

DELIGNIFICACIÓN SELECTIVA DEL PASTO *Pennisetum purpureum* x *Pennisetum typhoides* USANDO BASIDIOMICETOS LIGNINOLÍTICOS

SELECTIVE DELIGNIFICATION OF THE *Pennisetum purpureum* x *Pennisetum typhoides*
GRASS USING LIGNINOLYTIC BASIDIOMYCETES

Freimar SEGURA S.¹, Rosario ECHEVERRI F., Amanda I. MEJÍA G.^{1*}

Recibido: Diciembre 13 de 2007 Aceptado: Abril 22 de 2008

RESUMEN

Muestras de pasto *Pennisetum purpureum* x *Pennisetum typhoides* de 120 días de corte se someten durante siete semanas a fermentación selectiva en estado sólido (FES) con cepas de *Ganoderma ssp* y *Lentinus ssp*. Se realiza la caracterización de la delignificación por Infrarrojo con Transformada de Fourier (IR-TF) midiendo las áreas de las principales bandas características. Mediante esta técnica se establece que en las muestras tratadas con *Ganoderma spp* se obtiene una pérdida del 70% de los compuestos aromáticos con relación a los alifáticos. En las semanas cero y séptima se establecieron valores de lignina en detergente ácido (LDA) de 55,9% y 10,7%, respectivamente. En este mismo período los contenidos de materia seca y celulosa variaron del 73,3% al 92,9% y del 3,1% al 51,7% respectivamente. Estos resultados confirman una degradación selectiva de la lignina en las muestras tratadas con *Ganoderma spp* y medios suplementados con manganeso. Las pruebas de degradabilidad *in situ*, utilizando la técnica de la bolsa de nylon y de digestibilidad *in vitro* de la materia seca basada en técnicas enzimáticas y gravimétricas, no mostraron mejoramiento de la digestibilidad de la materia seca del pasto como consecuencia de la fermentación con las dos cepas de hongos basidiomicetos, corroborando lo indicado por otros autores que afirman que los hongos pueden ser tóxicos para la microflora del rumen y, por lo tanto, pueden afectar la digestibilidad de la materia seca.

Palabras clave: basidiomicetos, fermentación en estado sólido, delignificación selectiva, degradabilidad *in situ*, digestibilidad *in vitro*, pasto *Pennisetum purpureum* x *Pennisetum typhoides*.

ABSTRACT

Samples of *Pennisetum purpureum* x *Pennisetum typhoides* grass of 120 days are put under selective fermentation in solid state with two strains of basidiomycetes fungi *Ganoderma ssp* and *Lentinus ssp*, during seven weeks. The delignification characterization is made by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) measuring the areas of the main characteristic bands. In the samples treated with the *Ganoderma ssp* strain, a loss of 70% of aromatic compounds in relation to the aliphatics is obtained (by FTIR); also are obtained in the zero and seventh weeks, the acid-detergent lignin (ADL) (55,9% and 10,7%,

1 Grupo Biodegradación y Bioconversión de Polímeros -BIOPOLIMER- Universidad de Antioquia. Facultad de Química Farmacéutica. Medellín, Colombia, AA 1226

* Autor a quien se debe dirigir la correspondencia: amejia@quimbaya.udea.edu.co. Tel: 57-4-2635555

respectively) as well as the contents of dry matter and cellulose that vary from the 73,3% to the 92,9% and from the 3,1% to the 51,7% respectively between the zero and seventh weeks, results that confirm a selective degradation of the lignin. The digestibility tests *in vitro*, that are in accordance with the *in situ* test, do not evidence an improvement in the grass digestibility by the ruminants. As this is degraded by the *Ganoderma ssp* strain is not obtained an increase of the digestibility of the dry matter, corroborating the ideas explained for other authors who affirm that the ingestion of fungi can be toxic for the rumen's microflora, and therefore to be toxic for the animals also.

Keywords: Basidiomycetes, Selective delignification, *In vitro* digestibility, Solid state fermentation, Lignin, *Pennisetum purpureum* x *Pennisetum typhoides* Grass, FTIR analysis of *Pennisetum purpureum* x *Pennisetum typhoides* Grass.

INTRODUCCIÓN

En Colombia el inventario ganadero bovino debería estar aproximándose a los 26 millones de cabezas, pero en los últimos años, por la ausencia de un sistema estadístico confiable y la situación de violencia de vastas regiones (Andina, Caribe y Orinocense), donde la ganadería es la principal forma de ocupación territorial puesto que en ellas se encuentra el 98% de la ganadería, se ha especulado mucho (1). Más de la mitad del hato ganadero de Colombia (61%) se concentra en explotaciones que utilizan el pastoreo extensivo tradicional basado en praderas naturales (48%).

Aunque las especies de pastos de clima frío son superiores a las de clima cálido, en Colombia se considera que la mayoría de ellos son de inferior calidad, siendo posiblemente el contenido de energía digestible el primer factor limitante en épocas de sequía (2). Los pastos pasan rápidamente de tener un contenido medio a alto de fibra bruta lo que disminuye su digestibilidad (3). Cuando los forrajes acumulan exceso de lignina, sílice y sustancias pépticas, la digestión de la fibra se inhibe y el aprovechamiento del pasto se restringe (4). Además, se sabe que, en los pastos tropicales, con la edad disminuye el contenido de proteína cruda y aumenta el de fibra bruta y, en consecuencia, su valor nutritivo (5).

Se han utilizado algunas alternativas para tratar de mejorar el valor nutricional de los forrajes de mala calidad. Mediante los métodos físicos (molien-da o picado) se puede aumentar el área superficial del forraje, pero esto no parece ser que tenga efecto significativo. Para mejorar el bajo valor nutricional de los forrajes debido a la baja disponibilidad de carbohidratos, se ha recurrido a la suplementación con alimentos ricos en carbohidratos como la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), pero esto aumenta los costos y hoy está siendo más utilizada para

obtener biocombustible que en la alimentación animal. Por métodos biológicos se han desarrollado varias alternativas. El ensilaje es uno de ellos. Es el más conocido de los métodos de conservación. Se basa en el principio de la fermentación anaerobia. Según algunos autores, a causa de los procesos fermentativos acontecidos durante el ensilaje, el valor nutritivo del material vegetativo fresco puede sufrir modificaciones (2, 3, 4). La limitación consiste en que este proceso no es capaz de afectar a la lignina y, de esta manera, no parece que se mejore la digestibilidad de las gramíneas que presentan un contenido relativamente alto de lignina.

