



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE CEPAS DE
Trichoderma PARA EL DESARROLLO DE ENZIMAS
EXÓGENAS PARA RUMIANTES**

TESIS

**PRESENTADO COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

PRESENTA:

M. en C.A. VICKY GARCÍA RODRÍGUEZ

COMITÉ TUTORAL

Director:

Dr. Germán David Mendoza Martínez

Co-Director:

Dr. Octavio Loera Corral

Asesora:

Dra. María del Carmen Montes Horcasitas

Ciudad de México, Enero 2020



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE CEPAS DE
Trichoderma PARA EL DESARROLLO DE ENZIMAS
EXÓGENAS PARA ADICIONARLAS AL FORRAJE PARA RUMIANTES**

La presente tesis fue realizada bajo la supervisión del Comité Tutorial indicado a continuación y aprobada como requisito en el plan de estudios para obtener el grado de: **DOCTORA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

COMITÉ TUTORAL

Director: Dr. Germán David Mendoza Martínez

Co-Director: Dr. Octavio Loera Corral

Asesor: Dra. María del Carmen Montes Horcasitas

Ciudad de México, Enero 2020



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00013

Matrícula: 2161800506

Evaluación de la actividad enzimática de cepas de Trichoderma para el desarrollo de enzimas exógenas para fumigantes.



En la Ciudad de México, se presentaron a las 8:00 horas del día 22 del mes de enero del año 2020 en la Unidad Xochimilco de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. OCTAVIO LOERA CORRAL
- DR. GERMAN DAVID MENDOZA MARTINEZ
- DR. PEDRO ABEL HERNANDEZ GARCIA
- DR. ENRIQUE ESPINOSA AYALA
- DRA. JAZMIN EDITH MENDEZ HERNANDEZ

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

DE: VICKY GARCIA RODRIGUEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



VICKY GARCIA RODRIGUEZ
ALUMNA

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

MTRA. MARIA ELENA CONTRERAS GARFIAS

PRÉSIDENTE

DR. OCTAVIO LOERA CORRAL

VOCAL

DR. GERMAN DAVID MENDOZA MARTINEZ

VOCAL

DR. PEDRO ABEL HERNANDEZ GARCIA

VOCAL

DR. ENRIQUE ESPINOSA AYALA

SECRETARIA

DRA. JAZMIN EDITH MENDEZ HERNANDEZ

El Doctorado en Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Programas de Calidad del CONACYT.

Agradecimientos

Hay mucha gente a la que tengo que agradecer por estos cuatro años de gran aprendizaje, unos con su conocimiento, otros con su ayuda, unos más con su apoyo emocional, hicieron que mi trabajo fuera más fácil de lo que pensé que iba a ser. Trataré de cubrir a todos.

Primero, me gustaría agradecer al Dr. Germán Mendoza Martínez que fue la primera persona en apoyarme para comenzar esta etapa, por guiarme y creer en mí, por ser tan dedicado en lo que hace y contagiarme un poco de esa pasión que tiene por su trabajo, gracias por forzarme y hacerme ver mi trabajo de diferentes ángulos.

Agradezco al Dr. Octavio Loera Corral por siempre proveerme del mejor consejo, por ser una persona recta y extremadamente profesional, por siempre escuchar y tratar de entender y deshacer mi madeja de ideas, por el tiempo en su laboratorio, el cual fue realmente relevante para mi investigación.

También quisiera agradecer a la Dra. María de Carmen Montes Horcasitas por instruirme y apoyarme en su laboratorio, por guiarme en mis escrituras y por su tiempo de trayecto para estar presente en mis presentaciones.

Doctor Luis Miranda, Laura y Carmen, su apoyo fue crucial en la segunda parte de mi proyecto.

A la Dra. Karen Beauchemin y su grupo de investigación por todo su apoyo en mi estancia.

A las damas metabólicas, al laboratorio W104- Toxicología, al laboratorio de biotecnología, a ecología molecular, etc...

“La historia de las ciencias nos demuestra que las teorías son perecederas. Con cada nueva verdad revelada, tenemos una mejor comprensión de la naturaleza y nuestras concepciones, y nuestros puntos de vista, se modifican”.

Nikola Tesla

Prefacio

Partiendo que la población humana está en constante crecimiento y como consecuencia el aumento de la demanda de los alimentos, se forja la idea de sostenibilidad como las acciones correctivas y preventivas para satisfacer las necesidades de la población sin comprometer las capacidades futuras

Por el lado de las implicaciones en la sostenibilidad de la industria de la carne, se están desarrollando sistemas en los cuales se produzca un alimento que no tenga consecuencias ambientales, que sea sano, seguro, eficiente y económicamente accesible.

De esta forma nace la idea de esta investigación, en la cual se plantea una opción para mejorar la degradabilidad de los forrajes ya que las condiciones para la digestión de la fibra son a menudo subóptimas en el rumen, dando como alternativa el uso de enzimas exógenas fibrolíticas, las cuales son cada vez más consideradas en los sistemas de producción animal (Meale et al., 2014).

