anteriores, en los dos periodos de incubación medidos. En *I. lacteus* se mantiene el mismo consumo de azúcares simples durante todo el periodo de incubación. La mayor pérdida de lignina en el rastrojo evaluado es con las cepas de *I. lacteus* y *Ganoderma* sp. al décimo día de incubación, con valores de disminución respecto al control de 48.27 al 52.09%, respectivamente (Tabla 1).

En el décimo día de incubación la actividad de Lac en *T. versicolor* disminuyó después de alcanzar su máximo al quinto día, mientras que la de MnP se incrementa después del mismo periodo (Fig. 5). En el análisis de la fibra entre esos dos días de medición se observa una disminución del contenido de lignina, relacionado con el aumento de Lac, una disminución de MnP y una menor utilización de carbohidratos no estructurales. Estos resultados concuerdan con reportes para otras cepas del género, en los que la Lac se ha documentado como la enzima predominante en procesos de fermentación sumergida relacionados con la pérdida de lignina en distintos sustratos vegetales. Sin embargo, en el presente estudio se observan mayores porcentajes de delignificación en un menor tiempo de incubación. Por ejemplo, *T. troglia* muestra una delignificación del 21% del rastrojo de trigo, solo después de 20 días de incubación (Gai *et al.*, 2014). En el caso de *T. gallica* la pérdida de lignina provocada en *turca* (material orgánico vegetal) es de 5.5 % después de 25 días de incubación (Hong *et al.*, 2012).

Tabla 1. Composición química de la pared celular del rastrojo de maíz tratado con diferentes basidiomicetos después de 5 y 10 días de incubación en medio líquido.

Especie	Días de incubación	%		
		FDN	FDA	AL
control	—	60.35 ^a	33.56 ^b	52.32 ^a
<i>T. versicolor</i>	5	77.27 ^b	45.27 ^a	38.2 ^b
	10	69.77 ^d	43.73 ^c	30 ^{cb}
<i>Ganoderma</i> sp.	5	66.08 ^c	39.55 ^c	37.50 ^b
	10	71.37 ^d	41.83 ^c	25.07 ^c
<i>I. lacteus</i>	5	67.51 ^c	40.92 ^c	31.38 ^{cb}
	10	66.24 ^c	38.49 ^c	27.06 ^c
<i>Phlebiopsis</i> sp.	5	70.54 ^d	42.46 ^c	38.05 ^b
	10	66.27 ^c	39.27 ^c	31.38 ^{cb}

^{a,b,c,d}Diferencias estadísticamente significativas entre columnas (P<0.05). FDN, Fibra detergente neutro; FDA, Fibra detergente ácido; AL, Lignina.

En *Ganoderma* sp. el incremento de las actividades de Lac y MnP corresponde a un incremento en el consumo de lignina entre los días de medición comparados (Fig. 5). En contraste con los resultados obtenidos en el presente estudio, Kuhar y Papinutti (2014) muestran una correlación negativa al aumentar la actividad enzimática de Lac y la reducción en la utilización de azúcares simples en *Ganoderma* sp. Mientras que en *I. lacteus* la disminución del contenido de lignina se relaciona a una menor actividad de MnP (Fig. 5). Resultados similares se observan en fermentación en medio sólido con rastrojo de maíz inoculado con *I. lacteus*, reportándose una pérdida de lignina 25.48% a los 21 días de incubación. Al adicionar 0.01 mM g⁻¹ de Mn²⁺ se observa un aumento de 59.88% en la delignificación (Song *et al.*, 2013), lo cual, como ya se abordó anteriormente, podría influir en la actividad de MnP y a su vez en un incremento en la delignificación.

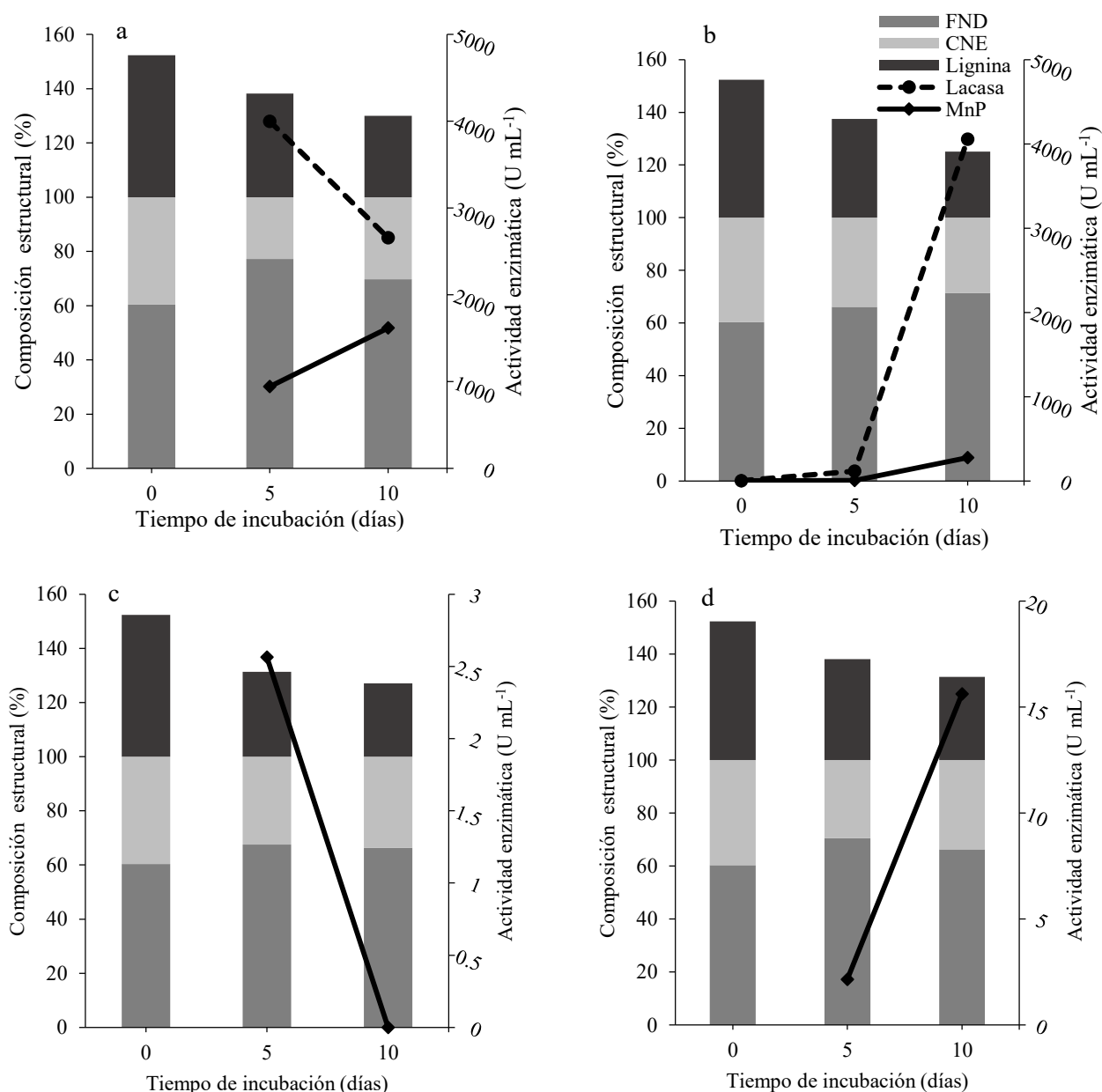


Figura 5. Actividad enzimática de MnP y Lac y la relación de componentes celulares del rastrojo de maíz inoculado con *T. versicolor* (a), *Ganoderma* sp. (b), *I. lacteus* (c) y *Phlebiopsis* sp. (d) en medio CR. FDN, Fibra Detergente Neutro; CNE, Carbohidratos No Estructurales; MnP, Manganese peroxidasa.

En *Phlebiopsis* sp. se presenta una disminución en el contenido de lignina asociado a una mayor actividad de MnP (Fig. 5), y es interesante resaltar que aunque la actividad de MnP de esta cepa es menor en comparación de las demás cepas analizadas, muestra una delignificación considerable. La información sobre la producción de enzimas ligninolíticas y la delignificación en *Phlebiopsis* spp. es limitada, pero la observación anterior concuerda con la falta de correlación entre las actividades de enzimas ligninolíticas y la pérdida de lignina mostrada en *I. lacteus* (Salvachúa *et al.*, 2013). Esto puede explicarse parcialmente por el hecho

de que aparte de las tres enzimas ligninolíticas aquí medidas, otras enzimas oxidasas también participan en la delignificación de la biomasa vegetal, así como mediadores y radicales libres (Leonowicz *et al.*, 1999).

Como se mencionó anteriormente, es importante considerar que la pérdida de lignina está asociada con diversos factores como la cantidad de inóculo fúngico utilizado, la naturaleza del material vegetal, la acidez del medio, la cantidad de nutrientes disponibles como minerales, vitaminas o azúcares, el tamaño de partícula de la biomasa, proceso al que es sometido previamente el material vegetal. Kirk *et al.* (1978) evaluaron diferentes parámetros en la delignificación de lignina sintética inoculada con *P. chrysosporium*, observando que un pH entre 4 y 4.5 la conversión de lignina a CO₂ fue mayor (37-38%), que con pH de 3 o de 6 (3-8%). Además, encontraron que los carbohidratos como la glucosa (0.56 mM) y celulosa ayudan a la descomposición de la lignina en un 38 a 41%. Por último, mostraron que era más importante la concentración que el tipo de fuente de N, siendo 2.4 mM de N la concentración necesaria para incrementar la actividad enzimática y con ello la delignificación.