El pasto *P. purpureum* x *P. typhoides*, que se ha utilizado en algunas de las explotaciones ganaderas Colombianas, es una gramínea de corte, nativa de África del sur, crece desde el nivel del mar hasta los 2200 m.s.n.m, en zonas con temperaturas ambientales comprendidas entre los 18 y 30°C, es tolerante a la sequía y muestra gran capacidad de rebrote cuando se inician las lluvias (6). El uso principal de esta gramínea ha sido en corte, el cual se realiza entre 60 y 70 días, pues a mayor edad aumentan sus limitaciones nutricionales debido a la acumulación de lignina, sílice y sustancias pépticas (5,7). Se conoce que en este pasto se presenta alta concentración de hemicelulosa (7,8), 12% de proteína cruda y 62% de digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS) a los 60 días de rebrote.

Constituiría un aporte a la productividad ganadera del país la identificación de tecnologías seguras y eficientes que conduzcan a mejorar la disponibilidad nutricional y energética del pasto *P. purpureum* x *P. typhoides*; el tratamiento con microorganismos es una de estas alternativas que se podrían utilizar (9, 10, 11, 12) con el fin de hacer disponibles los carbohidratos (13). Dentro de esta propuesta, la biodegradación de la lignina con hongos de la podredumbre blanca de la madera es digna de consideración. Estos hongos son un gru-

po de microorganismos de diferentes especies que atacan la madera mediante la degradación simultánea de la lignina, la hemicelulosa y la celulosa, o la degradación selectiva de la lignina y la hemicelulosa (14, 15, 16, 17, 18). El potencial de degradación de la lignina se debe a su capacidad de producir enzimas extracelulares oxidativas como son la lacasa, la ligninoperoxidasa (LiP) y la manganosoperoxidasa (MnP) (15, 16, 17, 18, 19).

Diferentes autores han utilizado hongos para mejorar el valor nutricional de diferentes pastos y forrajes (9, 13, 20); los trabajos más representativos son aquellos en los que se ha logrado una delignificación selectiva del sustrato, degradando la lignina, dejando los carbohidratos disponibles (21, 22, 23, 24) y, además, se resalta la importancia de incrementar la digestibilidad de los residuos ligninocelulósicos, porque se liberan carbohidratos que pueden ser fermentados a ácidos orgánicos en un ambiente anaeróbico como es el rumen. Xiaoyu y Cloete (25), por ejemplo, realizaron un pretratamiento biológico con dos hongos basidiomicetos y confirmaron la degradación de la lignina por técnicas como IR-TF y medidas de absorción de celulosa.

Desde hace varios años el grupo Biopolimer (Biodegradación y Bioconversión de Polímeros), de la Universidad de Antioquia, viene trabajando con varias cepas de hongos basidiomicetos autóctonos recolectados en bosques tropicales colombianos de los que se ha confirmado el potencial ligninolítico. En la literatura consultada al respecto no se encuentra que se haya trabajado en la evaluación de la capacidad de estos hongos para aumentar el valor nutricional de algunos forrajes y residuos agroindustriales.

En este trabajo se planteó la hipótesis de que las cepas de *Ganoderma ssp* y *Lentinus ssp*, dos hongos basidiomicetos, al actuar sobre la gramínea *P. purpureum* x *P. typhoides* en un sistema FES (26), son capaces de degradar la lignina de manera selectiva, identificando esta biodegradación por la técnica de IR-TF y el método de van Soest y Wine (30), y modificar la digestibilidad de la materia seca evaluada mediante técnicas *in vivo* e *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación del sustrato

Para el estudio se utilizaron muestras del pasto *P. purpureum* x *P. typhoides* de 120 días de edad, procedentes del Centro Agropecuario La Salada,

perteneciente al Servicio Nacional de Aprendizaje (SENA), ubicado en el Municipio de Caldas, Departamento de Antioquia. Durante una semana las muestras se secaron hasta peso constante en estufas de ventilación forzada entre 60 y 70°C; posteriormente se molieron, se pasaron por tamices hasta alcanzar un tamaño de partícula entre 1 y 3 mm y se esterilizaron aplicando calor húmedo durante 15 minutos a 121°C y 15 lb de presión.

Selección de las cepas de hongos

De una colección de hongos de la podredumbre de la madera, recolectados por el grupo de investigación en un bosque mixto colombiano, se utilizaron las cepas *Ganoderma ssp* y *Lentinus ssp* debido a que con ellas se han obtenido resultados importantes por su potencial ligninolítico.

Montaje del SISTEMA DE FES UNO –FES uno-

Se colocaron 15 g de la muestra del pasto seco, molido y estéril, en recipientes transparentes de polipropileno de 500 ml de capacidad a los que se les agregaron 135 ml de una solución amortiguadora de fosfato de sodio 0,1 M (90% de humedad), a pH de 5 ó 7 y se inocularon con las cepas de basidiomicetos. Otro grupo de muestras de pasto se colocaron en las mismas condiciones pero sin la inoculación del hongo (tratamiento control). Todas las muestras se dejaron en un ambiente oscuro a 23°C durante 7 semanas. El estudio se planeó dentro de un esquema de diseño factorial, siendo las cepas de hongo y el pH del medio los factores evaluados.

Durante el período en estudio se evaluaron el crecimiento cualitativo, la colonización del sustrato por el micelio, la actividad enzimática de la ligninoperoxidasa (LiP), manganosoperoxidasa (MnP) y la lacasa.

El crecimiento cualitativo se determina midiendo qué tanto coloniza el hongo al sustrato, lo cual se hace evidente por la formación de micelio blanco, el cual se mide, en centímetros, con una regla, a las 4 y a las 7 semanas.

