

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

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

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

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

RESUMEN

Los pastos y forrajes son la principal fuente de alimentos para los bovinos en el trópico, pero la producción forrajera varía en calidad y cantidad a través del año afectando directamente la productividad del ganado. Una alternativa en épocas de sequías es el uso de caña de azúcar (CA), pero tiene baja digestibilidad (20 %), poca proteína (2.5 a 4.5 %) y un desequilibrio mineral. El objetivo de este estudio fue evaluar el uso de la CA integral en un proceso biotecnológico de fermentación en estado sólido (FES) con un hongo de la pudrición blanca (*Pleurotus sapidus*). La composición química del FES se evaluó en el día 0 (CF-0) y 15 (CF-15) y los valores de DIVMS, PT, FDN y FDA fueron: 1) para CF-0, 59.17, 2.53, 50.18 y 31.80 %; 2) para CF-15, 65.08, 6.23, 74.24 y 60.84 %. La actividad enzimática de celulasas, xilanasas y lacasas se evaluó sólo para CF-15: 1.96, 2.08 y 5.25 UI g⁻¹ MS. Los ensilados de CA integral incluyeron 0, 10 y 20 % de CF-15 y se evaluaron cambios en su composición química a 0, 8 y 16 d de ensilaje. A los 16 d los ensilados mostraron pH 4.2 y aumento ($p \leq 0.05$) del ácido láctico, acético y NH₃-N; en el tratamiento con 20 % CF-15 hubo mayor ($p \leq 0.05$) DIVMS (69.19 %) y volumen máximo de producción de gas *in vitro* (207.09 mL mg⁻¹ MS). El análisis de los resultados sugiere que se pueden incluir fermentos sólidos con *P. sapidus* para mejorar la DIVMS y las variables fermentativas de los ensilados de CA integral.

* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: julio, 2010. Aprobado: mayo, 2011.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 45: 675-685. 2011.

ABSTRACT

Grasses and forages are the principal food source for bovines in the tropic, but forage production varies in quality and quantity throughout the year, directly affecting cattle productivity. An alternative in dry seasons is the use of sugar cane (SC), however it has both low digestibility (20 %) and protein (2.5 to 4.5 %), and also a mineral imbalance. The objective of the present study was to evaluate the use of whole SC in a biotechnological process of solid state fermentation (SSF) with a white rot fungus (*Pleurotus sapidus*). An evaluation was made of the chemical composition of the SSF on day 0 (CF-0) and 15 (CF-15) and the values of IVDMD, TP, NDF and ADF were: 1) for CF-0, 59.17, 2.53, 50.18 and 31.80 %; 2) for CF-15, 65.08, 6.23, 74.24 and 60.84 %. The enzymatic activity of cellulases, xylanases and laccases was evaluated only for CF-15: 1.96, 2.08 and 5.25 IU g⁻¹ DM. The whole SC silage included 0, 10 and 20 % of CF-15 and changes were evaluated in its chemical composition at 0, 8 and 16 d of silage. At 16 d the silage presented pH 4.2 and increase ($p \leq 0.05$) of lactic acid, acetic acid and NH₃-N; in the treatment with 20 % CF-15 there was higher ($p \leq 0.05$) IVDMD (69.19 %) and maximum volume of *in vitro* gas production (207.09 mL mg⁻¹ DM). The analysis of the results suggests that solid ferments can be included with *P. sapidus* to improve the IVDMD and the fermentative variables of whole SC silage.

Key words: *Pleurotus sapidus*, cellulases, laccases, xylanases, fiber digestibility.

Palabras clave: *Pleurotus sapidus*, celulastas, lacasas, xilanasas, digestibilidad de la fibra.

INTRODUCCIÓN

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

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Forraje

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

INTRODUCTION

Sugar cane (SC) is an abundant forage resource in the Mexican tropic, and its principal drawback is the scant protein content and low digestibility of the fiber, due to the fact that its cell walls have a high content of hemicelluloses, cellulose and lignin (Cano *et al.*, 2003). Therefore, physical, chemical and biological treatments or their combinations are used to reduce the fiber, particularly the lignocellulose complex (Fahey *et al.*, 1993). The biological treatments with white rot fungi show great advantages due to their fibrolytic enzymes (fibrolytic extracts) obtained by biotechnological techniques such as liquid fermentation and solid state fermentation, and have contributed to the predigestion of the fibrous fraction of diverse forages and byproducts. For these treatments the type of forage, diet dose, presentation of the product (liquid or solid) are considered, along with its incorporation to the substrate of interest (Jalç *et al.*, 1999; McAllister *et al.*, 1999; Cuervo *et al.*, 2009). Among the enzymes produced by these white rot fungi are the following: cellulases (E.C.3.2.1.4), laccases (E.C.1.1.0.3.2) and xylanases (E.C.3.2.1.8), which participate in the rupture of polyphenolic compounds, and β -1,4 glycosidic bonds in polysaccharids such as cellulose and hemicelluloses, of the cell wall bonded to lignin. The objective of the present study was to evaluate the effect of the inclusion of different percentages of solid state fermentation, based on sugar cane, and the fungus *Pleurotus sapidus* in whole SC silage.