Baker *et al.* (2015) encontraron que al crecer *Ceriporiopsis subvermispora* en *Miscanthus sp.* previamente refinado a una presión de 6 bar, las pérdidas de lignina aumentan mostrando proporción celulosa/lignina de 1.2/0.7), mientras que la biomasa únicamente molida sin tratamiento fúngico presenta una proporción celulosa/lignina de 1.2/0.9. Gupta y Kumar (2018) observaron un efecto en el crecimiento micelial de 8% de *G. lucidum* y la producción de Lac que aumenta de 801.2 a 1 989.4 U L⁻¹, cuando el medio contiene 42% de azúcares insolubles y 36% de solubles de rastrojo de trigo. Aunque el efecto individual de estos nutrientes no está del todo claro, por lo que se requieren más estudios en este sentido.

Actividad enzimática en ensayos de fermentación en sustrato sólido (FSS)

Lacasa

En los ensayos de FSS *Ganoderma sp.*, presentó la máxima actividad de Lac después de 18 días de incubación, con un valor de $1\,586.57 \pm 698.71$ U mL⁻¹ (Fig. 6), mientras que la máxima actividad enzimática en *T. versicolor* fue al sexto día con 480.78 ± 47.10 U mL⁻¹, mostrando otro pico de actividad en el día 30, con 301.85 ± 63.86 U mL⁻¹.

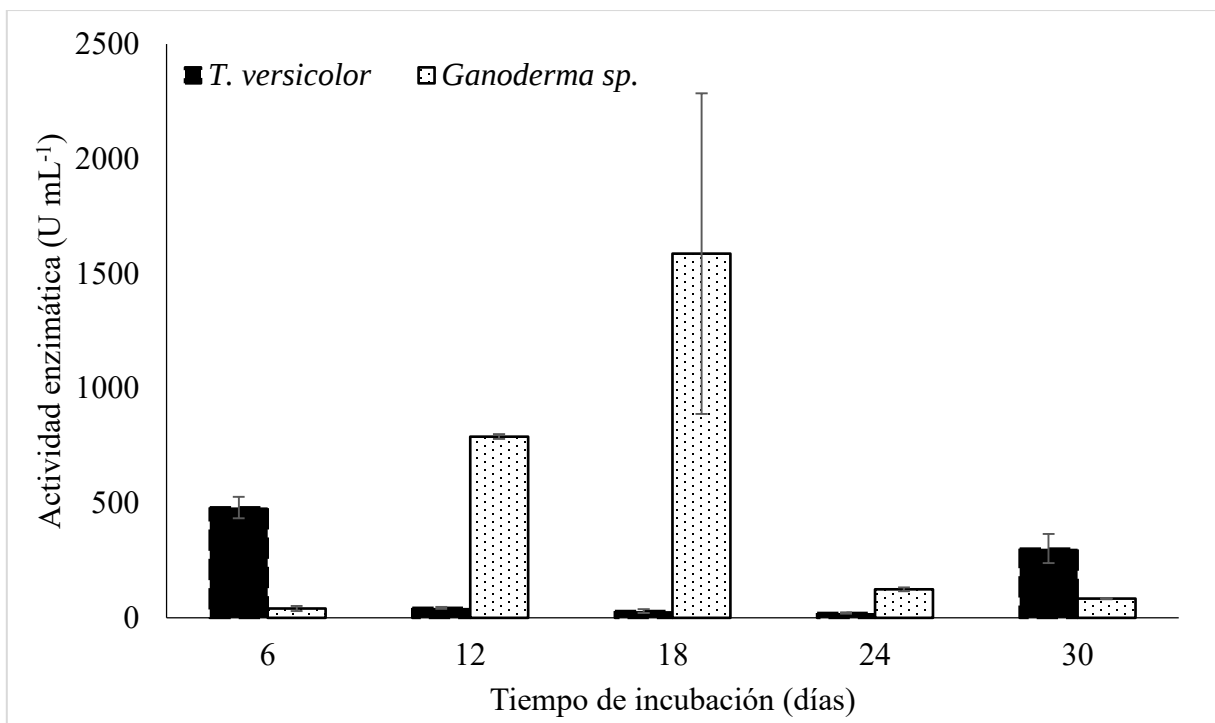


Figura 6. Actividad enzimática de Lac de *T. versicolor* y *Ganoderma sp.* inoculado con rastrojo de maíz en medio sólido. Los cultivos se incubaron sin agitación a 28 °C.

Al convertir los datos obtenidos de U mL⁻¹ a U g⁻¹ (datos no mostrados) en *T. versicolor* se obtienen dos picos de actividad de Lac, los días 6 y 30 con 34.58 ± 3.38 y 40.59 ± 14.06 U g⁻¹, respectivamente. Dichos valores concuerdan con el estudio de Zeng *et al.* (2017), quienes analizan diferentes residuos de cosecha inoculados con *T. versicolor* en medio sólido, encontrando la máxima actividad de lacasa al día 10 con rastrojo de maíz (32.09 U g⁻¹), mientras que con paja de arroz obtienen una menor actividad, de 22.25 U g⁻¹. La diferencia en la actividad se atribuye principalmente a la fuente de carbono utilizada para la inducción, o sea, al material vegetal utilizado (Knežević *et al.*, 2016). En *T. hirsuta* la Lac juega un rol principal en la delignificación de rastrojo de maíz, teniendo un pico de actividad al día 7 (0.8 U g⁻¹) en ensayos de fermentación en sustrato sólido con una pérdida de lignina de 14.95% (Sun *et al.*, 2011), y aunque menor la actividad de Lac que en el presente estudio, es mayor la delignificación. La máxima actividad de Lac en *Ganoderma sp.* es de 140 U g⁻¹ al día 18 de incubación, mientras que, como se mencionó anteriormente, *T. versicolor* tiene su pico al día seis con 34.58 U g⁻¹. Nuestro trabajo muestra similitudes con los resultados reportados por Kuhar *et al.* (2015), quienes estudian *G. lucidum* y *T. versicolor* inoculadas en aserrín de álamo en ensayo de FSS, encontrando que al día 14 de incubación la actividad de Lac es mayor en *G. lucidum* (2.24 U g⁻¹).

¹) respecto a *T. versicolor* (0.86 U g^{-1}). No obstante, como se observa, las actividades enzimáticas son más altas en este trabajo. No obstante, se han documentado valores de actividad de Lac hasta de $2\,400 \text{ U g}^{-1}$ cuando *Ganoderma sp.* se inocula en rastrojo de salvado, e incrementos hasta un valor de $10\,050 \text{ U g}^{-1}$ al adicionar extracto de levadura y almidón al ensayo de FSS (Revankar *et al.*, 2007).

El contraste de trabajos anteriores con los resultados obtenidos en este estudio debe de considerar, nuevamente, las características genéticas y bioquímicas de las cepas utilizadas, la composición del material vegetal y las relaciones de lignina/celulosa/hemicelulosa, entre otros factores. En particular, es interesante considerar la posibilidad de que la cepa de *Ganoderma sp.* exprese varias isoenzimas diferencialmente, dependiendo de las condiciones de cultivo. Por ejemplo, con *G. applanatum* inoculada en rastrojo de avena o trigo, induce la expresión de dos isoformas de Lac de 29 y 40 kDa respectivamente (Ćilerdžić *et al.*, 2016). En *G. lucidum* se ha observado la producción de cuatro isoformas de Lac (dos con pI de 4.6 y dos de pI de 3.6) cuando se cultiva en presencia de rastrojo de trigo con fuentes de nitrógeno inorgánico, NH_4NO_3 y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pero solo aparecen dos isoenzimas (pI 3.6) en medio suplementado con peptona como fuente de nitrógeno (Stajić *et al.*, 2009). En este aspecto, sería interesante analizar el tipo de isoenzimas producidas al inocular la cepa de *Ganoderma sp.* aquí analizada con fuentes ricas en azúcares simples y otros nutrientes como nitrógeno en medio sólido. Esto podría inducir la expresión de diferentes isoenzimas de Lac e incrementar el proceso de delignificación.

Manganeso Peroxidasa

La cepa de *T. versicolor* presentó la máxima actividad enzimática de MnP el día 12, con un valor de $39.23 \pm 1.66 \text{ U mL}^{-1}$, mientras que en *Ganoderma sp.* la máxima actividad se observó al día 18, con $18.75 (\pm 7.15) \text{ U mL}^{-1}$ (Figura 7). La máxima actividad enzimática en *Phlebiopsis sp.* se registró el día 24, siendo de $2.72 (\pm 0.66) \text{ U mL}^{-1}$, y en el caso de *I. lacteus* no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los días de incubación y la actividad de MnP.

Es necesario resaltar que los valores de actividad enzimática de Lac y MnP fueron menores a los encontrados en medio líquido, evidentemente como consecuencia de las diferencias en la cantidad de material vegetal inoculado, cantidad de inóculo, y en el hecho de que en los ensayos de FSS no hay fuente extra de carbono como la dextrosa. Además, las

diferencias de aereación, agitación y toma de alícuotas para los ensayos enzimáticos entre los dos métodos de cultivo también son un factor importante a considerar. Por lo anterior, es importante tener en mente dichas diferencias en las comparaciones siguientes.