Para evaluar la actividad enzimática se tomaron muestras a las 4 y a las 7 semanas de iniciado el proceso de fermentación. La actividad de la LiP se determinó con base en lo descrito por Kirk y Farrel (27). Una unidad (U) de actividad de la LiP se definió como la cantidad de la enzima requerida para oxidar una micromol de alcohol veratrílico en un minuto. La actividad de la MnP se determinó de acuerdo con lo descrito por Paszcynski *et al* (28).

Una unidad de actividad de la MnP se definió como la cantidad de la enzima requerida para oxidar una micromol de Mn^{2+} a Mn^{3+} en un minuto. La actividad de la lacasa se determinó siguiendo lo descrito por Bourbonnais y Pace (29). Una unidad de lacasa se definió como la cantidad de enzima requerida para oxidar una micromol de ABTS en un minuto. Las determinaciones, tanto de las muestras del tratamiento con las cepas de hongos como las del control, se realizaron por triplicado, en un espectrofotómetro Varian Cary 50 Bio. Los coeficientes de absorptividad molar utilizados fueron 9300, 18300 y 36000 $M^{-1}.cm^{-1}$ para la LiP, MnP y lacasa.

Montaje del SISTEMA DE FES -FES dos-

A partir de los resultados del montaje del sistema FES uno- se realizó otro ensayo en el que se evaluó la suplementación o no con 40 ppm Mn. El procedimiento del montaje se realizó en forma semejante al del ensayo -FES uno-. A las 4 y 7 semanas se tomaron de los tratamientos control, y con incubación, se secaron en estufa de aire forzado a 60°C durante cuatro días, se molieron y pasaron por malla hasta alcanzar un tamaño de partícula entre 1 y 3 mm.

CARACTERIZACIONES QUÍMICAS

A las muestras se les determinó materia seca en una estufa marca Binder de aire con circulación forzada, fibra en detergente neutro (FDN), fibra en detergente ácido (FDA) y lignina en detergente ácido (LDA) en una unidad extractora de fibra FIWE de Velp Scientifica, en el laboratorio de Análisis de Alimentos y Bromatología de la Facultad de Química Farmacéutica de la Universidad de Antioquia. El contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina se estimó de acuerdo con los delineamientos señalados por Van Soest y Wine (30).

Las mismas muestras se sometieron a un análisis de su espectro IR-TF a longitudes de onda entre 4000 a 450 cm^{-1} utilizando pastillas de KBr (2 mg de muestra en 98 mg de KBr); para tal efecto se utilizó un espectrofotómetro Perkin Elmer Spectrum One. Los espectros se obtuvieron acumulando 100 interferogramas a una resolución de 4 cm^{-1} .

En el IR-TF las áreas de los picos característicos para lignina y carbohidratos, tanto en los controles como en las muestras, se calcularon como la relación del área del pico a 2920 cm^{-1} (lo que corresponde a estructuras alifáticas como carbo-

hidratos) dividido por el área del pico a 1515 cm^{-1} (característica para las vibraciones del esqueleto del anillo aromático en materiales macromoleculares bastante heterogéneos como la lignina) (31). Posteriormente se estableció la relación con los valores de los controles aplicando la siguiente formulación:

$$\% = \frac{\left(\frac{\text{área 2920 muestra}}{\text{área 1515 muestra}} \right) - \left(\frac{\text{área 2920 controles}}{\text{área 1515 controles}} \right)}{\left(\frac{\text{área 2920 controles}}{\text{área 1515 controles}} \right)} \times 100$$

Tanto las determinaciones químicas como los análisis por IR-TF se hicieron por triplicado.

EVALUACIÓN DE LA DIGESTIBILIDAD

Preparación de la muestra

Entre la segunda y la séptima semana del FES dos se obtuvieron muestras del pasto con y sin el hongo, se pasaron por un tamiz de tamaño de partícula de 0,5 y 1,5 mm para las pruebas de digestibilidad *in vitro* de la materia seca y de degradabilidad *in situ* de la materia seca.

Determinación de la degradabilidad *in situ* de la materia seca

Esta parte del estudio se realizó en el Centro de Producción Paysandú, de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, siguiendo la metodología descrita por Ørskov y Shand (32). Se utilizaron vacas Holstein con cánula ruminal a las que se les colocaron tres bolsas de nailon de 5 x 10 cm que contenían 3 g de muestra tanto de los tratamientos con hongo como sin él. Las bolsas con las muestras molidas se secaron en estufa de ventilación forzada a 60° durante 24 horas, se permitió que adquirieran la temperatura ambiental en el interior de un desecador, se pesaron y sumergieron tres veces en agua de grifo a temperatura ambiente. Posteriormente se sometieron a incubación ruminal durante 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48 y 72 horas. Extraídas las bolsas del rumen, se lavaron con agua de grifo hasta que salieran limpias, se secaron a 60°C hasta obtener peso constante y se pesaron para estimar la materia seca residual. En forma separada se procedió a la estimación de la desaparición física del material mediante el sumergimiento de las bolsas con muestras en agua corriente durante cinco minutos y su posterior sometimiento al mismo tratamiento descrito para las muestras de los otros tiempos.

Los valores obtenidos se analizaron mediante los procedimientos no lineales del paquete estadístico SAS (1998) utilizando el modelo de Mitcherlich I para obtener las fracciones a y b de la materia seca, la constante de la cinética de degradación de la fracción b (Kd) y el punto de inflexión (i). La degradabilidad de la materia seca se calculó de acuerdo con el modelo sugerido por Mc Donald, Henderson y Heron (33):

$$Y = a + b(1 - e^{-ct})$$

donde:

Y es la tasa de degradación de la MS en el tiempo t

a, b y c son constantes.