MATERIALS AND METHODS

Biological material

Forage

Whole SC was used (leaves, stem and bud), variety MEX 79-431, of one year of age, collected from a plot in the municipality of Ciudad de Ayala, Morelos, Mexico, located at 18° 46' 0" N and 98° 59' 0" W and at 1400 m altitude; with sub-humid warm climate, average annual rainfall and temperature of 800 mm and 24 °C. The SC was cut to a particle size of 1.5 to 2.5 cm with a knife grinder of ½ HP gasoline motor (Azteca, México).

Solid state fermentation CF-0 and CF-15

Solid state fermentation (SSF) CF-0 and CF-15 was obtained using 9.200 kg of whole SC exposed 48 h to air, turning it over

1.5 a 2.5 cm con una picadora de cuchillas con motor a gasolina de ½ HP (marca Azteca, México).

Fermentado en estado sólido CF-0 y CF-15

El fermentado en estado sólido (FES) CF-0 y CF-15 se obtuvo usando 9.200 kg de CA integral oreada 48 h, con volteos cada 8 h, y se mezclaron con 800 g de micelio activado con *P. sapidus* (CF-0) obtenido de la empresa Prodicet (México). El FES se almacenó en bolsas cerradas de plástico, transparentes, calibre 7, con perforaciones (1 cm), que se mantuvieron a la sombra por 0 (para CF-0) y 15 d (para CF-15) a 28 °C.

Análisis químicos de CF-0 y CF-15

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

Extracto enzimático del CF-15

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

Proteína soluble y actividad enzimática

La proteína soluble se midió con el método de Bradford (1976). El estándar fue seroalbumina bovina 0.15 M (SIGMA) disuelta en amortiguador de citrato 50 mM y pH 5.3, la mezcla de reacción fue 800 mL de extracto enzimático y 200 mL de reactivo de Bradford (Bio-Rad). Se agitó vigorosamente en vórtex y después de 5 min se leyó a λ 595 nm en un espectrofotómetro (Perkin Elmer UV/VIS, USA).

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

every 8 h, and mixing with 800 g of mycelium activated by *P. sapidus* (CF-0) bought at Prodicet enterprise (México). The SSF was stored in closed transparent plastic bags, caliber 7, with perforations (1 cm), which were maintained in shade for 0 (for CF-0) and 15 d (for CF-15) at 28 °C.

Chemical analysis of CF-0 and CF-15

In CF-0 and CF-15 an evaluation was made of dry matter (DM), total protein (TP) according to AOAC (1995), neutral (NDF) and acid (ADF) detergent fiber, hemicelluloses (HMCE) according to Van Soest *et al.* (1991) and *in vitro* digestibility of the DM (IVDMD) with the method of Menke *et al.* (1979).

Enzymatic extract of CF-15

During 20 min 30 g of CF-15 were macerated in a mortar with 45 mL of citrate buffer pH 5.3 (50 mM), manually pressed and filtered through mesh (Ayala *et al.*, 2011). The resulting liquid was centrifuged for 20 min (10 000 rpm) at 4 °C to obtain the enzymatic extract (supernatant liquid).

Soluble protein and enzymatic activity

The soluble protein was measured according to Bradford (1976). The standard was bovine seroalbumin 0.15 M (SIGMA) dissolved in citrate buffer 50 mM and pH 5.3, the reaction mixture was 800 mL of enzymatic extract and 200 mL of Bradford reactant (Bio-Rad). It was vigorously agitated in vortex and after 5 min was read at λ 595 nm in a spectrophotometer (Perkin Elmer UV/VIS, USA).

The enzymatic activity of celulasas and xylanases was measured with the dinitrosalicic acid method (DNS) for reductive sugars (Miller, 1959). In the method for celulasas, modified by Márquez *et al.* (2007) and Ayala *et al.* (2011), carboxymethylcellulose was used as substrate (CMC, medium viscosity; Sigma-Aldrich C4888) at 0.5 % in citrate buffer 50 mM and pH 4.8. For xylanases, according to the technique modified by Loera and Córdova (2003), oat xylane (Sigma X-0627) at 0.5 % was used as substrate in citrate buffer 50 mM and pH 5.3. The reading was made at λ 540 nm with a spectrophotometer (Perkin Elmer UV/VIS, USA). The enzymatic activity was reported as international units (IU), and one IU is the amount of enzyme produced by 1 μ mol of reductive sugars (xylose or glucose) for 1 min in the conditions of the reaction.

The activity of the laccases was determined according to Bourbonnais *et al.* (1997) with 2, 2' azino-bis 3-ethylbenzotiazolin-6-sulfonic acid (ABTS) as substrate (0.1 M) in citrate buffer 50 mM and pH 5.3, with a molar

produce un 1 μmol de azúcares reductores (xilosa o glucosa) por min en las condiciones de la reacción.

La actividad de lacasas se determinó según Bourbonnais *et al.* (1997) con 2, 2' azino-bis 3-etilbenzo-tiazolin-6-ácido sulfónico (ABTS) como sustrato (0.1 M) en amortiguador de citrato 50 mM y pH 5.3, con una extinción molar de 36 000 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$. Las mediciones se realizaron cada 30 s por 5 min a λ 420 nm con un espectrofotómetro (Perkin Elmer UV/VIS, USA), definiendo UI como la cantidad de enzima producida por 1 μmol de sustrato oxidado por minuto de reacción.