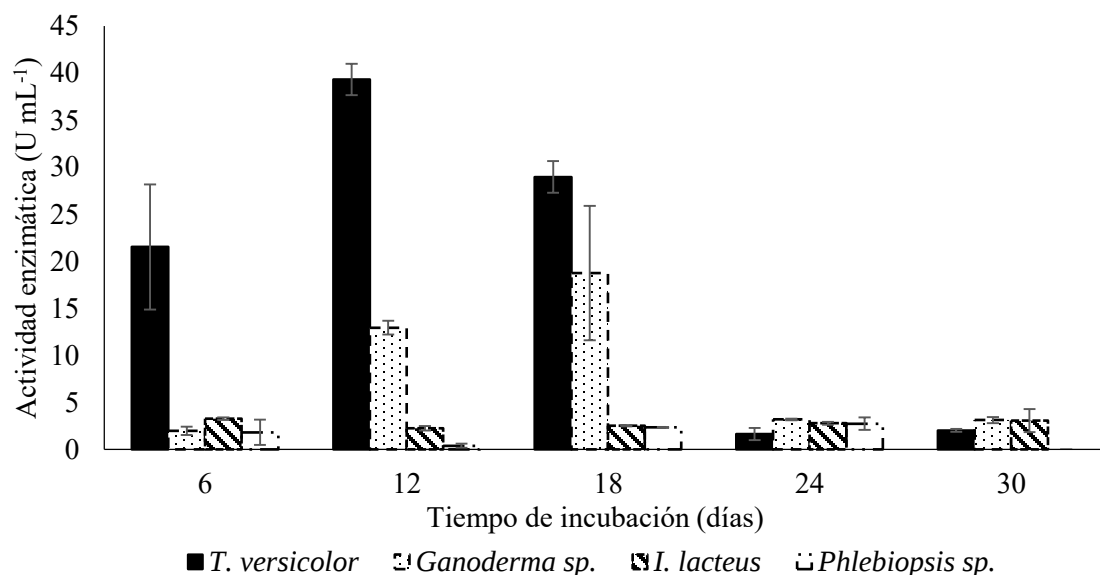


Figura 7. Actividad enzimática de MnP de *T. versicolor*, *Ganoderma sp.*, *I. lacteus* y *Phlebiopsis sp.* inoculados con rastrojo de maíz en medio sólido. Los cultivos se incubaron a 28 °C.

Los patrones de actividad de lacasa y MnP en la cepa de *T. versicolor* aquí estudiada concuerdan con los documentados por Nasir *et al.*, (2011), quienes al inocular a la cepa en rastrojo de trigo, arroz y de maíz, registran primero mayor actividad de MnP y posteriormente de lignin-peroxidasa (LiP) y Lac. También, los resultados de actividad de MnP aquí obtenidos concuerdan con Čilerdžić *et al.* (2016), quienes documentan una mayor actividad enzimática en medio líquido respecto al cultivo en medio sólido cuando crecen a *G. applanatum* en rastrojo de trigo y de avena. También encuentran diferencias en la inducción de dicha enzima de acuerdo al material vegetal, siendo el rastrojo de avena la mejor fuente de carbono para la inducción de MnP. Por otra parte, Bilal *et al.* (2015) encontraron una mejor inducción de MnP al inocular *G. lucidum* con salvado de trigo a un 50% de humedad, un pH de 5.5 y una temperatura de 30 °C, y suplementando el medio con 2% de glucosa, 0.02% de nitrógeno y una proporción C:N de 25:1. Además, un incremento en la actividad enzimática ligninolítica y la consecuente degradación de la pared celular del rastrojo puede manifestarse por la presencia de

iones metálicos en el rastrojo, como de Cu^{2+} , Zn^{2+} y Co^{2+} a concentraciones de 10 mM, pero varía dependiendo de la capacidad de la especie de hongo ligninolítico para absorber los iones metálicos presentes en el sustrato (Zeng *et al.*, 2017).

Composición química del rastrojo residual obtenido de los ensayos de fermentación en sustrato sólido.

La composición química de la biomasa vegetal vegetal varía significativamente debido a cambios en la pared celular incluso en la misma especie de planta, ya que hay modificaciones en la síntesis y unión o posición de los polisacáridos que la conforman, regulados por cientos de genes que codifican enzimas biosintéticas (ej. glicosiltransferasas) que responden a procesos dinámicos ante factores abióticos y bióticos, para que la planta pueda desarrollarse de manera adecuada (Burton *et al.*, 2010; Dhugga, 2012; Verbančič *et al.*, 2017).

La composición de la pared celular del rastrojo de maíz aquí empleado sin tratamiento fúngico (Tabla 2) es similar a la reportada por Tirado-González *et al.* (2016), quienes al analizar cuatro especies de rastrojo de maíz híbrido obtienen un porcentaje de FDN de 66 a 71%, para FDA de 44 a 50%, para lignina de 4.6 a 7% y de 37 a 39% y de 21 a 25%, para celulosa y hemicelulosa, respectivamente. Estos niveles son distintos a los reportados en otros estudios en los que se analizan rastrojos de variedades de maíz cultivados en diferentes regiones geográficas, obteniendo porcentajes de lignina de 13.65%, y de celulosa y hemicelulosa del 26.34 y 46.31%, respectivamente (Sun *et al.*, 2011).

La inoculación de las cepas fúngicas en el rastrojo de maíz genera cambios en las proporciones de los componentes químicos de la pared celular, con un “aumento” en los porcentajes de FDN, FDA, hemicelulosa y lignina, y una disminución en el contenido de proteína cruda (Tabla 2), en comparación con el rastrojo sin tratar. Esto como resultado de la modificación en la concentración de los componentes celulares de material vegetal. En cuanto al contenido de proteína cruda, los porcentajes aquí encontrados concuerdan con el reporte de Días-Godínez y Sánchez (2002), quienes trabajando con *Pleurotus ostreatus* inoculado en rastrojo de maíz no encuentran cambios en el valor de dicho parámetro hacia el octavo día de incubación.

La pérdida de material seco de rastrojo de maíz inoculado con las cepas va de 21% a 37%, lo cual puede explicar este “aumento”, ya que hay un consumo de carbohidratos no

estructurales de la planta como los azúcares simples y almidones (Tabla 3). A los seis días de incubación las cepas fúngicas de estudio consumen dichos carbohidratos en la misma proporción que los carbohidratos fibrosos y después del día 12 empiezan a consumir en mayor medida la FDN (celulosa y hemicelulosa). Contra lo esperado, se observaron bajos porcentajes de pérdida de lignina, siendo máxima para *Ganoderma sp.* con un valor de 2.29 % en el día 18. Los datos de fibra aquí obtenidos concuerdan con Tuyen *et al.* (2012) al analizar paja de trigo tratada con *G. lucidum* y *T. versicolor*, encontrando que la composición a los 42 días de incubación es de 80% y 68 % de FDN y 52% y 44% de FDA, respectivamente; valores similares o idénticos a los del material vegetal sin tratar, con 80% de FDN y 51% de FDA.

Tabla 2. Análisis químico del rastrojo de maíz tratado con distintas cepas de hongos basidiomicetes.

Cepa	Días de inoculación	Pérdida de MS* (%)	CNE**	g kg ⁻¹ de MS			PC (%)
				FDN	FDA	AL	
Control		0	326.01 ^a	673.99 ^a	383.21 ^a	54 ^a	5.75 ^a
	6	28	132.94 ^g	867.06 ^b	506.11 ^{bc}	88 ^{cde}	3.40 ^{ef}
<i>T. versicolor</i>	12	35	242.07 ^{bc}	757.93 ^{fg}	456.07 ^e	76 ^{cde}	4.66 ^{bc}
	18	37	258.27 ^b	741.73 ^g	431.67 ^e	74 ^e	4.67 ^{bc}
	6	26	153.89 ^{fg}	846.11 ^{bc}	502.57 ^{bcd}	80 ^{de}	3.10 ^f
<i>Ganoderma sp.</i>	12	27	151.82 ^{fg}	848.18 ^{bc}	528.45 ^b	97 ^b	3.20 ^f
	18	31	211.61 ^{cd}	788.39 ^{ef}	463.20 ^{de}	82 ^{cde}	4.05 ^{cde}
	6	29	201.47 ^{de}	798.53 ^{de}	465.45 ^{cde}	85 ^{bcd}	4.42 ^{bc}
<i>I. lacteus</i>	12	30	152.29 ^{fg}	847.71 ^{bc}	504.63 ^{bcd}	87 ^{bcd}	3.66 ^{def}
	18	33	218.69 ^{cd}	781.31 ^{ef}	455.16 ^e	79 ^{cde}	4.92 ^b
	6	11	224.68 ^{bcd}	775.32 ^{efg}	459.40 ^e	78 ^{cde}	4.20 ^{cd}
<i>Phlebiopsis sp.</i>	12	15	168.61 ^{ef}	831.39 ^{cd}	503.23 ^{bcd}	89 ^{bc}	3.53 ^{def}
	18	21	219.68 ^{cd}	780.32 ^{ef}	459.86 ^e	77 ^{de}	5.08 ^{ab}

^{a,b,c,d,e,f,g}. Diferencias estadísticas entre columnas (P<0.05). *MS, Materia seca; ** CNE, Carbohidratos No Estructurales. FDN, Fibra Detergente Neutro; FDA, Fibra Detergente Ácido; AL, Lignina; PC, Proteína Cruda.

Los resultados del presente estudio muestran que la delignificación es considerablemente menor a la de algunos reportes previos, en los que se documentan pérdidas de lignina de

diferentes esquilmos agrícolas de 13% hasta 70% cuando se inoculan con *T. versicolor* en ensayos de fermentación en sustrato sólido (Wan y Li, 2010; Arora *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2011; Gai *et al.*, 2014; Čilerdžić *et al.*, 2016). No obstante, existen otros trabajos en los que la delignificación de rastrojo de maíz es de 1%, de manera similar a lo aquí encontrados, como en el caso de *Ganoderma lobatum* (Saha *et al.*, 2016). Para *G. applanatum* hay reportes de pérdidas de lignina del 13.5% al séptimo día de incubación, incubado en rastrojo de trigo (Čilerdžić *et al.*, 2016). Todos estos datos demuestran lo importante que es buscar la mejor relación cepa/material vegetal (Saha *et al.*, 2016), con la finalidad de obtener resultados de delignificación óptimos en rastrojo.

La pérdida de materia seca, de carbohidratos no estructurales de hasta el 19% y la baja delignificación obtenidas en este trabajo (Tabla 3) pueden estar relacionadas con el hecho de que no se utilizó ninguna fuente de carbono adicional que estuviera disponible para las cepas fúngicas de estudio. En ese sentido, Niu *et al.* (2018) encuentran que los hongos consumen una proporción de nutrientes más accesibles que la lignina durante las etapas iniciales del crecimiento, como los carbohidratos no estructurales de la planta.