Determinación de la digestibilidad *in vitro* de la materia seca

Esta prueba se realizó en el Laboratorio de Bromatología de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Se utilizó la técnica basada en el empleo de una celulosa con diferentes soluciones amortiguadoras de pH y pepsina al 0,2% en HCl. En tubos de digestibilidad se pesaron 500 mg de la muestra, se les agregaron 20 ml de una solución de pepsina en HCl 0,1N a 40°C, se incubaron durante 24 horas a 40°C con agitación y se filtró el contenido de los tubos. Posteriormente se adicionaron 20 ml de una solución que contenía celulosa en solución amortiguadora de citrato-fosfato a pH de 4,6 y se procedió a incubar durante 48 horas a 40°C en baño María con agitación cada 12 horas. Después de la incubación se filtró el contenido de los tubos de digestión, el residuo se secó en estufa a 105°C durante 12 horas y se pesó. El porcentaje de digestibilidad de la materia seca se calculó utilizando la siguiente expresión:

$$\% \text{ DMS} = 0,5 (P) / 0,5 * 100 * (1 / \text{CMS})$$

donde:

P es el peso del residuo

CMS es la corrección por MS

Los resultados del estudio se analizaron mediante un modelo de regresión lineal simple de primer orden utilizando el programa Statgraphics plus 5.0.

RESULTADOS

Montaje del SISTEMA DE FES uno -FES uno-

Se obtiene que a pH 7 la longitud del sustrato colonizada por el hongo fue mayor con *Ganoderma*

que con *Lentinus*. La longitud de crecimiento del sustrato con el hongo *Ganoderma* presentó un crecimiento de 1 cm \pm 0.5 ($p \leq 0,5$) en las tres réplicas y no varió entre las semanas 4 y 7, en los montajes a pH 7. Con la cepa *Lentinus* se obtiene una longitud de crecimiento menor bajo estas condiciones. No se observó crecimiento de *Ganoderma* ni de *Lentinus* a pH 5.

Con la cepa *Ganoderma* se presentan mayores actividades enzimáticas para la MnP y lacasa que con la cepa *Lentinus ssp*. Los datos no se presentan porque son similares a los que aparecen en la figura 1 para el Sistema de FES dos. No se encontró actividad enzimática de la LiP con ninguno de los dos hongos.

U ($\mu\text{mol/g} \cdot \text{min}$)

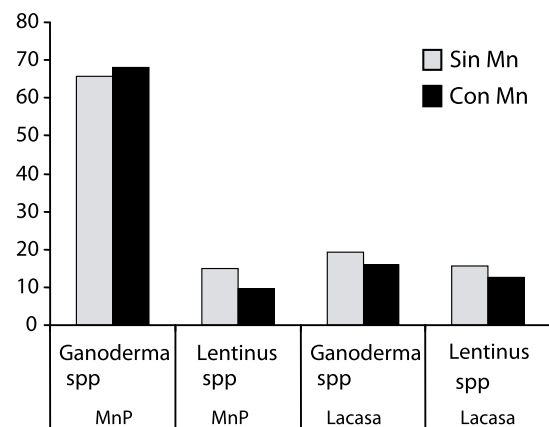


Figura 1: Actividades enzimáticas de MnP y lacasa a las siete semanas de muestras de pasto *P. purpureum* x *P. typhoides* fermentadas con *Ganoderma ssp* o *Lentinus ssp* con o sin suplementación con Mn. (Promedio de tres determinaciones, con un nivel de confianza del 95+5%)

Los resultados anteriores permiten confirmar lo que reporta la literatura sobre la no producción de LiP por estas familias de hongos, además la *Ganoderma ssp* posee mayor capacidad de colonización del sustrato y el micelio se ve mucho más fuerte y libera mayor cantidad de MnP y de lacasa.

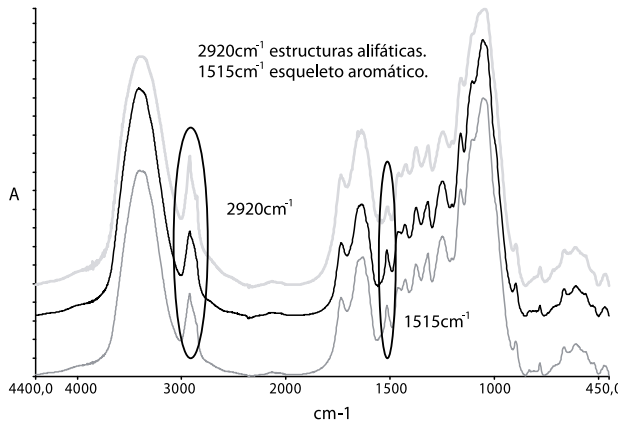
Montaje del SISTEMA DE FERMENTACIÓN SÓLIDO dos -SFS dos-

Al igual que en el montaje del ensayo -FES uno- se observó rápidamente la colonización del sustrato por *Ganoderma ssp*. Se obtuvo una longitud de crecimiento similar al sistema -FES uno- en los medios suplementados con 40 ppm de Mn a pH 7. La longitud de crecimiento del micelio entre la cuarta y la séptima semanas tampoco varió.

La actividad de la MnP obtenida a las semanas 4 y 7 es de 65 U/L con la cepa *Ganoderma*, muy semejante a la actividad de 68 U/L que produce la misma cepa en los medios sin Mn. Por eso, solamente se presentan los resultados a la 7ª semana de tratamiento (ver figura 1). Igual ocurre con la actividad de la lacasa, que dio una actividad de 20 U/L con la cepa *Ganoderma* a las semanas 4 y 7 semana, en medios suplementados con Mn. En los medios sin Mn se produce una actividad de 18 U/L de lacasa tanto en la 4ª como en la 7ª semana. (ver figura 1).

Resultados de los análisis por IR-TF.

Los cambios en el espectro IR-TF se interpretan en términos del incremento en los valores de la proporción a 2920/1515cm⁻¹ la cual indica una remoción de estructuras aromáticas y un enriquecimiento selectivo en estructuras alifáticas como carbohidratos (31). De acuerdo con lo señalado en la figura 2, en los diferentes espectros se encuentran variaciones en la banda característica para vibraciones del esqueleto aromático en lignina a 1515cm⁻¹.



La banda inferior corresponde al espectro de la muestra del pasto con *Lentinus ssp.*, la de la mitad al pasto sin contacto con el hongo y la superior al pasto con *Ganoderma ssp.*

Figura 2. Espectros normalizados IR-TF de muestras de pasto *P. purpureum* x *P. typhoides* a las siete semanas de fermentación de medios con Mn.