Ensilaje

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

Análisis químicos de los ensilados

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

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

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

extinction of 36 000 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$. The measurements were made every 30 s for 5 min at λ 420 nm with a spectrophotometer (Perkin Elmer UV/VIS, USA), defining IU as the amount of enzyme produced by 1 μmol of oxidized substrate per minute of reaction.

Silage

The material for silage (CAM) consisted of the mixture of 44 kg of whole SC (particle size 2.5 cm), 5 kg of ground corn, 0.73 kg of urea, 0.26 kg of mineral salts for bovines (Minelap, phos, LAPISA) and 0.02 kg of ammonium sulfate (Gómez *et al.*, 2011). To obtain the treatments (four replicates) 0, 10 and 20 % of CF-15 were included to the CAM, and then kept for 0, 8 and 16 d in microsilages (1 kg) in black polyethylene plastic bags (caliber 5). The mixture was compacted and the bag was hermetically sealed, and conserved between 25 and 28 °C. Thus, the treatments were as follows; CAM-0 % d0 (day 0), CAM-10 % d0, CAM-20 % d0, CAM-0 % d8 (day 8), CAM-10 % d8, CAM-20 % d8; CAM-0 % d16 (day 16), CAM-10 % d16, and CAM-20 % d16.

Chemical analysis of the silage

An evaluation was made of NDF, ADF, HMCE (Van Soest *et al.*, 1991), TP and DM (AOAC, 1995), soluble carbohydrates (Dubois *et al.*, 1956), lactic acid (Tejada, 1985), acetic acid (Erwin *et al.*, 1961), ammonia nitrogen (McCullough, 1967), and the pH was measured with a potentiometer (model 10 Fisher Scientific, USA) (AOAC, 1995).

Maximum volume of gas production (V_{max} ; $\text{mL g}^{-1} \text{DM}$)

The silage and CF-15 were dehydrated and ground (2 mm). From each treatment 0.5 g was placed in an amber glass jar and 90 mL of ruminal inoculum was added with continuous flow of CO_2 . Rumen liquid of two cannulated steers was used; the steers were adapted to a diet with 60 % of whole SC and 40 % of commercial concentrate for bovinos (18 % TP). The jars were hermetically sealed and placed in a double boiler at 39 °C (Theodorou *et al.*, 1994). The variables were as follows: 1) gas pressure at 0, 1, 2.5, 4, 6, 9, 12, 16, 20, 24, 28, 34, 40, 46, 54, 62 and 72 h of incubation; 2) IVDMD (Menke *et al.*, 1979) at 72 h. The fermented rumen liquid of each jar was filtered with Whatman #54 paper and dehydrated (60 °C, 24 h) in a forced air oven. To calculate the maximum volume of gas production (V_{max} ; $\text{mL g}^{-1} \text{DM}$) the logistic model $VA = V_{\text{max}} / (1 + \exp(2 \cdot 4 \cdot s \cdot (t - L)))$ described by Schofield and Pell (1995) was used, where VA = volume of gas produced at time t, V_{max} = maximum

MS) se usó el modelo logístico $VA = V_{max} / (1 + \exp(2 \cdot 4 \cdot s \cdot (t - L)))$ descrito por Schofield y Pell (1995), donde: VA = volumen de gas producido al tiempo t, V_{max} = volumen máximo de gas producido, s = tasa de producción de gas, t = tiempo, y L = tiempo de retardo. Los valores de presión de gas (kg cm^{-2}) se transformaron a volumen de gas (mL g^{-1} MS) con un modelo de regresión lineal.

Análisis estadístico

Para el FES con CF-0 y CF-15 el diseño experimental fue completamente al azar, con cuatro repeticiones por tratamiento y se analizaron con el procedimiento GLM (SAS, 2000), y las medias se compararon con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). El modelo estadístico fue:

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

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

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

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

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

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El contenido de humedad de la CA integral disminuyó de 84.74 a 75.99 % después de 48 h de aireación, obteniendo un nivel óptimo para una buena fermentación en estado sólido. Preston *et al.* (1976) y Pedroso *et al.* (2008) indican que es importante reducir la humedad a $< 80\%$ para optimizar las condiciones de FES y el crecimiento microbiano. La PT aumentó ($p \leq 0.05$) más de 3 % de CF-0 a CF-15 (Cuadro 1), lo cual se atribuye a la proteína microbiana y enzimas obtenidas del FES (Rajarathnam, 1979; Nair, 1989; Shashirekha *et al.*, 2005). La FDN y FDA aumentaron ($p \leq 0.05$) de 50.18, y

volume of gas production, s = rate of gas production, t = time, and L = delay time. The values of gas pressure (kg cm^{-2}) were transformed to gas volume (mL g^{-1} DM) with a linear regression model.