Tabla 3. Pérdida de componentes celulares del rastrojo de maíz inoculado con hongos basidiomicetos a distintos tiempos.

Cepa	Días de inoculación	Pérdida de MS* (%)	Pérdida en %			
			NSC**	FDN	FDA	Lignina
<i>T. versicolor</i>	6	28	19.31	22.67	11.48	1.07
	12	35	9.55	31.48	14.36	1.09
	18	37	6.92	34.53	7.46	1.28
<i>Ganoderma</i> sp.	6	26	17.21	21.32	10.71	1.71
	12	27	16.51	22.50	11.89	2.19
	18	31	11.44	27.67	12.82	2.29
<i>I. lacteus</i>	6	29	12.45	25.65	11.94	2.20
	12	30	17.04	25.12	12.67	2.21
	18	33	10.57	29.60	6.74	1.18
<i>Phlebiopsis</i> sp.	6	21	10.97	18.65	8.57	1.47
	12	24	15.74	20.22	10.18	1.82
	18	25	11.69	21.99	10.11	1.70

a,b,c,d,e,f,g. Diferencias estadísticas entre columnas (P<0.05). *Materia seca, ** Carbohidratos no estructurales, FDN (Fibra Detergente Neutro), FDA (Fibra Detergente Ácido)

En el presente estudio se encontró una pérdida de masa similar a la documentada en rastrojo de trigo tratado con *G. adspersum* (12.6%) y *T. suaveoleus* (20.5%), después de doce días de incubación y con adición de 200 mg g⁻¹ de glucosa en el medio (Rouches *et al.* 2016). Sin embargo, es importante evaluar con precaución en la cantidad de azúcares simples que se adicionan al ensayo, ya que hay una correlación negativa con la delignificación cuando se excede cierto umbral (R^2 0.99). En este sentido, Wu *et al.*, (2005) mencionan que la cantidad óptima para mejorar la delignificación es de 1 g L⁻¹ de glucosa, ya que como se mencionó anteriormente, promueven el crecimiento del hongo. Aunque en *G. lucidum* se ha observado que la adición de glucosa 20 g L⁻¹ constituye una concentración adecuada de fuente de extra de carbono, incrementando incluso, la actividad de Lac (Ding *et al.*, 2012).

Como ya se ha comentado anteriormente, las variaciones en los valores de pérdida de MS y lignina también se encuentran estrechamente asociadas a la especie/cepa fúngica empleada, la especie y variedad de material vegetal utilizado y los días de incubación para el tratamiento fúngico. También se han comentado ya otro tipo de variables entre los ensayos de la literatura como las condiciones de incubación, la humedad, la temperatura, el tamaño de partícula del sustrato e incluso la proporción sustrato/inóculo de micelio utilizado. En este último caso, es necesario tener en cuenta que, los hongos utilizan además de la lignina, celulosa, hemicelulosa o carbohidratos no estructurales como fuente de carbono y energía, particularmente en la fase de crecimiento micelial. Lo cual se da por el rompimiento primordialmente de enlaces covalentes tipo éter o éster entre la hemicelulosa y la lignina, incrementando así la solubilidad o accesibilidad a los polisacáridos (Krause *et al.*, 2003; Hatakka, 2005; Yang *et al.*, 2010; Gaitán-Hernández *et al.*, 2011).

En el presente estudio no se encontró una relación entre la actividad de enzimas ligninolíticas de las cepas de estudio y los valores de delignificación del material vegetal, lo que concuerda con el reporte de Kuhar *et al.* (2015) quienes después de 14 días de incubación encuentran valores de delignificación altos por parte de *G. lucidum* (30%) y *T. versicolor* (42%), pero una actividad de lacasa baja, de 2.24 y 0.86 U g⁻¹ respectivamente. Los autores comentan que posiblemente tiempos de incubación más prolongados les hubieran permitido establecer una relación positiva entre estos parámetros.

Las pérdidas de lignina reportadas previamente (Saha *et al.*, 2016) para *I. lacteus* (46.7%) son mayores a las encontradas en la presente investigación. Se han analizado también cambios estructurales que sufre el rastrojo de maíz a los 15 días de incubación con *I. lacteus*, encontrando la producción de grupos hidroxil alifáticos y la ruptura de uniones carbono de β -5', 5-5' y C=C de grupos coníferoles (Yang *et al.*, 2010).

A la fecha no se ha reportado la delignificación de subproductos de la cosecha de granos por parte de especies del género *Phlebiopsis*, por lo que sin duda alguna representa un área de investigación para la optimización de proceso de tratamiento de forrajes con especies y cepas del género.

Fermentación ruminal *in vitro*

Producción de gas

Al analizar la producción de gas *in vitro* por parte de la microbiota del rumen del material vegetal tratado y no tratado con las cepas fúngicas, se encontró que el rastrojo control sin tratar presentó la máxima producción de gas a las 144 h (Figura 8), con una acumulación de 136.1 mL. Al comparar el rastrojo inoculado con las cepas fúngicas de interés, la máxima producción de gas se presentó en el material inoculado con *T. versicolor* a los 6 días de incubación, con 113.35 mL; mientras que la menor producción se registró en el material inoculado con *Ganoderma sp.* a los 12 días de incubación, con 86.59 mL. Hasta donde se documentó en este estudio, el presente es el primer trabajo en el que se reportan datos respecto a la fermentación ruminal *in vitro* del rastrojo de maíz tratado con *I. lacteus*, *Ganoderma sp.* y *Phlebiopsis sp.*; sin embargo, es interesante contrastar los datos aquí generados con los reportes previos de tratamiento vegetal con distintas especies fúngicas.

Tuyen *et al.* (2012) no encuentran diferencias significativas en la producción de gas *in vitro* al comparar el rastrojo control sin tratar con el material resultante de tratar paja de trigo con once diferentes cepas de hongos, incluidas de *G. lucidum* y *T. versicolor*. Por lo anterior, los autores que concluyen que la cantidad de monoazúcares liberados por las cepas fúngicas empleadas es pequeña, lo que no es suficiente para estimular a la microbiota ruminal. Alternativamente, se ha documentado que la biomasa residual del tratamiento con los hongos contiene compuestos orgánicos liberados por el proceso de delignificación que inhiben a las bacterias ruminales, como el ácido ferúlico y el ácido p-cumárico (van Soest, 1994). Estos dos

factores pueden explicar porque en el presente trabajo el rastrojo tratado con hongos genera menos gas que la biomasa control sin tratamiento fúngico.

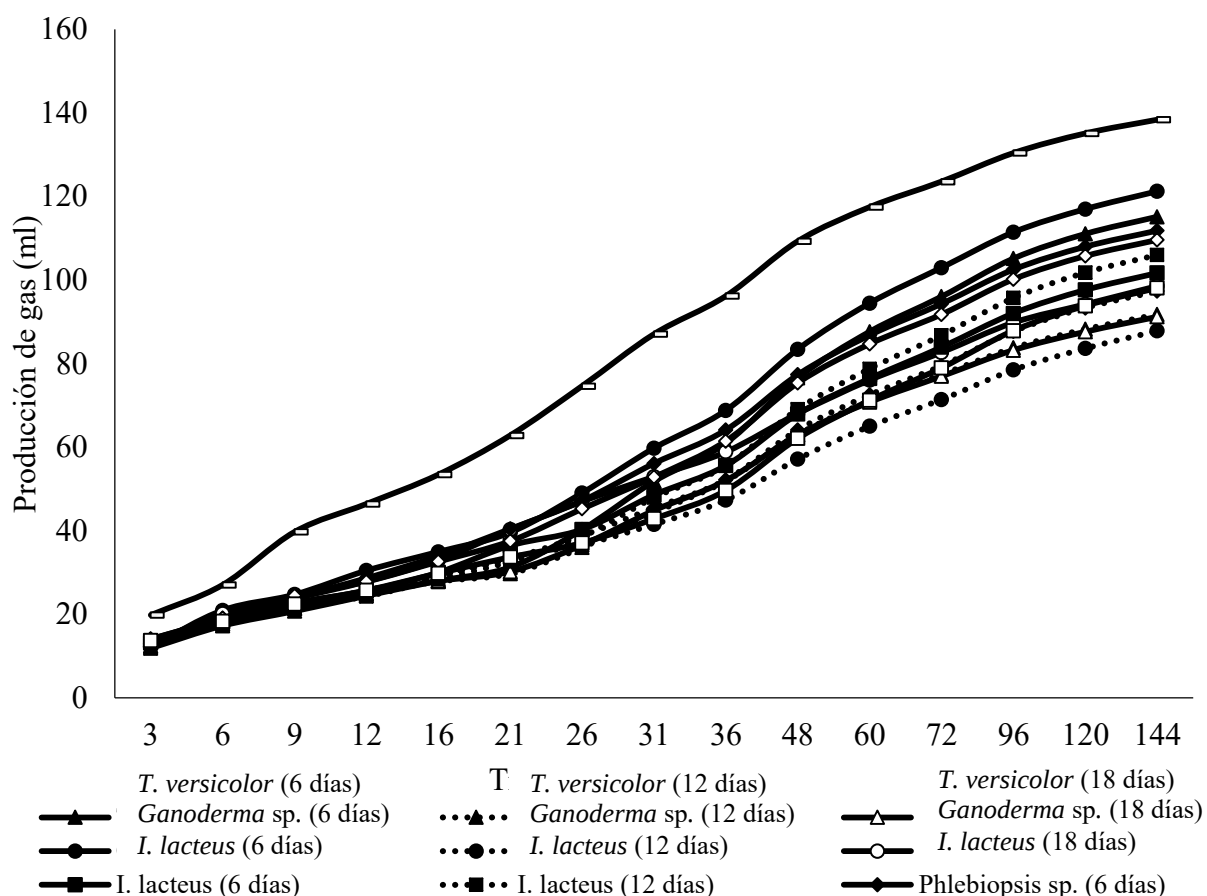


Figura 8. Producción de gas *in vitro* a 144 h de los tratamientos de rastrojo de maíz con hongos de pudrición blanca. ^{a,b,c}, Diferencias estadísticamente significativas entre cinéticas ($P < 0.05$).