Los resultados del cuadro 1 indican que a las siete semanas, el proceso de fermentación con *Ganoderma ssp* en medios con Mn presentó mayor proporción de los grupos alquil C-H que estructuras con esqueleto aromático (lignina); es así como las bandas características a 1734, 1375, 1161 y 898 correspondientes a C=O de xilanos conjugados, deformaciones de C-H en celulosa y hemicelulosa; vibraciones de C-O-C en celulosa y hemicelulosa y deformaciones C-H en xilanos respectivamente, presentan mayor proporción relativa con relación a la estructura de la banda de la lignina a 1515, con valores de 76, 56, 26 y 30, los cuales fueron mucho mas bajos para los otros tratamientos. Esto significa que este sistema fue selectivo para degradar las estructuras aromáticas dejando las celulósicas y hemicelulósicas y, por tanto, se puede señalar que hubo delignificación selectiva. La proporción de lignina con respecto a estructuras alifáticas y carbohidratos se redujo en 70%. En el mismo período se pudo establecer que no ocurrió delignificación selectiva cuando se utilizó *Lentinus ssp.*

Resultados de la caracterización química del pasto *P. purpureum* x *P. typhoides* sometido a los diferentes tratamientos

Los resultados para las muestras en el estudio-FES dos- se registran en la tabla 2 El porcentaje de materia seca pasó del 70,6% en el pasto que no se sometió a fermentación a más del 91% en las muestras tratadas con las dos cepas de hongos con y sin suplementación con Mn.

Las muestras del pasto *P. purpureum* x *P. typhoides* sin las cepas del hongo presentaron un contenido alto de FDN (71,4%), el cual se localizó entre 74,9 y 78,9% cuando el mismo pasto se fermentó con las cepas de hongos. Parece que esta tendencia fue semejante para el caso de la FDA, si se tiene en cuenta que, mientras en el tratamiento control el valor fue de 44,8% en los tratamientos con el

Tabla 1. Porcentaje de lignina degradada con respecto a los promedios de las muestras tratamiento control teniendo en cuenta los promedios de las diferentes relaciones de áreas de picos en IR-TF.

<i>Ganoderma ssp</i> a las 7semanas					
Relación de longitudes de onda	2920/1515	1734/1515	1375/1515	1161/1515	898/1515
Con Mn	70	76	56	26	30
Sin Mn	35	35	12	11	14
<i>Lentinus ssp</i> a las 7 semanas					
Con Mn	-2	-1	-3	-12	-1
Sin Mn	3	2	-4	-11	7

hongo las cifras se ubicaron entre 52,6 y 55%. La situación de la LDA (lignina en detergente ácido) fue diferente: a los 120 días de edad el pasto presen-

tó 42,5% de esta fracción. La fermentación con las dos cepas del hongo condujo a que la concentración de la LDA se ubicara entre 11 y 12,2%.

Tabla 2. Caracterización química del pasto *P. purpureum* x *P. typhoides* sometido a los diferentes tratamientos después de siete semanas (Valores expresados en porcentaje de la materia seca).

Tratamiento	FDN ^a	FDA ^b	LDA ^c	Hemicelulosa ¹	Celulosa ¹
Pasto sin tratar	71,4 ± 0,655	44,8 ± 1,1	42,5 ± 0,3	26,6	2,3
Con <i>Ganoderma spp</i> y Mn	75,5 ± 0,07	54,2 ± 1,0	11,6 ± 0,6	21,3	42,6
Con <i>Ganoderma spp</i> sin Mn	74,9 ± 0,51	53,2 ± 1,8	11,0 ± 0,35	21,7	42,2
Con <i>Lentinus spp</i> y Mn	78,9 ± 0,74	52,6 ± 0,6	11,0 ± 0,27	26,3	41,6
Con <i>Lentinus spp</i> sin Mn	77,5 ± 1,28	55,0 ± 0,6	12,2 ± 0,325	22,5	42,8

¹ Valores estimados

^{a, b, c} Valores promedio de tres determinaciones ($p \leq 0.05$)

Caracterización química de la pared celular del pasto *P. purpureum* x *P. typhoides*, fermentado con el hongo *Ganoderma ssp* suplementado con Mn en el estudio -FES dos-

Los resultados de la caracterización química de la pared celular de la tabla 3 se presentan únicamente para el pasto fermentado con *Ganoderma ssp* en medio suplementados con Mn (FES dos), porque con este tratamiento hubo delignificación selectiva.

A las 7 semanas, el pasto del tratamiento control presentó unos contenidos elevados de los componentes de la pared celular (77%, de FDN de 55,9%

de FDA y 59% de LDA); el contenido de LDA constituyó la confirmación de la alta lignificación de este pasto. En cambio, entre la muestra de pasto del tratamiento control y las fermentadas se constató diferencia en el porcentaje de LDA al pasar de 59% en el tratamiento control a 14,1% y 10,7% a la 4^a y 7^a semana de fermentación ($P < 0,05$). De acuerdo con estos resultados, se debería esperar que un alimento con alto contenido de FDN y de FDA pero bajo de LDA tendría, en teoría, mayor digestibilidad, lo que significaría que las muestras de pasto sometidas a la FES serían digeridas mejor por los rumiantes que aquellas no fermentadas.

Tabla 3. Caracterización de la pared celular del pasto *P. purpureum* x *P. typhoides* después de cuatro y siete semanas de fermentación con *Ganoderma ssp* en medios con Mn (Valores expresados en porcentaje de la materia seca).