Statistical analysis

For the SSF with CF-0 and CF-15, the experimental design was completely randomized, with four replicates per treatment, and analyzed with the GLM procedure (SAS, 2000), and the means were compared with the Tukey test ($p \leq 0.05$). The statistical model was as follows:

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

where Y_{ij} = response variable in the i-th treatment (CF0, CF-15) and j-th replicate (1, 2, 3 and 4), μ = general mean, τ_i = effect of the i-th treatment, ε_{ij} = random error.

For the silage the experimental design was of divided in plots (Kuehl, 2001), with the following statistical model:

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

where Y_{ijk} = response variable; μ = general mean; α = effect of the percentage of inclusion of CF-15, $i = 0, 10$ and 20% ; d_{ik} = error associated with the percentage of inclusion of CF-15; β = effect of the day of silage, g_{jk} = error associated with the day of silage; $\alpha\beta_{ij}$ = interaction of the inclusion of CF-15 and the day of silage; ε_{ijk} = general error, being $k = 1, 2, 3$ and 4 . The analysis of variance was made with the GLM procedure (SAS, 2000) and the comparison of means with the Tukey test ($p \leq 0.05$).

Cuadro 1. Análisis químico de CF-0 y CF-15 .
Table 1. Chemical analysis of CF-0 and CF-15.

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

a,b Literales diferentes por fila ($p \leq 0.05$). DIVMS = desaparición *in vitro* de la materia seca; PT = proteína total; MS = materia seca. \pm = error estándar de la media \diamond Different literals by row ($p \leq 0.05$). DIVDM = *in vitro* dry matter disappearance; TP = total protein; DM = dry matter. \pm standard error of the mean.

31.80 % en CF-0 a 74.24 y 60.84 % en CF-15, debido a la síntesis de ácidos orgánicos y consumo de carbohidratos solubles por el hongo durante la FES. La hemicelulosa disminuyó ($p \leq 0.05$) 5 % de CF-0 a CF-15, debido a la acción de las xilanasas durante el proceso de fermentación (Schmidt *et al.*, 2007). La DIVMS fue mayor ($p \leq 0.05$) en CF-15 que en CF-0 lo cual se puede atribuir a la acción de enzimas fibrolíticas y de lacasas producidas por el hongo (Márquez *et al.*, 2007).

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

En los ensilados la producción de NH_3 -N y ácidos orgánicos (acético y láctico) fue mayor ($p \leq 0.05$) al disminuir el porcentaje de inclusión de CF-15, lo que reflejó mayor contenido de carbohidratos solubles. En cambio al incrementar ($p \leq 0.05$) los días de ensilaje disminuyeron los carbohidratos solubles y aumentaron el NH_3 -N, ácido láctico y acético. La interacción porcentaje de inclusión y días de ensilaje fue significativa ($p \leq 0.05$), y el ensilaje de mejor calidad se obtuvo con pH 4.4, 3.2 % de carbohidratos solubles, 16.36 % de ácido láctico, 14.53 % de ácido acético y 6.15 % de NH_3 -N (Cuadro 2). Estos datos son congruentes con los modelos de ensilaje con consumo de carbohidratos solubles y producción de ácidos orgánicos (Cañeque y Sancha, 1998) y procesos químico-biológicos por acción de las enzimas de la planta y microorganismos lácticos, que disminuyen el pH y estabilizan el producto ensilado (Schmith *et al.*, 2007). Los resultados del presente estudio son similares a los de Alcántara *et al.* (1989) y Pedroso *et al.*

RESULTS AND DISCUSSION

The moisture content of whole SC decreased from 84.74 to 75.99 % after 48 h of airing, obtaining an optimum level for good solid state fermentation. Preston *et al.* (1976) and Pedroso *et al.* (2008) indicate that it is important to reduce the moisture to <80 % to optimize the conditions of SSF and microbial growth. The TP increased ($p \leq 0.05$) by more than 3 % from CF-0 to CF-15 (Table 1), which is attributed to the microbiotic protein and enzymes obtained from the SSF (Rajaratnam, 1979; Nair, 1989; Shashirekha *et al.*, 2005). The NDF and ADF increased ($p \leq 0.05$) from 50.18 and 31.80 % in CF-0 to 74.24 and 60.84 % in CF-15, due to the synthesis of organic acids and consumption of soluble carbohydrates by the fungus during the SSF. The hemicelluloses decreased ($p \leq 0.05$) 5 % of CF-0 to CF-15, due to the action of the xylanases during the process of fermentation (Schmidt *et al.*, 2007). The IVDMD was higher ($p \leq 0.05$) in CF-15 than in CF-0, which can be attributed to the action of the fibrolytic enzymes and laccases produced by the fungus (Márquez *et al.*, 2007).

The enzymatic activities in CF-15 were 2.08 ± 0.37 for xylanases, 5.25 ± 0.56 for laccases and 1.98 ± 0.13 UI g^{-1} DM for cellulases. The above differs from what was observed in sugar cane bagasse and *Pleurotus ostreatus* IE8 in SSF after 14 d: 27.41 for xylanases, 15.54 for laccases and 0.96 IU g^{-1} DM for cellulases (Márquez *et al.*, 2007), as well as 20 for xylanases, 0.06 for laccases and 0.15 IU g^{-1} DM for cellulases, in *P. ostreatus* IE8 and SC bagasse in SSF of 15 d (Membrillo *et al.*, 2011). The enzymatic activities in this investigation with whole SC and *P. sapidus* with 15 d of fermentation were lower for xylanases, laccases and higher for cellulases for the species of fungus; the substrate contained a lower amount of dry matter (35.36 %) and a pre-treatment of pasteurization or sterilization was not carried out. The latter is a common action for the optimum development of the mycelium of the fungus (Gusakov and Sinitsyn, 1992; Sánchez, 2004).