En contraste con nuestros datos y otros reportes, Shrivastava *et al.* (2012) documentan un incremento en la producción de gas de rastrojo de trigo inoculado con *Ganoderma* sp. a los 5, 10 y 15 días de incubación, en comparación con la paja trigo sin tratar. Esto puede explicarse parcialmente por el hecho de que los contenidos de FDN y lignina disminuyen significativamente cuando se incuba el material con el hongo en relación al rastrojo de trigo sin tratar. La concentración de dichos componentes se ha correlacionado negativamente con la fermentación ruminal, incluyendo los procesos de producción de gas, la digestibilidad, el metano, AGV's y amoníaco.

Digestibilidad aparente (DIV), verdadera (TDIV) y de la FDN (dFDN) *in vitro*.

El aumento relativo en el contenido de FDN del rastrojo tratado con las diferentes cepas fúngicas afecta significativamente la digestibilidad de manera negativa, encontrando una disminución en ésta, que va del 15 al 25% (Tabla 4) en relación al rastrojo control. Los datos generados concuerdan con el estudio de Villegas *et al.* (2010) quienes encontraron un menor valor de DIV en la paja de sorgo tratada con hongos, disminuyendo de 53.49% en el caso del control a 43.24% y 36.47% a 20 días de incubación, dependiendo de la cepa. Dicha observación puede ser atribuible, al consumo de nutrientes durante el tiempo de crecimiento del hongo. En trabajos de rastrojo de maíz tratado con CaO, se ha observado que el porcentaje de pared celular aumenta, y aunque no se observan cambios en los patrones de AGV's (acetato y propionato) al bajar el pH debido a la naturaleza del CaO, disminuye la digestibilidad a valores entre 19 a 15.2 MS kg⁻¹, en relación al rastrojo sin tratamiento químico (Cook *et al.*, 2016). En dicho estudio tampoco se observa un aumento en el potencial de utilización de los polisacáridos como celulosa y hemicelulosa, conocido como pbFDN, lo cual coincide con los datos aquí presentados. En este sentido, las modificaciones en la fermentación ruminal se abordarán más adelante.

Tabla 4. Digestibilidad aparente (DIV), verdadera (TDIV) y de la FDN (dFDN) de los tratamientos de rastrojo de maíz con hongos de pudrición blanca a 24 h de incubación en base seca (MS).

Cepa	Días de inoculación	g kg ⁻¹ de MS		
		DIV	DIVMS	dFDN
Control		394 ^a	486 ^a	160 ^a
<i>T. versicolor</i>	6	115 ^b	231 ^{cd}	98 ^{abc}
	12	158 ^{bc}	295 ^{bcd}	52 ^{bc}
	18	176 ^{bc}	305 ^{bc}	47 ^c
<i>Ganoderma</i> sp.	6	204 ^{bc}	278 ^{bcd}	124 ^{ab}
	12	147 ^{bc}	238 ^{cd}	86 ^{abc}
	18	148 ^{bc}	270 ^{bcd}	58 ^{bc}
<i>I. lacteus</i>	6	171 ^{bc}	265 ^{bcd}	63 ^{bc}
	12	120 ^{bc}	221 ^d	69 ^{abc}
	18	149 ^{bc}	258 ^{cd}	39 ^c
<i>Phlebiopsis</i> sp.	6	169 ^{bc}	276 ^{bcd}	52 ^{bc}
	12	147 ^{bc}	248 ^{cd}	79 ^{abc}
	18	219 ^c	334 ^b	114 ^{abc}

^{a,b,c,d}Diferencias estadísticas entre columnas (P<0.05).

En contraste con los resultados de este trabajo, otros autores encuentran un aumento en la digestibilidad de rastrojo de trigo inoculado con *Ganoderma* sp. (Shrivastava *et al.*, 2012), y con para el tratamiento con *Phlebia* sp. se ha documentado un aumento de digestibilidad de un valor de 172 g kg⁻¹ para el control a 287 g kg⁻¹ (Sharma y Arora, 2010). Esto está relacionado con la disminución significativa de la lignina, incrementando así el valor nutricional del material inoculado (Sharma y Arora, 2010; Shrivastava *et al.*, 2012; Soto-Sánchez *et al.*, 2015).

Producción de Metano, AGV's y Amoníaco (NH₃-N)

El análisis realizado mostró que no hubo cambios estadísticamente significativos ($P \geq 0.05$) en la producción de NH₃-N en el rastrojo tratado con hongos en relación al control sin tratamiento. La máxima producción de gas a las 24 h de incubación fue en el rastrojo sin tratar, mientras que la menor fue en el rastrojo tratado con *I. lacteus* a los 18 días y con *Ganoderma* sp. a los 12 días de incubación (Tabla 5). La máxima proporción de metano respecto a la producción de gas fue en el material vegetal inoculado con *Ganoderma* sp. después de 18 días de incubación e *I. lacteus* a los seis días. El menor valor de proporción de metano se encontró en rastrojo sin tratar, aunque no corresponde a la mayor producción neta obtenida de este gas a 24 h de cultivo, el cual se obtuvo ($P < 0.05$) para los tratamientos de 6 días de incubación con *I. lacteus*, *Phlebiopsis* sp., *T. versicolor* y a los 18 días con *Ganoderma* sp.

La producción de AGV's, específicamente de ácidos acético y propiónico, fue mayor en el rastrojo control sin tratamiento fúngico (Tabla 6). La proporción de acetato fue mayor en el rastrojo tratado con *I. lacteus* después de 18 días de incubación ($P < 0.05$), mientras que las proporciones del resto de AGV's no mostraron diferencias estadísticas significativas ($P \geq 0.05$). De acuerdo a varios autores, para tener un crecimiento de bacterias adecuado, la producción de NH₃-N tiene que ser 50 a 190 mg L⁻¹ (Boniface *et al.*, 1986; Silva *et al.*, 2014). Aunque en el presente estudio se presentan dichos valores, Krebs y Leng (1984) mencionan que para el desarrollo de bacterias celulolíticas se necesita una producción de 220 mg L⁻¹ de NH₃-N, por lo que tal vez aquí no se generó una población suficientemente numerosa de este tipo de bacterias para utilizar la celulosa del medio. Algo que debe analizarse en un estudio próximo.

Tabla 5. Acumulación de gas, producción de metano y amoníaco (NH₃-N) del tratamiento de rastrojo de maíz con distintas cepas de basidiomicetes después de 24 h de incubación.

Cepa	Días de inoculación	NH ₃ -N (mg L ⁻¹)	Gas (μMol)	Metano (μMol)	Metano/AGV's (mol/mol)	Proporción metano
s/n	s/n	168.02	2402.62 ^a	195.07 ^{ab}	0.18	32.79 ^a
<i>T. versicolor</i>	6	140.70	1559.56	279.76 ^a	0.53	54.49
	12	154.25	1261.77	220.80 ^{ab}	0.60	45.59
	18	141.41	1319.56	223.31 ^{ab}	0.52	45.54
<i>Ganoderma</i> sp.	6	140.78	1534.40	257.13 ^{ab}	0.48	50.24
	12	159.41	1164.54 ^c	218.74 ^{ab}	0.68	46.10
	18	135.07	1404.54	214.02 ^a	0.40	57.44 ^b
<i>I. lacteus</i>	6	143.13	1557.52	286.36 ^a	0.52	55.81 ^b
	12	165.60	1341.31	173.07 ^{ab}	0.41	35.52
	18	196.13	1232.53 ^c	216.41 ^{ab}	0.57	44.96
<i>Phlebiopsis</i> sp.	6	167.01	1613.95 ^b	281.01 ^a	0.47	54.10
	12	173.97	1365.79	169.05 ^b	0.38	34.22
	18	174.44	1594.23	195.70 ^{ab}	0.36	37.85

^{a,b,c} Diferencias estadísticas entre columnas (P<0.05).

Las proporciones de acetato, propionato y butirato encontradas en el material vegetal del presente trabajo concuerdan con las de estudios realizados en alimentos fibrosos, con contenidos de 60 al 73% de FDN, en los cuales el acético es el ácido volátil de mayor producción, con proporciones de 60% a 65% (Ranilla *et al.*, 2000; Ellison *et al.*, 2016). Por otra parte, la cantidad de acetato y butirato también afectan la producción de CO₂ y CH₄ (van Soest, 1994), lo cual se observa en los presentes datos al no disminuir la cantidad del CH₄. Ellison *et al.* (2016) concluyen que la eficiencia en el aprovechamiento del alimento por parte de los microorganismos ruminales esta relacionada con la disminución de metano, ya que los productos finales de fermentación afectan la tasa y grado de degradación del alimento en el rumen (Ranilla *et al.*, 2000). Algo que se puede observar en el presente estudio, ya que al

incrementar la producción de metano, hay menos eficiencia en otros parámetros como la digestibilidad.

Tabla 6. Producción de ácidos grasos volátiles (AGV's) de los tratamientos de rastrojo de maíz con hongos basidiomicetes a las 24 h de incubación.