Con base en lo anterior en el presente trabajo, se propuso utilizar desechos agroindustriales a los cuales se les dé un pre- tratamiento biológico novedoso, incorporando un hongo productor de enzimas fibrolíticas a un bloque nutricional con objetivo de mejorar la digestibilidad y por ende se traduzca en un incremento de la productividad.

Referencias

Maia de Souza D, Petre R, Jackson F, Hadarits M, Pogue S, Carlyle C N, Bork E, McAllister T 2017 A review of sustainability enhancements in the beef value chain: state-of-the-art and recommendations for future improvements *Animals* 7 26

Meale SJ, Beauchemin KA, Hristov AN, Chaves A V, Mcallister TA. Opportunities and challenges in using exogenous enzymes to improve ruminant production. *J Anim Sci.* 2014; 92(2,1):427–42.

Resumen

Se elaboró un bloque multinutricional para rumiantes al cual se le adicionó un hongo filamentososo del género *Trichoderma*, productor de enzimas fibrolíticas. Se compararon las actividades enzimáticas de dos cepas de *Trichoderma viride* (CINVESTAV, México; UAM-Xochimilco Phytopathology, México), una de *Trichoderma reesei* (*T. reesei* CDBB356, CINVESTAV, México) y una de *Trichoderma harzianum* (*T. harzianum* Rifai, BUAP Centro de agroecología, México) cultivadas en cuatro diferentes sustratos: rastrojo de maíz (CS), bagazo de caña de azúcar (SCB), fibra de *Yuca schidigera* (YS) y composta, elaborada a partir de residuos sólidos de la cafetería universitaria (CSW). *T. reesei* mostró la actividad fibrolítica más alta en la mayoría de los sustratos, por lo que se eligió para ser adicionada al bloque multinutricional y se estudió su efectividad a los 7 y 49 días de almacenamiento. Como resultado se obtuvo una mayor digestibilidad *in vitro* en el bloque que contenía al microorganismo su efecto positivo permaneció hasta 49 días después de elaborar el bloque.

Abstract

A multi-nutritional block for ruminants was developed, in which a filamentous fungus of the genus *Trichoderma*, producer of fibrolytic enzymes was added. The enzymatic activities of two strains of *Trichoderma viride* (CINVESTAV, Mexico; UAM-Xochimilco Phytopathology, Mexico), one of *Trichoderma reesei* (*T. reesei* CDBB356, CINVESTAV, Mexico) and one of *Trichoderma harzianum* (*T. harzianum* Rifai, BUAP Agroecology Center, Mexico) grown on four different substrates: corn stubble (CS), sugarcane bagasse (SCB), *Yuca schidigera* (YS) fiber and compost, made from solid waste from the university cafeteria (CSW). *T. reesei* showed the highest fibrolytic activity in most substrates, so it was chosen to be added to the multi-nutritional block and its effectiveness was studied at 7 and 49 days of storage. As a result, greater *in vitro* digestibility was obtained in the block containing the microorganism, its positive effect remained up to 49 days after the block was prepared.

Contenido

Justificación	8
Hipótesis	8
Objetivo general	8
Marco teórico	9
Estructura de los forrajes.....	9
Enzimas fibrolíticas exógenas	11
Celulasas	11
Xilanasas	11
Ligninasas.....	12
Valor en el mercado	12
Microorganismos utilizados en la producción de celulasas y xilanasas.....	13
Género <i>Trichoderma</i>	13
Suplementación	14
Bloques nutricionales	15
Tipos de bloques nutricionales	16
Técnica de producción de gas <i>in vitro</i>	17
Conclusion	18
Referencias	18
Anexo A. Artículos producidos a partir de esta tesis.....	23

Justificación

Los microorganismos del tracto gastrointestinal de los rumiantes son los responsables de la digestión del 60% al 90% de la celulosa y hemicelulosa (Moreira et al., 2013), sin embargo el contenido de fibra de los forrajes no es aprovechado al cien por ciento (Adesogan et al., 2014), ya que las fracciones de su pared celular presentan enlaces complejos que limitan la degradación de los nutrientes en el rumen, por lo que no se alcanza la digestión potencial ni el consumo máximo de energía disponible para el animal, lo cual también aumenta la excreción de residuos no digeridos (Mendoza et al., 2014). Una forma de mejorar la digestibilidad de los forrajes es el uso de enzimas exógenas producidas por microorganismos, generalmente hongos y/o bacterias. En la actualidad el uso de enzimas fibrolíticas comerciales en nuestro país es limitado, debido a que la mayoría son importadas, lo que eleva su precio y las hace poco atractivas para los productores. Por esta razón es necesario el estudio y desarrollo de enzimas.

Hipótesis

La adición de *Trichoderma* y su sustrato de cultivo a un bloque multinutricional para rumiantes, mejorarán la digestibilidad *in vitro* del alimento.

Objetivo general

Evaluar la viabilidad de las enzimas exógenas de *Trichoderma* adicionadas a un bloque multinutricional.

Objetivos particulares

- 1) Comparar la actividad de enzimas fibrolíticas (celulólitica y xilanólitica) de cuatro cepas de *Trichoderma* crecidas en cuatro sustratos.
- 2) Evaluar la actividad enzimática fibrolítica (celulólitica y xilanólitica) de cultivos de *Trichoderma* antes de incorporarse en bloques multinutricionales.