In the silages, the production of NH_3 -N and organic acids (acetic and lactic) was higher ($p \leq 0.05$) as the percentage of inclusion of CF-15 decreased, which reflected a higher content of soluble carbohydrates. On the other hand, when the days of silage increased ($p \leq 0.05$) the soluble carbohydrates

Cuadro 2. Variables fermentativas de los ensilados con CF-15.**Table 2. Fermentive variables of the silage with CF-15.**

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

a,b,c,d,e,f Literales diferentes por columna ($p \leq 0.05$). ND= no detectable; NH₃-N=nitrógeno amoniacal; ±=error estándar de la media
 ❖ Different literals by column ($p \leq 0.05$). ND = not detectable; NH₃-N = ammonia nitrogen; ± standard error of the mean.

al. (2008) con ensilados de CA y diferentes aditivos (NaOH y cultivos bacterianos).

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

decreased and the NH₃-N, lactic acid and acetic acid increased. The interaction percentage of inclusion and days of silage was significant ($p \leq 0.05$), and the silage of the best quality was obtained with pH 4.4, 3.2 % of soluble carbohydrates, 16.36 % of lactic acid, 14.53 % of acetic acid and 6.15 % of NH₃-N (Table 2). These data are congruent with the models of silage with consumption of soluble carbohydrates and production of organic acids (Cañeque and Sancha, 1998) and chemical-biological processes by action of the enzymes of the plant and lactic microorganisms, which reduce the pH and stabilize the silage product (Schmith *et al.*, 2007). The results of the present study are similar to those of Alcántara

Cuadro 3. Análisis químico de los ensilados con CF-15.**Table 3. Chemical analysis of the silage with CF-15.**

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

a,b,c,d,e,f,g Literales diferentes por columna ($p \leq 0.05$). PT = proteína total; ± = error estándar de la media. ❖ Different literals by column ($p \leq 0.05$). TP = total protein; ± standard error of the mean.

los carbohidratos solubles, y un incremento de ácidos orgánicos, principalmente ácido láctico, lo cual disminuye el pH y estabilizar el ensilado.

La DIVMS a las 72 h (Figura 1) fue 69.1 % en el tratamiento con 20 % de inclusión de CF-15 y 16 d de ensilaje. Este fue el mayor ($p \leq 0.05$) valor debido a que las enzimas fibrolíticas y lacasas de *P. sapidus* afectaron la pared celular (FDN y FDA) durante la fermentación en estado sólido y coadyuvó en el proceso de ensilaje (Cuadro 2). Estos resultados son similares a los reportados por Dean *et al.* (2005) al incorporar enzimas fibrolíticas (celulasas y hemicelulasas) en ensilajes de pasto bermuda (*Cynodon dactylon*) y a los observados por Magaña *et al.* (2009) quienes señalan que la DIVMS de caña de azúcar aumenta después de 30 d de ensilaje.

Durante la fermentación *in vitro* el mayor valor ($p \leq 0.05$) de V_{max} (Figura 2) se obtuvo en el día 16, con 10 y 20 % de CF-15 (203.92 y 207.09 mL 500 g⁻¹ MS), lo cual se puede atribuir a la acción de las enzimas producidas durante la FES en el producto CF-15, ácidos orgánicos liberados durante el ensilaje (bacterias lácticas) y flora microbiana ruminal que promovieron una mayor disponibilidad de carbohidratos estructurales y solubles de la pared celular (Cuadro 2) del material ensilado. Lo anterior indica que el ensilaje y la adición del fermentado mejoran la disponibilidad de los componentes nutritivos existiendo un efecto benéfico en los microorganismos

et al. (1989) and Pedroso *et al.* (2008) with silage of SC and different additives (NaOH and bacterial cultures).

By increasing ($p \leq 0.05$) the percentage of inclusion CF-15 the content of NDF and ADF decreased and the hemicelluloses increased (Table 3). The interaction percentage of inclusion and days of silage was significant ($p \leq 0.05$), obtaining a silage with 20 % of CF-15 at 16 d with higher NDF, ADF, hemicelluloses and protein. These results are similar to those of Pedroso *et al.* (2005), in which the variation of NDF and ADF during the silage period is related with the changes in soluble sugars. Similarly, in the treatment with 20 % of inclusion at 16 d of silage, there was a considerable decrease (Table 2) of the soluble carbohydrates, and increase of organic acids, principally lactic acid, which decreases the pH and stabilizes the silage.