Cepa	Días de inoculación	pH	AGV's (μmol)					Acetato: propionato
			Total	Acético	Propiónico	Butírico	Otros*	
s/n	s/n	6.90	1085.71 ^a	774.31 ^a	200.51 ^a	78.36	102.74	3.86 ^{ab}
<i>T. versicolor</i>	6	7.01	523.75	366.25 ^{bc}	105.79	41.33	49.05	3.46 ^{bc}
	12	7.08	369.72	237.72 ^c	90.34	28.94	38.36	2.63 ^c
	18	7.06	433.02	277.91 ^{bc}	110.45	31.43	42.57	2.52 ^c
<i>Ganoderma</i> sp.	6	7.07	533.12	368.79 ^{bc}	106.13	44.38	54.60	3.47 ^{bc}
	12	7.14	322.95	228.16 ^c	60.02	26.10	33.10	3.80 ^{ab}
	18	7.00	529.48	367.77 ^{bc}	110.00	38.07	49.59	3.34 ^{bc}
<i>I. lacteus</i>	6	7.06	551.69	391.99 ^{bc}	100.22	42.90	56.80	3.91 ^{ab}
	12	7.15	425.17	302.62 ^{bc}	72.51	34.50	48.91	4.17 ^{ab}
	18	7.15	380.33	266.22 ^{bc}	59.84	35.71	51.48	4.45 ^a
<i>Phlebiopsis</i> sp.	6	7.08	603.87	432.66 ^b	103.96	47.43	63.91	4.16 ^{ab}
	12	7.07	449.17	315.72 ^{bc}	83.53	34.34	47.44	3.78 ^{ab}
	18	7.06	545.78	369.92 ^{bc}	111.89	45.41	58.79	3.31 ^{bc}

*valérico, isovalérico, isobutírico, ^{a,b,c}. Diferencias estadísticamente significativas entre columnas (P<0.05).

CONCLUSIONES

La conclusión principal del presente trabajo es que los hongos del estudio presentan significativamente la misma capacidad para delignificar el rastrojo de maíz; sin embargo, consumen otros nutrientes que ocasionan una disminución del valor nutricional inicial de este sustrato y con ello los parámetros de la fermentación ruminal

Algunas conclusiones secundarias:

El rastrojo de maíz induce significativamente la actividad enzimática de Lac y MnP de las cepas de estudio en medio líquido, en comparación con medio basal y la fermentación en sustrato sólido.

La pérdida de carbohidratos no estructurales en el rastrojo de maíz tratado en medio sólido con las cepas de hongos basidiomicetos del presente estudio fue determinante para que no hubiera una mejora en la digestibilidad.

Los parámetros de la fermentación ruminal indican que el sustrato tratado con los hongos basidiomicetes *I. lacteus*, *T. versicolor*, *Ganoderma sp.* y *Phlebiopsis sp.* es de bajo valor nutricional para el rumiante.

PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES

En el tratamiento del rastrojo de maíz en los ensayos de fermentación en sustrato sólido con las cepas de estudio, se recomienda evaluar la densidad de inóculo adecuada, así como la posibilidad de emplear distintas fuentes de carbono (azúcares simples, almidón) y medios de cultivo, con la finalidad de optimizar el proceso de delignificación y mejorar la digestibilidad *in vitro* del sustrato.

Sería conveniente analizar el contenido de cationes divalentes del rastrojo de maíz, particularmente de Mn^{+2} y Cu^{+2} ; o bien su uso como suplemento en los ensayos de fermentación en sustrato sólido, para ver su relación con las actividades enzimáticas encontradas y la eficiencia de delignificación.

Es importante cuantificar la delignificación con extracto crudo enzimático obtenido de los mismos cultivos de los hongos en medio líquido suplementado con rastrojo de maíz, ya que es un inductor adecuado de la actividad enzimática.

El análisis de secreción de isoenzimas de Lac y MnP de las cepas de estudio producidas bajo las condiciones de cultivo evaluadas en el presente trabajo es imprescindible para obtener conclusiones respecto su capacidad de secretar enzimas y su relación con la delignificación.

Es necesario realizar un análisis de los microorganismos ruminales, principalmente el tipo de bacterias que habitan el rumen con cantidades de celulosa mayores que los carbohidratos no estructurales

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Addleman, K., Archibald, F. (1993). Kraft Pulp Bleaching and Delignification by Dikaryons and Monokaryons of *Trametes versicolor*. *Applied Environ Micro.* 266-273 DOI: 0099-2240/931010266-08\$02.00/O
- Amador, A. L. R., Boschini, C. F. (2000). Fenología productiva y nutricional de maíz para la producción de forraje. *Agron Mesoam.* 11(1),171-177.
- Arora, D. S., Sharma, R. K., Chandra, P. (2011). Biodelignification of wheat straw and its effect on *in vitro* digestibility and antioxidant properties. *Int Biodeterioration Biodegrad.* 65,352-358.
- Arora, D.S., Gill, P.K. (2001). Effects of various media and supplements on laccase production by some with rot fungi. *Bioresour Technol.* 77(1),89-9
- Baker, W.P., Charlton, A., Hale, M.D.C. (2015). Increased delignification by white rot fungi after pressure refining *Miscanthus*. *Bioresour Technol.* 189,81–86.
- Baldwin, R.L. (1984). Digestion and Metabolism of Ruminants. *BioScience.* 34(4),244-249
- Bilal, M., Asgher, M., Ramzan, M. (2015). Purification and biochemical characterization of extracellular manganese peroxidase from *Ganoderma lucidum* IBL-05 and its application. DOI: 10.5897/SRE2015.6268
- Boer, C.G., Obici, L., Marques de Souza, C.G., Peralta R.M. (2006). Purification and some properties of Mn peroxidase from *Lentinula edodes*. *Process Biochem.* 41:1203-1207.
- Boniface, A.N., Murray, R.M, Hogan, J.P., (1986). Optimum level of ammonia in the rumen liquor of cattle fed tropical pasture hay. *Proc. Aust. Soc. Anim. Prod.* 16:151-154
- Burton, R. A., Gidley, M. J., Fincher, G. B. (2010). Heterogeneity in the chemistry, structure and function of plant cell walls. *Nature Chemical Biology.* 6, 724-732.
- Chaturvedi, V., Verma, P., (2013). An overview of key pretreatment processes employed for bioconversion of lignocellulosic biomass into biofuels and value added products. *Biotechnol.* 3, 415–31.
- Chen, W.T., Zheng, L.L., Jia, R., Wang, N. (2015). Cloning and expression of a new manganese peroxidase from *Irpex lacteus* F17 and its application in decolorization of reactive black 5. *Process Biochem.* 50,1748–59. doi: 10.1016/j.procbio.2015.07.009.

- Chen, X., Kuhn, E., Wang, W., Park, S., Flanagan, K., Trass, O., Tenlep, L., Tao, L., Tucker, M. (2013). Comparison of different mechanical refining technologies on the enzymatic digestibility of low severity acid pretreated corn stover. *Bioresour Technol.* 147, 401-408.
- Ćilerdžić, J., Stajić, M., Vukojević, J. (2016). Degradation of wheat Straw and oak sawdust by *Ganoderma applanatum*. *Int Biodet Biodegrad.* 114, 39-44.
- Claro-Cortés, P., Núñez, E. R., Etchevers B. J. D., Sánchez, G. P., Alvarado L. J. (2002). Respuesta en invernadero del maíz al azufre en dos suelos del estado de Puebla, México *Agrociencia.* 36(6), 633-642
- Collins, P. J., Dobson, A. (1997). Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. *Appl Environ Microbiol.* 63, 3444–3450.
- Cook, D. E., Combs, D. K., Doane, P. H., Cecava, M. J., Hal M. B. (2016). The effects on digestibility and ruminal measures of chemically treated corn stover as a partial replacement for grain in dairy diets. *J Dairy Sci.* 99, 1–10
- Cosgrove, D.J. (2005). Growth of the plant cell Wall. *Nature Reviews. Mol Cell Biol.* 6, 850-851.
- Damián-Robles, R.M., Castro-Montoya, A.J., Saucedo-Luna, J. et al. (2017). Characterization of ligninolytic enzyme production in white-rot wild fungal strains suitable for kraft pulp bleaching. *Biotechnol.* 7, 319. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0968-2>
- Dhugga, K. S. (2012). Biosynthesis of non.cellulosic polysaccharides of plant cell walls. *Phytochemistry.* 74, 8-19.
- Díaz-Godínez G.; Sánchez C. (2002). In situ digestibility and nutritive value of maize straw generated after *Pleurotus ostreatus* cultivation. *Can J Anim Sci* DOI: 187.195.38.121
- Ding, Z., Peng, L., Chen, Y., Zhang, L., Shi, G., Zhang, K. (2012). Production and characterization of thermostable laccase from the mushroom, *Ganoderma lucidum*, using submerged fermentation. *Afr J Microbiol Res.* 6(6), 1147-1157. DOI: 10.5897/AJMR11.1257
- Elissetche J.P., Ferraz A., Freer J., Rodriguez J. (2007). Enzymes produced by *Ganoderma australe* growing on wood and in submerged cultures. *World J Microbiol Biotechnol* 23:429–434. <https://doi.org/10.1007/s11274-006-9243-0>