Condición	FDN ^a	FDA ^b	LDA ^c	Hemicelulosa ¹	Celulosa ¹
Pasto sin hongo	77,0 ± 0,447	55,9 ± 0,510	59,0 ± 0,495	18,0	3,1
Pasto a la 4 ^a semana fermentado	75,2 ± 0,890	55,8 ± 0,595	14,1 ± 0,546	19,4	41,7
Pasto a la 7 ^a semana fermentado	75,7 ± 0,739	62,1 ± 0,904	10,7 ± 0,748	13,6	51,7

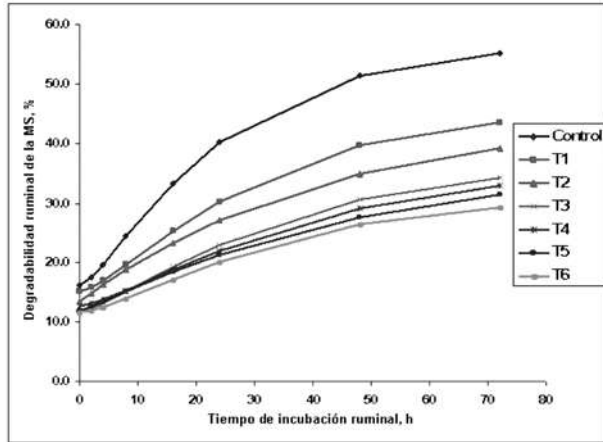
¹ Valores estimados

^{a, b, c} Valores promedio tres determinaciones ($p \leq 0.05$)

Estudio de la digestibilidad de la materia seca del pasto *P. purpureum* x *P. typhoides* fermentado con *Ganoderma ssp* suplementado con Mn en el estudio -FES dos-

En la figura 3 se presenta el comportamiento de las curvas de degradabilidad *in situ* de la materia seca de las muestras fermentadas con *Ganoderma ssp*. No

se encontró diferencia en esta variable de respuesta en las muestras de pastos entre la segunda y la séptima semana de fermentación ($P > 0,05$). En esta figura se observa que para ninguno de los tiempos de fermentación, la regresión confirma un comportamiento lineal entre el tiempo de incubación ruminal y la degradabilidad ruminal de la materia seca.



T1, T2, T3, T4, T5 y T6 corresponde a la semana de fermentación

Figura 3. Comportamiento de la degradabilidad *in situ* de la materia seca de muestras de pasto *P. purpureum* x *P. typhoides* sometidas a siete semanas de fermentación con el hongo *Ganoderma spp.*

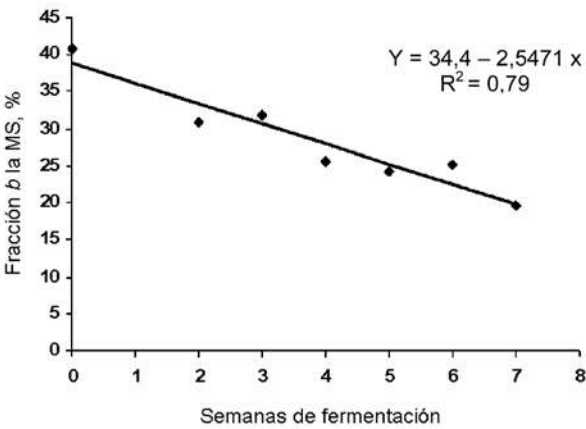


Figura 4. Comportamiento de la digestibilidad *in vitro* de la materia seca de muestras de pasto *P. purpureum* x *P. typhoides* sometidas a siete semanas de fermentación con el hongo *Ganoderma spp.*

En la figura 4 se presentan los resultados del estudio de digestibilidad *in vitro* de la materia seca. Los resultados obtenidos con esta metodología siguen la misma tendencia que los obtenidos con la degradabilidad *in situ* y permiten establecer que el tiempo de fermentación del pasto por el *Ganoderma spp* explicó en buen porcentaje (79%) la disminución en el porcentaje de desaparición de la materia seca. El estudio de digestibilidad *in vitro* también sugiere que no parecen existir argumentos que autoricen concluir que existe diferencia en el porcentaje de desaparición de la materia seca entre las semanas de fermentación ($P > 0,05$).

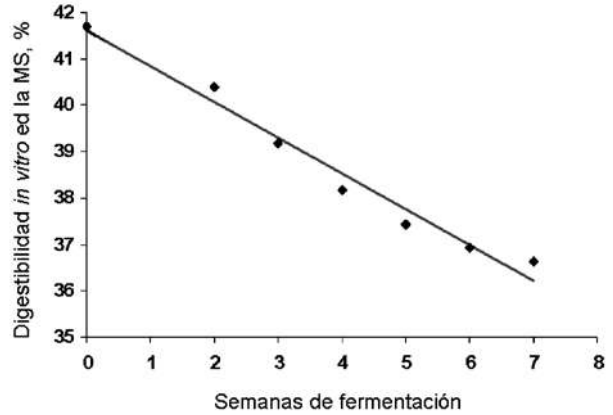


Figura 5. Curva de regresión de la digestibilidad *in vitro* de la materia seca del pasto *Pennisetum purpureum* x *Pennisetum typhoides* por el método de la celulasa en función de las semanas de fermentación con la *Ganoderma spp.*

DISCUSIÓN

En este estudio se pudo establecer, a partir de los resultados arrojados por los análisis por IR-TF y por van Soest y Wine (30), que a las 7 semanas el proceso de fermentación con *Ganoderma spp* en medios con Mn presentó mayor proporción de los grupos alquil C-H que estructuras con esqueleto aromático (lignina). Lo anterior significa que el sistema fue selectivo para degradar las estructuras aromáticas, dejando las estructuras celulósicas y hemicelulósicas.

Este resultado es muy promisorio si se compara con los obtenidos por Xiaoyu *et al* (34) quienes estudiaron 34 cepas aisladas en la China. Estos autores inocularon las cepas en medio líquido que contenía culmos de Moso bambú (*Phyllostachys pubescente*) y determinaron la pérdida de lignina y celulosa por el método de van Soest; encontraron que solamente dos cepas: *E taxodii* 2538 y *T. versicolor* lograron obtener una delignificación selectiva, es decir, alta pérdida de lignina y baja de celulosa. Estos autores utilizaron, entre otras técnicas, el análisis por IR-TF para corroborar los cambios relativos de la lignina a 1510 cm^{-1} contra los cambios en los picos de los carbohidratos a otras longitudes de onda de manera similar a los encontrados en este trabajo.

Los resultados obtenidos en el segundo montaje para la FES sugieren que a las 7 semanas se encontró una reducción significativa en el contenido de lignina, lo cual, en principio, se podría traducir en el mejoramiento de la digestibilidad de la pared celular por parte de los rumiantes. Algunos autores

(35, 36, 37) se han manifestado sobre la relación que existe entre la lignina y otros componentes de las paredes celulares, especialmente el entrecruzamiento con ferulatos, los cuales tienen una fuerte influencia negativa sobre la digestibilidad *in vivo* e *in vitro*, a tal punto que el efecto es independiente de la concentración de lignina en la fracción de fibra analizada.