The IVDMD at 72 h (Figure 1) was 69.1 % in the treatment with 20 % of inclusion of CF-15 and 16 d of silage. It was the highest value due to the fact that the fibrolytic enzymes and laccases of *P. sapidus* affected the cell wall (NDF and ADF) during solid state fermentation and contributed in the silage process (Table 2). These results are similar to those reported by Dean *et al.* (2005) by incorporating fibrolytic enzymes (cellulases and hemicellulases) in Bermuda grass (*Cynodon dactylon*) silage and to those observed by Magaña *et al.* (2009), who indicate that

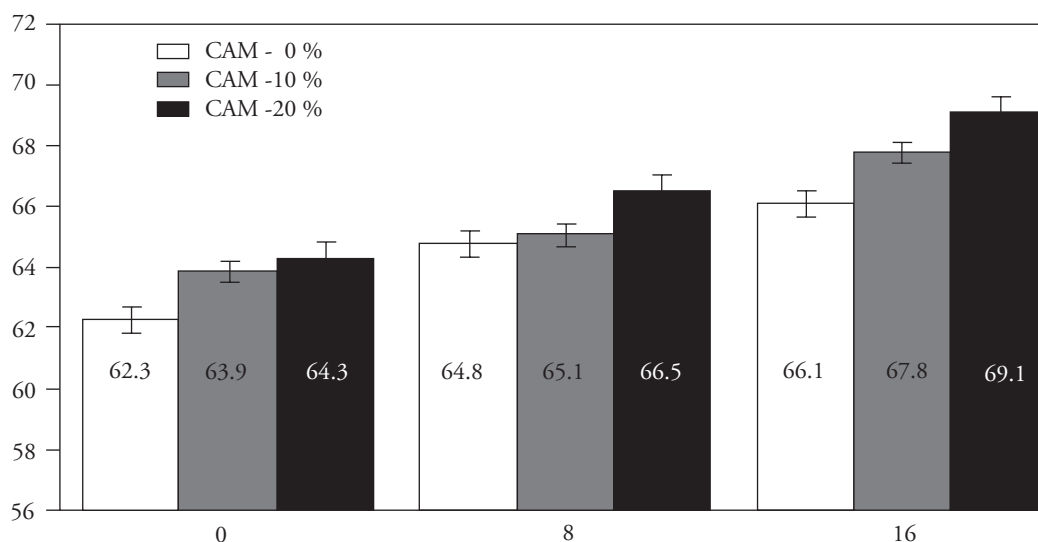


Figura 1. Digestibilidad de la materia seca de ensilados con CF-15 a 72 h de fermentación *in vitro*. \perp = error estándar de la media.
Figure 1. Digestibility of the dry matter with CF-15 at 72 h of *in vitro* fermentation. \perp standard error of the mean.

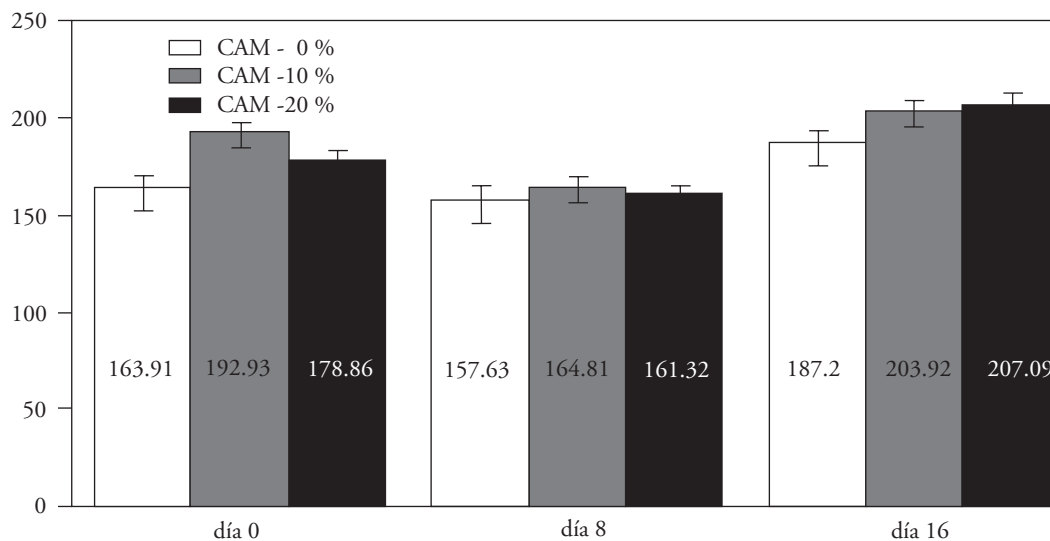


Figura 2. Producción máxima de gas *in vitro* evaluada a 72 h, de ensilados con CF-15. \pm = error estándar de la media.
Figure 2. Maximum *in vitro* gas production evaluated at 72 h, from silage with CF-15. \pm standard error of the mean.

ruminales cuando son incorporados en la alimentación de rumiantes (Wallace *et al.*, 2001).

En general las características organolépticas (color verde claro y aroma agradable de fruta madura) de todos los ensilados con CF-15 correspondieron a lo descrito por Cañeque y Sancha, (1998) como ensilados de forrajes de buena calidad.

CONCLUSIONES

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

AGRADECIMIENTOS

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

the IVDMD of sugar cane increases after 30 d of silage.