- Ellison, M. J., Conant, G. C., Lamberson, W. R., Cockrum, R. R., Austin, K. J., Rule, D. C., Cammack, K. M. (2016). Diet and feed efficiency status affect rumen microbial profiles of sheep. *Small Ruminant Res.* 156, 12-19.
- Erden, E., Ucar, M. C., Gezer, T., Pazarlioglu, N. K. (2009). Screening for ligninolytic enzymes from autochthonous fungi and applications for decolorization of Remazole Marine Blue. *Braz J Microbiol.* 40(2), 346–353. <http://doi.org/10.1590/S1517-838220090002000026>
- Eyhorn, F., Heeb, M., Weidmann, G. (2002). Manual de capacitación en agricultura orgánica para los trópicos. En línea. http://sipan.inta.gob.ar/productos/ssd/vc/add/Manuales/IFOAM_manual%20agri%20organica%20tropicos.pdf (Consultado el 20 de enero del 2018)
- Falade A. O., Nwodo U. U., Iweriebor B. C., Green E., Mabinya L. V. and Okoh A. I. (2017) Lignin peroxidase functionalities and prospective applications. *Microbiol Open.* 6:e00394. <https://doi.org/10.1002/mbo3.394>
- Fang, Z., Liu, X., Chen, L., Shen, Y., Zhang, X., Fang, X., Wang, X., Bao, X., Xiao, Y. (2015) Identification of a laccase Glac15 from *Ganoderma lucidum* 77002 and its application in bioethanol production. *Biotech Biofuels.* 8,1–12.gai
- Floudas, D., Binder, M., Riley, R., Barry, K., Blanchette, R.A., Henrissat, B., Martinez, A.T., Otilar, R., Spatafora, J.W., Yadav, J.S., Aerts, A., Benoit, I., Boyd, A., Carlson, A., et al. (2012). The Paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. *Science.* 29;336(6089):1715-9. doi: 10.1126/science.1221748.
- Fonseca, M. I., Tejerina, M. R., Sawostjanik-Afanasiuk S. S., Giorgio E. M., Barchuk M. L., Zapata, P. D., Villalba, L. L. (2016). Preliminary studies of new strains of *Trametes sp.* from Argentina for laccase production ability. *Braz J Microbiol.* 47(2), 287-297.
- Fuentes, J., Magaña, C., Suárez, L., Peña, R., Rodríguez, S., Ortiz de la Rosa, B. (2001). Análisis químico y digestibilidad “in vitro” de rastrojo de maíz (*Zea mays* L.). *Agron Meso.* 12(2), 189-192.
- Gai, Y. P., Zhang, W. T., Mu, Z. M., Ji, X. L. (2014). Involvement of ligninolytic enzymes in degradation of wheat straw by *Trametes trogii*. *J. App. Microbiol.* 117(1), 85-95. doi: 10.1111/jam.12529.

- Gaitán-Hernández, R., Esqueda, M., Gutiérrez, A., Beltrán-García, M. (2011). Quantitative changes in the biochemical composition of lignocellulosic residues during the vegetative growth of *Lentinula edodes*. *Braz J Microbiol.* 42, 30-40.
- Geng, W. H., Huang, T., Jin, Y. C., Song, J. L., Chang, H. M., Jameel, H. (2014). Comparison of sodium carbonate–oxygen and sodium hydroxide–oxygen pretreatments on the chemical composition and enzymatic saccharification of wheat straw. *Biore Techno.* 161, 63-68.
- Goering, H. K., Van Soest, P. J. (1970). Forage Fiber Analysis. Agricultural Handbook no. 379. Agricultural Research Service, US. Department of Agriculture. Washington, DC
- Graminha, E. B. N., Gonçalves, A. Z. L., Pirota, R. D. P. B., Balsalobre, M. A. A., Da Silva, R., Gomes, E., (2008). Enzyme production by solid-state fermentation: application to animal nutrition. *Anim Feed SciTechno.* 144(1), 1-22.
- Gupta, A. Kumar, A. J. (2018). Effects of wheat straw solid contents in fermentation media on utilization of soluble/insoluble nutrient, fungal growth and laccase production. *Biotech.* 8:35 <https://doi.org/10.1007/s13205-017-1054-5>
- Hatakka, A. (2005). Biodegradation of lignin. *Biopolymers.* 129-145. https://application.wiley-vch.de/books/biopoly/pdf/v01_kap05.pdf
- Hong, Y., Dashtban, M., Chen, S., Song R. (2012). Enzyme Production and Lignin Degradation by Four Basidiomycetous Fungi in Submerged Fermentation of Peat Containing Medium *Inter J Biol.* 4(1), 172-180. <http://dx.doi.org/10.5539/ijb.v4n1p172>
- Hori, C., Ishida, T., Igarashi, K., Samejima, M., Suzuki, H., Master, E., *et al.* (2014) Analysis of the *Phlebiopsis gigantea* genome, transcriptome and secretome provides insight into its pioneer colonization strategies of wood. *PLoS Genet.* 10(12), e1004759. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004759>
- Janusz, G., Pawlik, A., Sulej, J., Świdorska-Burek, U., Jarosz-Wilkolazka, A., Paszczyński, A. (2017). Lignin degradation: microorganisms, enzymes involved, genomes analysis and evolution. *FEMS Microbiol Rev.* 41(6), 941–962. <http://doi.org/10.1093/femsre/fux049>
- JMP, 2005. SAS/STAT User's Guide, Version 6.0.0 SAS Institute, Cary, NC, USA.
- Jung, H. G., Vogel, K. P., (1986). Influence of lignin on digestibility of forage cell wall material. *J Anim Sci.* 62, 1703-1712.

- Kirk, T. K., Farrell, R. L. (1978). Enzymatic “combustion”: The microbial degradation of lignin. *Annu Rev Microbiol.* 41, 465-505.
- Knežević A., Stajić., M., Jovanović V.M., Kovačević V., Čilerdžić J., Milovanović I., Vukojević J. (2016). Induction of wheat straw delignification by *Trametes* species. *Scientific Reports.* 24(6), 26529. doi: 10.1038/srep26529.
- Krause, D. O., Denman, S. E., Mackie, R., Morrison, M., Rae, A. L., Attwood, G. T., McSweeney, C. S. (2003). Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology, and genomics. *FEMS Microbiol Rev.* 797, 1-31.
- Krebs, G., Leng, R.A. (1984). The Effect of supplementation with molasses/urea blocks on ruminal digestion. *Proc. Aust. Soc. Anim. Prod.* 15:704-711
- Kuhar, F., Castiglia, V., Levin, L. (2015). Enhancement of laccase production and malachite green decolorization by co-culturing *Ganoderma lucidum* and *Trametes versicolor* in solid-state fermentation. *International Biodeterioration and Biodegradation.* 104, 238-243. doi: 10.1016/j.ibiod.2015.06.017.
- Kuhar, F., Papinutti, L. (2014). Optimization of laccase production by two strains of *Ganoderma lucidum* using phenolic and metallic inducers *Revista Argentina Microbiología.* 46(2),144-149
- Kumar A., Sharma K. K., Kumar P., Ramchiary N. (2015). Laccase isozymes from *Ganoderma lucidum* MDU-7: Isolation, characterization, catalytic properties and differential role during oxidative stress. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 113, 68–75. 10.1016/j.molcatb.2015.01.010
- Leonowicz, A., Matuszewska, A., Luterek, J., Ziegenhagen, D., Wojtas-Wasilewska, M., Cho, N.S., Hofrichter, M., Rogalski, J. (1999). Biodegradation of lignin by white-rot fungi. *Fungal Genetics and Biology.* 27, 175-185.
- Liu, J. X., Orskov, E. R., Chen X. B. (1999). Optimization of steam treatment as a method for upgrading rice straw as feeds. *Anim Feed Sci Techno.* 76, 345-357.
- Macedo, R.J. (2000). Análisis del sistema de alimentación pecuario rastrojo de maíz alimenticio pecuario (*Zea mays*) – pasto estrella (*Cynodon plectostachyus* P.) en la zona norte del estado de Colima. (en línea). Universidad de Colima: tesis doctoral. Consultado: 24 de junio del 2016. Disponible en:

http://digeset.ucol.mx/tesis_posgrado/Pdf/Rafael%20Julio%20Macedo%20Barragan%20DOCTORADO.pdf

- Meehnian, H., Jana, A.K., Maiti, M. J. (2017). Pretreatment of cotton stalks by synergistic interaction of *Daedalea flavida* and *Phlebia radiata* in co-culture for improvement in delignification and saccharification. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 117, 68-77. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.11.022>.
- Mertens, D.R. (1992). *Nonstructural and Structural Carbohydrates in Dairy Cattle Rations*. (Am. Dairy Sci. Assoc., Champaign, IL, USA).
- Moldes, D., Lorenzo, M., Sanromán, M.A. (2004). Different proportions of laccase isoenzymes produced by submerged cultures of *Trametes versicolor* grown on lignocellulosic wastes. *Biotechnology Letters* 26, 327. <https://doi.org/10.1023/B:BILE.0000015452.40213.bf>
- Morgavi, D. P., Forano, E., Martin, C., Newbold, C. J. (2010). Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *Animal*. 4(7), 1024–1036
- Moss, A.R.; Jouany, J.P. and Newbold, J. (2000). Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Ann. Zootech*, 49. Pp. 231–253.
- Nagai, M., Sato, T., Watanabe, H., Saito, K., Kawata, M., Enei, H. (2002). Purification and characterization of an extracellular laccase from the edible mushroom *Lentinula edodes*, and decolorization of chemically different dyes. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 60,337-335
- Nasir, H.M.I., Asgher, M., Nawaz H.B. (2011). Optimization of physical and nutritional factors for synthesis of lignin degrading enzymes by a novel strain of *Trametes versicolor*. *Bioresour. 6*(2), 1273-1287.
- Niu, D., Zuo, D., Jiang, P., Tian, M., Zheng, M., Xu, C. (2018). Treatment using white rot fungi changed the chemical composition of wheat straw and enhanced digestion by rumen microbiota *in vitro*. *Animal Feed Science and Technology*. 237, 46-54. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2018.01.005>
- Okano, K., Ohkoshi, N., Nishiyama, A., Usagawa, T., Kitagaw, M. (2009). Improving the nutritive value of madake bamboo, *Phyllostachys bambusoides*, for ruminants by culturing with the white-rot fungus *Ceriporiopsis subvermispota*. *Animal Feed Science and Technology*.152, 278–285