Teóricamente, la digestibilidad del forraje está dada en función de la cantidad y la calidad de la pared celular que posea. De esta forma se espera que a mayor contenido de ésta, menor será la digestibilidad del forraje. Por lo tanto se espera que cuanto mayor sea el contenido de FDN, FDA y LDA de un forraje, menor será su digestibilidad. En el estudio, ni los resultados de las pruebas de degradabilidad *in situ* ni los de digestibilidad *in vitro* permiten concluir que se haya presentado mejoramiento de la digestibilidad de la materia seca del pasto como consecuencia de la influencia ejercida por la cepa de *Ganoderma ssp* utilizada. Posiblemente algunos componentes activos de la cepa pudieron haber interferido en la degradación de los carbohidratos estructurales. Para que se inicie la digestión de las paredes celulares en el rumen, primero ocurre la colonización de las partículas por parte de los microorganismos; puede ser que la estructura de las muestras degradadas no haya sido adecuada para que se hubiese dado esta colonización, como posiblemente sí ocurre en las muestras de pasto que no fueron fermentadas (35, 36, 37). Las relaciones entre la lignina y los componentes fenólicos de la pared celular determinan su influencia sobre la digestibilidad tanto *in vivo* como *in vitro*. En las paredes celulares de los pastos, la lignina que se encuentra entrecruzada con arabinosilanos parece ser un importante factor que limita la utilización de la energía por los microorganismos del rumen; esta proporción puede variar significativamente entre las muestras tratadas y las no tratadas. Algunos autores sostienen que el complejo mecanismo de degradación ruminal de la fibra en detergente neutro digerible es selectivamente retenida en el rumen comparada con la indigerible. Malherbe y Cloete (38) presentaron una revisión en la que concluyeron que no se ha logrado obtener, en escala industrial, el mejoramiento de los forrajes con la utilización de los hongos de la podredumbre; una posible explicación es que su naturaleza animal los prevenga de la ingestión de hongos, porque ellos pueden contener tóxicos o ser tóxicos para la mi-

croflora de su rumen y, por lo tanto, también ser tóxicos para los animales.

Como resultado de la compleja composición de la pared celular, los actuales métodos de análisis de caracterización química sólo proporcionan información de una composición promedio de las paredes celulares en un alimento, y su capacidad para dar cuenta de la influencia que ejercen los tipos individuales de tejidos sobre el animal es limitada. Esto explica por qué varios autores (35, 36, 37, 38) han sugerido que para un análisis efectivo de la evaluación nutricional de los forrajes no se deberían utilizar las actuales pruebas de caracterización de la pared celular ni las de digestibilidad *in vivo* e *in vitro* como criterio de selección directo y único y que se requieren análisis estereoquímicos y la elucidación de los compuestos con actividad antinutricional.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo indican varios aspectos básicos que son consistentes:

1. Después de siete semanas, el contenido de materia seca no fue igual en las muestras procedentes del pasto sin el hongo (70,6%) que en aquellas fermentadas con el hongo con o sin suplementación con Mn (superior al 91%).
2. Pero de igual forma se incrementó el contenido de FDN (al pasar de 71,4% a valores por encima de 74,9%) y FDA (pasó de 44,8% a valores superiores a 52,6%).
3. El hecho más notable fue la caída en el porcentaje de la LDA en las muestras sometidas a biodegradación, especialmente con la cepa *Ganoderma ssp* donde pasó de 55,9% a 10,7%.
4. También que en las muestras tratadas con *Ganoderma spp* se obtiene una pérdida del 70% de los compuestos aromáticos con relación a los alifáticos determinada por Ir-TF.
5. El hongo *Ganoderma spp* se presenta con un gran potencial para degradar selectivamente la lignina del pasto *King grass* dejando disponible la celulosa. Es importante continuar las investigaciones en este campo y adelantar la posibilidad de utilizar este sustrato y otros potencialmente útiles como algunas especies de bambú, teniendo en cuenta que ambos pertenecen a la familia de las gramíneas y su uso con estos fines podría constituir un aporte en la búsqueda de alternativas de alimentos de valor nutricional para al ganado.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Antioquia, Programa de Gestión Tecnológica, al SENA y a la Comunidad Europea a través de la RED ALFA CARIBIOTEC, por la financiación de la investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Murgueitio RE. Sistemas Agroforestales para la Producción Ganadera en Colombia. Fundación CIPAV Cali, Colombia. Disponible en: <http://www.cipav.org.co/redagrofor/memorias99/Murgueit.htm>. Consultado en: 17 de Julio de 2004
- Mendoza MPE. Manejo de praderas en Colombia. En: Pastos y forrajes para Colombia. Suplemento Ganadero. 3ª ed. Bogotá (s.c.); 1992. p 54-58.
- Van Soest PJ; Robertson, JB; Lewis, BA. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*. 1991; Vol. 74 (10): 3583-3597.
- Mila PA. Suelos, pastos y forrajes. Bogotá: UNISUR; 1996. p 267.
- Craig AD. Utilización de subproductos de matadero en porcicultura y ganadería lechera. En: Seminario Manejo de Subproductos Agroindustriales y Recursos no Convencionales en la Alimentación Animal. Corporación para el Desarrollo Integral del Sector Pecuario (CIPEC). Cali: Banco Ganadero; 1995. Vol. 2: 1-14.
- Ramos N, Herrera RS, Curbele F. Reseña descriptiva del King Grass en Cuba. La Habana: Instituto de Ciencia Animal (ICA); 1979: p 44.
- Cordavi E, Herrera J, Sarroca J. Producción y utilización del King Grass en suelos pardos tropicales. *Pastos y Forrajes* 1980; 3: p 41-50.
- Ramírez R, Ramírez RG, López F. CIENCIA UNAL (Universidad Autónoma de Nuevo León). 2002; 2:180-189.
- Bernal EJ. Pastos y forrajes tropicales; producción y manejo. 3ª ed. Bogotá: Banco Ganadero; 1994. p 575.
- McDonald P, Henderson N, Heron S. The biochemistry of silage. Marlow Bucks, UK: Chalcombe; 1991.
- Philipp D, Moore K, Pedersen J, Grant R, Redfearn D, Mitchell R. *Biomass and Bioenergy* 2007; 31(7):492-496.
- McDonald P, Whittenbury R. The ensilage process. En: Butler GW, Bailey RW, editors. *Chemistry and biochemistry of herbage*. New York: Academic Press; 1973, p33-60
- Akin DE, Rigsby LL, Sethuraman A, Morrison 3rd WH, Gamble, GR, Eriksson, KE. Alterations in structure, chemistry, and biodegradability of grass lignocellulose treated with the white rot fungi *Ceriporiopsis subvermisporea* and *Cyathus stercoreus*. *Appl. Environ. Microbiol* 1995; 61(4): p1591-1598.
- Bennet JW, Wunch KG, Faison BD. Use of fungi biodegradation. En: Hurst Ch.(editor) *Manual of environmental microbiology*. 2ª ed. Washington: ASM Press; 2002.
- Camarero S, Sarkar S, Ruiz-Dueñas FJ, Martínez MJ, Martínez AT. Description of a versatile peroxidase involved in the natural degradation of lignin that has both manganese peroxidase and lignin peroxidase substrate interaction sites. *The J Biol Chem* 1999; 274(15): p 10324-10330.
- Chen AW. Mushrooms Worldwide. Part III. Mushrooms for the tropics. Growing *Ganoderma* mushrooms. En: *Mushroom Growers' Handbook, 1 Oyster Mushroom Cultivation*. MushroomWorld 2004: p 224-234.
- D'Souza TM, Trevor M, Merritt CS, Reddy CA. Lignin-Modifying Enzymes of the White Rot Basidiomycete *Ganoderma lucidum*. *App. Environ. Microbiol*. 1999; 65 (12) : p5307-5313
- Hatakka A. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiol*. 1994; (13): p 125-135.
- Akin DE, Sethuraman A, Morrison III WH, Martin SA, Eriksson K-EL. Microbial delignification with white rot fungi improves forage digestibility. *App Environ Microbiol* 1993; 59(12): p 4274-4282
- Rubanza CDK, Shem MN, Otsyna R, Bakengesa SS, Ichinohe T, Fujihara T. Polyphenolics and tannins effect on in vitro digestibility of selected *Acacia* species leaves. *Anim Feed Sci Technol* 2005; 119:129-142.
- Agosin E, Odier E. Solid-state fermentation, lignin degradation and resulting digestibility of wheat straw fermentad by selected white-rot fungi. *Appl. Microbiol. Biotech*. 1985; 21:397-403.
- Chen J, Fales SL, Varga GA, Roysse DJ. Biodegradation of cell wall components of maize stover colonizad by white rot fungi and resulting impact on in-vitro digestibility. *J. Sci Food Agric*. 1995; 68:91-98.
- Zadrazil F, Isikhuemhen O. Solid state fermentation of ligninocellulosics into animal feed with white rot fungi. En: Roussos S, Lonsane BK, Raimbault M, Viniegra Gonzalez G (editores). *Advances in solid state fermentation*. Dordrecht, Países Bajos: Kluwer Academic Publishers,;1997; pp 23-38.
- Malherbe S, Cloete TE. Ligninocellulose biodegradation: Fundamentals and aplicaciones. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 2002; 1:105-114.
- Xiaoyu Z, Honbo Y, Huiyan H, Youxun L. Evaluation of biological pretreatment with white rot fungi for the enzymatic hydrolysis of bamboo culmos. *Int Biodeterioration Biodegrad* 2007; 60: 159-164.
- Robinson T, Singh D, Nigam P. Solid-state fermentation: a promising microbial technology for secondary metabolite production. *Appl Microbiol Biotechnol* 2001; (55): p281-289.
- Kirk TK, Farrel RL. Enzymatic combustion the microbial degradation of lignin. *Annu Rev Microbiol* 1987; 41: p 465-505
- Paszczynski A, Huynh Van-Ba, Crawford R. Comparison of ligninase-I and peroxidase M-2 from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch Biochem Biophys* 1986; 244 (2): p755.
- Bourbonnais R, Paice M. Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Lett* 1990; 267: p 99-102.
- Van Soest PJ, Wine RH. Determination of lignin and cellulose in acid detergent fiber with permanganate. *J Assoc Off Anal Chem* 1968; 51: 780-785.
- Pandey KK, Pitmanb AJ. FTIR studies of the changes in wood chemistry following decay by brown-rot and white-rot fungi. *Int Biodeterioration Biodegrad* 2003;52: p 151 - 160.
- Orskov ER, WJ Shand. Use of the nylon technique for protein and energy evaluation and for rumen environment studies in ruminants. *Livestock Research for Rural Development* 1998; 9: 1.
- McDonald P, Henderson N, Heron S. The biochemistry of silage. Marlow, Bucks, UK: Chalcombe; 1991
- Xiaoyu Z, Honbo Y, Huiyan H, Youxun L. Evaluation of biological pretreatment with white rot fungi for the enzymatic hydrolysis of bamboo culmos. *Int Biodeterioration Biodegrad* 2007.
- Casler MD, Jung H-JG. Relationships of fibre, lignin, and phenolics to in vitro fibre digestibility in three perennial grasses. *Anim Feed Sci Technol* 2006; 125, 1-2: 151-16.
- Weisbjerg LMR, Hvelplund T. Digestible NDF is selectively retained in the rumen of dairy cows compared to indigestible NDF *Animal Feed Sci Technol* 2007; 34, 1-2, : 1-17.
- Lund P, WeisbjergMR, Hvelplund T. Digestible NDF is selectively retained in the rumen of dairy cows compared to indigestible NDF *Animal Feed Sci Technol* 2007; 134, 1-2, 1-17.
- Malherbe S, Cloete TE. Ligninocellulose biodegradation: Fundamentals and aplicaciones. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 2002. Vol 1:105-114.