During *in vitro* fermentation, the highest value ($p \leq 0.05$) of V_{max} (Figure 2) was obtained on day 16, with 10 and 20 % of CF-15 (203.92 and 207.09 mL 500 g⁻¹ DM), which can be attributed to the action of the enzymes produced during the SSF in the product CF-15, organic acids released during silage (lactic bacteria) and rumen microbial flora that promoted a higher availability of structural and soluble carbohydrates of the cell wall (Table 2) of the ensiled material. The above indicates that the silage and the addition of the solid fermented material improve the availability of the nutritive components, with a beneficial effect in the rumen microorganisms when they are incorporated in the feed of ruminants (Wallace *et al.*, 2001).

In general the organoleptic characteristics (light green color and pleasant aroma of ripe fruit) of all the silage with CF-15 corresponded to what was described by Cañeque and Sancha (1998) as silage of good quality forage.

CONCLUSIONS

Solid state fermentation of whole sugar cane with *Pleurotus sapidus* generates a product with fibrolytic enzymatic activity that promotes the fractioning of phenolic compounds, confers greater digestibility of the fiber and thus higher availability for the rumen

LITERATURA CITADA

- Alcántara E., A. Aguilera, R. Elliott, and A. Shimada. 1989. Fermentation and utilization by lambs of sugarcane harvested fresh and ensiled with and without NaOH₄. Ruminant kinetics. *Anim. Feed Sci. Technol.* 23: 323-331.
- AOAC. 1995. Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th edition. Cunniff, P. Arlington Virginia. USA. 1298 p.
- Ayala M., M., S. S. González M., J. M. Pinos R., C. Vázquez P., M. Meneses M., O. Loera C., and G. D. Mendoza M. 2011. Fibrolytic potential of spent compost of the mushroom *Agaricus bisporus* to degrade forages for ruminants. *Afr. J. Microbiol. Res.* 5 (3), 241-249.
- Bourbonnais R., M. G. Paice, B. Freiermuth, E. Bodie, and S. Borneman. 1997. Reactivities of various mediators and lacases with kraft pulp and lignin model compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(12):4627-4632.
- Bradford M., M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-252.
- Cano A., L., E. M. Aranda I., G. D. Mendoza M., J. Pérez P., J. A. Ramos J. 2003. Comportamiento de toretes en pastos tropicales suplementados con caña de azúcar y enzimas fibrolíticas. *Téc. Pec. Méx.* 41 (2): 153-164.
- Cañeque M. V., y J. L. Sancha S. 1998. Ensilado de Forrajes y su Empleo en la Alimentación de Rumiantes. Ediciones Mundi-Prensa. España. pp:13-20.
- Cuervo L., J. L. Folch, y R. E. Quiroz. 2009. Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol. *Bio Tecnología* 13(3):11-25.
- Dean D., B., A. T. Adesogan, N. Krueger, and R. C. Littell. 2005. Effect of fibrolytic enzymes on the fermentation characteristics, aerobic stability, and digestibility of bermuda grass silage. *J. Dairy Sci.* 88: 994-1003.
- Dubois M., K., A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28(3):350-356.
- Erwin E., S., G. J. Marco, and E. M. Emery. 1961. Volatile fatty acid analysis of blood and rumen fluid by gas chromatography. *J. Dairy Sci.* 44(9):1768-1771.
- Fahey G., C., L. D. Bourquin, E.C. Titgemeyer, and D. G. Atwell. 1993. Postharvest treatment of fibrous feed stuffs to improve their nutritive value. in forage cell wall structure and digestibility. Jung, H. G., D. R. Buxton, R. D. Hatfield, and J. Ralph. (eds). *Proc. Symp. Madison, WI*. pp: 715-766.
- Gómez V., A., J. M. Pinos R., J. C. García L., E. de la Cruz L., C. Luna P., R. Sánchez H. 2011. Nutritional value of sugarcane silage enriched with corn grain, urea, and minerals as feed supplement on growth performance of beef steers grazing stargrass. *Trop. Anim. Health Prod.* 43: 215-220.
- Gusakov A., V., and A. Sinityn P. 1992. A theoretical analysis of cellulase product inhibition: Effect of cellulase binding constant, enzyme/substrate ratio, and β -glucosidase activity on the inhibition pattern. *Biotechnol. and Bioeng.* 40:663-671.
- Jalč D., P. Siroka, J. Feješ, and Z. Čerenšňáková. 1999. Effect of three strains of *Pleurotus tuber-regium* (Fr). on chemical composition and rumen fermentation of wheat straw. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 45(6):277-282.
- microorganisms. By including 20 % of CF-15 in silage of 16 d, there was a reduction in the loss of protein and an increase in the production of lactic acid, which stabilized anaerobic fermentation and conserves the product during the silage process. Therefore, the ensilage of products where there are combined biotechnological processes can be an alternative for improving the nutritional quality of the final product that will be used in the feeding of ruminants.