- Paice, M. G., Reid, I. D., Bourbonnais, R., Archibald, F. S. & Jurasek, L. (1993). Manganese peroxidase, produced by *Trametes versicolor* during pulp bleaching, demethylates and delignifies kraft pulp. *Appl Environ Microbiol* 59, 260-265.
- Peláez, F., Martínez, M.J., Martínez, A.T. (1995). Screening of 68 species of basidiomycetes for enzymes involved in lignin degradation. *Mycological Research*.99,37–42
- Pointing, S.B. (2001). Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 57, 20-33.
- Qin X.; Su X; Luo H.; Ma R.; Yao B.; Ma F. (2018). Deciphering lignocellulose deconstruction by the white rot fungus *Irpex lacteus* based on genomic and transcriptomic analyses. *Biotechnology for Biofuels*201811:58 <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1060-9>
- Ranilla, M. J., Caro, M. D. Giráldez, F. J., Mantecón, A. R., González, J. S. (2000). Comparison of rumen fermentation patterns and in situ degradation of grazed herbage in Churra and Merino sheep. *Livestock Production Science*. 62, 193-204.
- Revankar, M. S., Desai, K. M., Lele, S.,S. (2007). Solid-state fermentation for enhanced production of laccase using indigenously isolated *Ganoderma* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology* 143 (1),16-26.
- Rodríguez-Couto, S., Gundín, M., Lorenzo, M., Sanromán, M. Á. (2002). Screening of supports and inducers for laccase production by *Trametes versicolor* in semi-solid-state conditions. *Process Biochemistry*. 38(2), 249-255.
- Rothschild N.; Novotný Č.; Šašek V.; Dosoretz C.G. (2002) Ligninolytic enzymes of the fungus *Irpex lacteus* (*Polyporus tulipiferae*):isolation and characterization of lignin peroxidase. *Enzyme and Microbial Technology*. 31 (2002) 627–633
- Rouches E., Zhou S., Steyer J.P., Carrere H., (2016). White- rot fungi pretreatment of lignocellulosic biomass for anaerobic digestion: Impact of glucose supplementation. *Process Biochemistry*. 51 (11) 1784-1792.
- Saha, B.C., Qureshi, N., Kennedy, G.J., Cotta, M.A. (2016). Biological pretreatment of corn stover with white-rot fungus for improved enzymatic hydrolysis. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 109, 29-35.
- Salvachúa, D., Prieto, A., Martínez, Á. T., Martínez, M. J. (2013). Characterization of a novel dye-decolorizing peroxidase (DyP)-type enzyme from *Irpex lacteus* and its application

- in enzymatic hydrolysis of wheat straw. *Applied and environmental microbiology*, 79(14), 4316-4324.
- Sánchez, A.E., Ortega, C.M.E., Mendoza, M.G., Montañez, V.O., Buntinx, D.S.E. (2012). Rastrojo de maíz tratado con urea y metionina. *Interciencia*. 37(5), 395-399.
- Schlosser, D., Grey, R., Fritsche, W. (1997). Patterns of ligninolytic enzymes in *Trametes versicolor*. Distribution of extra-and intracellular enzyme activities during cultivation on glucose, wheat straw and beech wood. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 47(4), 412-418.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2014. *Cierre de la producción agrícola por estado*. en línea. Consultado: 28 de junio de 2016. Disponible en: <http://www.siap.gob.mx>.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2017. *Atlas agroalimentario*. en línea. Consultado: 10 de diciembre de 2017. Disponible en: <https://www.gob.mx/siap/articulos/publicaciones-siap-numeros-del-campo-en-la-palma-de-la-mano?idiom=es> .
- Sharma, R.K., Arora, D.S. (2010), Changes in biochemical constituents of paddy straw during degradation by white rot fungi and its impact on *in vitro* digestibility. *Journal of Applied Microbiology*, 109, 679–686. doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04695.x
- Shi, J., Chinn, M.S., Sharma-Shivappa, R. R. (2007). Microbial pretreatment of cotton stalks by solid state cultivation of *Phanerochaete chrysosporium*. *Bioresources Technology*.99(14),6556-64. doi: 10.1016/j.biortech.2007.11.069.
- Shrivastava, B., Nandal, P., Sharma, A., Jain, K.K., Khasa, Y.P., Das, T.K., Mani V. , Kewalramani, N.J., Kundu, S.S., Kuhad, R.C. (2012). Solid state bioconversion of wheat straw into digestible and nutritive ruminant feed by *Ganoderma* sp.rckk02. *Bioresources Technology*. 107, 347-351.
- Silva, C.J., Leonel, F.P., Pereira, J. C., Costa, M. G., Moreira, L.M., Oliveira, T. S., Abreu, C. L. (2014). Sulfur sources in protein supplements for ruminants. *R. Bras. Zootec.*, 43(10), 537-543. <https://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982014001000005>
- Soccol, C.R., Ferreira da Costa, E. S., Letti, L. A. J., Karp, S. G., Woiciechowski, A. L., Vandenberghe, L.P. (2017). Recent developments and innovations in solid state fermentation, *Biotechnology Research and Innovation*, 1(1), 52-71

- Song, L., Ma, F., Zeng, Y., Zhang X., Yu, H. (2013). The promoting effects of manganese on biological pretreatment with *Irpex lacteus* and enzymatic hydrolysis of corn stover. *Bioresource Technology*. 135, 89-92
- Songulashvili, G., Elisashvili, V., Wasser, S. P., Nevo, E., Hadar, Y. (2007). Basidiomycetes laccase and manganese peroxidase activity in submerged fermentation of food industry wastes. *Enzyme and Microbial Technology*, 41, 57–61.
- Soto-Sánchez, A; Ramírez-Bribiesca J.E., Meneses-Mayo M.; Loera-Corral O; Miranda-Romero L.A.; Bárcena-Gama R. (2015). Effects of *Pleurotus sapidus* (Schulzer) Sacc. treatment on nutrient composition and ruminal fermentability of barley straw, barley rootless, and a mixture of the two. *Chilean journal of agricultural research*- 75(3).
- Sun, F. H., Li, J., Yuan, Y. X., Yan, Z.Y., Liu, X. F. (2011). Effect of biological pretreatment with *Trametes hirsuta* yj9 on enzymatic hydrolysis of corn stover. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 65(7), 931-938.
- Sundstol, F., Owen, E. (1984). Straw and other fibrous by-products as feed. Development in Animal and Veterinary Science. Elsevier. Amsterdam.
- Teerapatsakul, C., Parra, R., Bucke, C. *et al.* (2007). Improvement of laccase production from *Ganoderma* sp. KU-alk4 by medium engineering. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 23(11), 1519–1527. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9396-5>.
- Terrón, M.C., González, T., Carbajo, J. M., Yagüe, S., Arana-Cuenca, A., Téllez, A., Dobson, A.D., González, A.E.(2004). Structural close-related aromatic compounds have different effects on laccase activity and on lcc gene expression in the ligninolytic fungus *Trametes* sp. I-62. *Fungal Genetics and Biology*. 41(10), 954-62.
- Theodorou, K.M., Williams, A.B., Dahona, S.M., McAllan, B.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.
- Tian, X. F., Fang, Z., Guo, F. (2012). Impact and prospective of fungal pre-treatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 6,335–350.

- Tirado-González, D.N., Jáuregui, R.J., Tirado, E. G. G., Martínez, H. P. A., Guevara, L. F., Miranda, R. L. A. (2016). Production of cellulases and xylanases by white-rot fungi cultured in corn stover media for ruminant feed applications. *Animal Feed Science and Technology*. 221, 147-156.
- Tuyen, V. D, Cone, J. W., Baars, J. J. P., Sonnenberg A. S. M., Hendriks, W. H. (2012). Fungal strain and incubation period affect chemical composition and availability of wheat Straw for rumen fermentation. *Bioresources and Technology*. 111, 236-342.
- van Kuijk, S. J. A., Sonnenberg, A. S. M., Baars, J. J. P., Hendriks, W. H., Cone, J. W., (2015). Fungal treated lignocellulosic biomass as ruminant feed ingredient: A review. *Biotechnology Advances*. 33(1), 191-202. doi: 10.1016/j.biotechadv.2014.10.014.
- van Soest, P. J., 1994. *Nutritional Ecology of the Ruminant*, 2nd edition. Cornell University Press, Ithaca, New York, USA.
- van Soest, P. J., Robertson, J.B., Lewis, B.A. (1991). Methods for dietary fiber, and non starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*. 74, 3583–97.
- Verbančič, J., Lunn, J. E., Stitt, M., Persson S. (2017). Carbon supply and the regulation of cell Wall synthesis. *Molecular Plant*. 11(1), 75-94. doi: 10.1016/j.molp.2017.10.004.
- Villegas, C. M., Meneses, M. M., Miranda, R. L. A., Loera, C. O. (2010). Producción de gas In Vitro y desaparición de la materia seca del cultivo sólido con hongos ligninolíticos. *Agrociencia*. 44, 917-929.
- Wan C., Li. Y. (2010). Microbial delignification of corn stover by *Ceriporiopsis subvermispora* for improving cellulose digestibility. *Enzyme and Microbial Technology* 47, 31-36
- Weatherburn, M. W. (1967). Phenol- Hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal. Chem*. 39, 971-973.
- Wu J.; Xiao Y.Z; Yu H.O. (2005). Degradation of lignin in pulp mill wastewaters by white-rot fungi on biofilm. *Bioresource Technology* 96 (2005) 1357-1363.
- Yang, X., Ma, F., Zeng, Y., Yu, H., Xu, C., Zhang, X. (2010). Structure alteration of lignin in corn stover degraded by white-rot fungus *Irpex lacteus* CD2. *Int. Biodeterior. Biodegra*. 64, 119-123.
- Zeng, M, Vukojević, J, Duletić-Laušević, S. (2009). Biology of *Pleurotus eryngii* and the role in biotechnological processes: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*. 29, 55–66. doi: 10.1080/07388550802688821

- Zeng, S., Zhao, J., Xia, L. (2017). Simultaneous production of laccase and degradation of bisphenol A with *Trametes versicolor* cultivated on agricultural wastes. *Biopro. Bios. Eng.* 40,1237–1245.
- Żółciak A., Kornilowicz-Kowalska T. A., Sierota Z., Iglík H. (2008). Enzymatic activity of *Phlebiopsis gigantea* isolates. *Acta Mycol.* 43(1): 41–48.



Vincent van Gogh- Trigal con cuervos (1890)