—End of the English version—

-----*-----

- Kuehl R., O. 2001. Diseño de Experimentos. Principios Estadísticos para el Diseño y Análisis de Investigaciones. 2ª. Ed. Thomson Learning. México. 666 p.
- Loera C., O., and J. Córdova. 2003. Improvement of xylanase production by a parasexual cross between *Aspergillus niger* strains. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 46:177-181.
- Magaña R., J. Aguirre, A. Aguirre, A. Gómez, S. Martínez, C. Lemus, R. Ulloa, and J. Ly. 2009. Entire sugar cane or sugar cane residues for feeding sheep. Performance traits of hairless sheep. *Liv. Res. Rural Develop.* Vol. 21, Article # 24. <http://www.lrrd.org/lrrd21/2/maga21024>. (Accessed: July 2011).
- Márquez A., A., T., G. D. Mendoza M., S. S. González M., S. E. Buntinx D., y O. Loera C. 2007. Actividad fibrolítica de enzimas producidas por *Trametes sp. EUm1*, *Pleurotus ostreatus IE8* y *Aspergillus niger AD96.4* en fermentación sólida. *Interciencia* 32 (11):780-785.
- McAllister T., A., S. J. Oosting, J. D. Popp, Z. Mir, L. J. Yanke, A.N. Hristov, R. J. Treacher, and K. J. Cheng. 1999. Effect of exogenous enzymes on digestibility of barley silage and growth performance of feedlot cattle. *Can. J. Anim. Sci.* 79:353-360.
- McCullough, H. 1967. The determination of ammonia in whole blood by direct colorimetric method. *Clin. Chem.* 17:297-304.
- Membrillo, I., C. Sánchez, M. Meneses, E. Favela, and O. Loera. 2011. Particle geometry affects differentially substrate composition and enzyme profiles by *Pleurotus ostreatus* growing on sugar cane bagasse. *Bioresource Technol.* 102:1581-1586.
- Menke K., H., L. Raab, A. Salewski, H. Stengass, D. Fritz, and W. Scheneider. 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. *J. Agric. Sci.* 93: 217-222.
- Miller G., L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31: 426-48.
- Nair N., G. 1989. Tropical mushrooms biological nature and cultivation methods. *In: Chang, S. T., and T. H. Quimio (eds). Substrates for Mushroom Production.* The Chinese University of Hong Kong. Polydesign Printing Co., Ltd. Hong Kong. pp: 180-192.
- Pedroso A., D., L. G. Nussio, S. D. Piazani, L. D. Reboucas S.,

- M. S. Igarasi, R. M. Coelho, I. H. Packer, J. Horii, and L. H. Gomes. 2005. Fermentation and epiphytic microflora dynamics in sugar cane silage. *Sci. Agric.* 62(5):427-432.
- Pedroso A., D., L. G. Nussio, D. R. Santana L., S. F. Paziani, J. L. Ribeiro, L. J. Mari, M. Zopollatto, P. Schmidt, W. R. Soares M., and J. Horii. 2008. Fermentation, losses, and aerobic stability of sugarcane silages treated with chemical or bacterial additives. *Sci. Agric.* 65(6):589-594.
- Preston T., R., C. Hinojosa, y L. Martin. 1976. Ensilaje de la caña de azúcar con amoníaco, miel y ácidos minerales. *Prod. Anim. Trop.* 1:124-131.
- Rajaratnam S., D. B. Wankhede, and M. V. Patwardhan. 1979. Some chemical and biochemical changes in straw constituents during the growth of *Pleurotus flabellatus* (Berk & Br.) Sacc. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 8:125-134.
- Sánchez C. 2004. Modern aspects of mushroom culture technology. *Appl. Microbiol.* 64:756-762.
- SAS. SAS/STAT. 2000. Guide for personal computer. Vers. 8. SAS Institute Cary, NC. USA.
- Schofield P., and A. N. Pell. 1995. Measurement and kinetic analysis of the neutral detergent-soluble carbohydrate fraction of legumes y grasses. *J. Anim. Sci.* 73:3455-3463.
- Shashirekha M., N., S. Rajaratnam, and Z. Bano. 2005. Effects of supplementing rice Straw growth substrate with cotton seeds on the analytical characteristics of the mushroom, *Pleurotus florida* (Block y Tsao). *Food Chem.* 92:255-259.
- Schmidt P., L. J. Mari., L. G. Nussio, A. D. Pedroso F., S.de F. Paziani, e F. S. Wechsler. 2007. Aditivos químicos e biológicos na ensilagem de cana-de-açúcar. Composição química das silagens, ingestão, digestibilidade e comportamento ingestivo. *Rev. Bras. Zootec.* 36(5):1666-1675.
- Tejada, I. 1985. Manual de Laboratorio para Análisis de Ingredientes Utilizados en la Alimentación Animal. Patronato de Apoyo a la Investigación y Experimentación Pecuaria en México, A.C. México. D.F. México. 387 p.
- Theodorou M., K., B. A. Williams, M. S. Dhanoa, A. B. McAllan, and J. France. 1994 A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Tech.* 48: 185-197.
- Van Soest, P. J., J. B. Robertson, and B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy. Sci.*, 74: 3583-3597.
- Wallace, R. J., S. J. Wallace, N. Mckain, V. L. Nsereko, and G. F. Hartnell. 2001. Influence of supplementary fibrolytic enzymes on the fermentation of corn and grass by mixed ruminal microorganisms *in vitro*. *J. Anim. Sci.* 79: 1905-1916.