4) Evaluar *in vitro* con microorganismos ruminales la digestibilidad de bloques multinutricionales con *Trichoderma* y su sustrato de cultivo.

Marco teórico

El consumo de productos agropecuarios como la carne y leche de bovino en México es de gran importancia, en el año 2015, la producción de carne de bovino aumentó el 16.03% y de leche el 10.77% (SIAP-SAGARPA, 2015). Se estima que la demanda de alimentos de origen animal para el año 2050 crecerá 70% comparado con el año 2010, para alimentar una población de 9,000 millones (Friedrich, 2014), esto implica que deben de buscarse alternativas para mejorar los sistemas de producción en la industria de los alimentos. La nutrición juega un papel fundamental para mejorar la productividad de los animales, por lo que se han explorado diferentes alternativas para mejorarla.

El uso de enzimas exógenas ha mostrado tener un efecto favorable en el rendimiento de los rumiantes, debido a la mejora en la digestibilidad de los forrajes ofrecidos, puesto que actúan sobre los complejos enlaces de sus paredes celulares (Beauchemin et al., 2003). Se ha mostrado la acción de éstas sobre la ganancia en peso y los rangos de conversión del alimento (Beauchemin et al., 2003; Salem et al., 2013; Arce-Cervantes et al., 2013).

Estructura de los forrajes

Los forrajes están constituidos por esquilmos agrícolas con diversas estructuras como:

- Hemicelulosas, que son polisacáridos formados por una cadena principal de residuos de xilosa (Figura 1a), unidos por uniones glicosídicas β (1-4) (xilanos, glucanos, galactanos, mananos, fructanos, xiloglucanos, arabinoxilanos) que revisten las fibrillas de celulosa y cristalizan con ella uniéndolas, representan del 20 al 35% del peso seco de la pared celular de tallos y de las hojas de los pastos (Mendoza et al., 2014).
- Celulosa, que es el componente mayoritario formado por fibrillas de (β -(1,4)-glucano), son monómeros de glucosa formados por enlaces de hidrógeno ligados a enlaces glucosídicos β (1-4), unido a otra glucosa y así

sucesivamente formando los D-glucanos (Selinger et al., 1996; Mendoza, 2014) (Figura 1b). La celulosa representa del 35 al 50% del peso seco de la mayoría de las paredes celulares primarias de las plantas (Mendoza et al., 2014). Cuando se encuentra en cadenas muy bien acomodadas, se le da el nombre de cristalina, cuando está en cadenas no organizadas, se les da el nombre de cadenas amorfas, esto ocurre en menor porcentaje (Juturu y Wu, 2014).

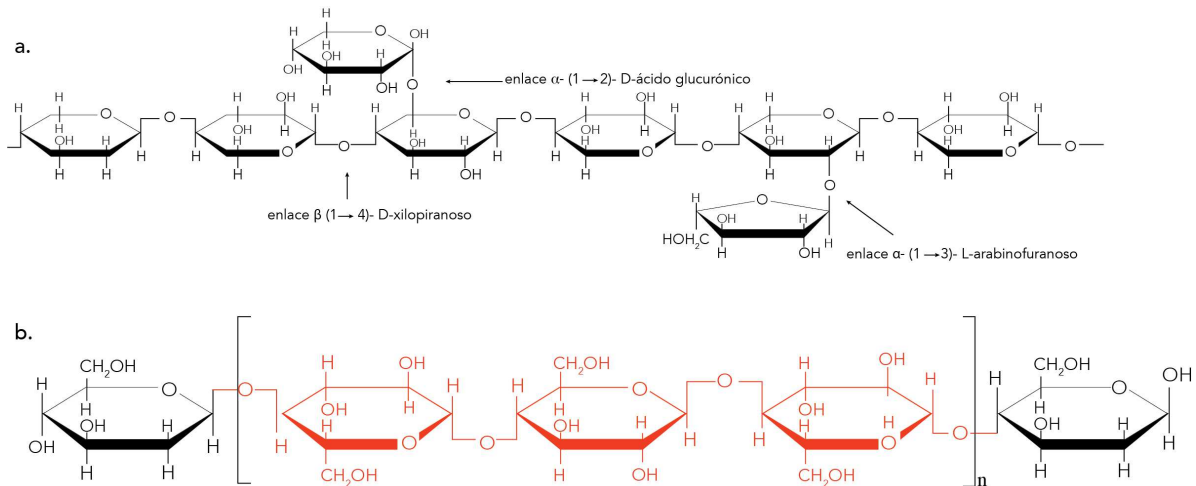


Figura 1. a) Estructura química del xilano con diferentes cadenas laterales unidas (Adaptado de Juturu y Wu, 2012).

- Lignina (Figura 2), representa del 10 al 15% del peso seco de la pared celular (Mendoza et al., 2014), es un polímero fenólico sintetizado por precursores fenilpropanoides y brindan soporte estructural, impermeabilidad y resistencia contra ataques microbianos (Druzhinina y Kubicek, 2017).

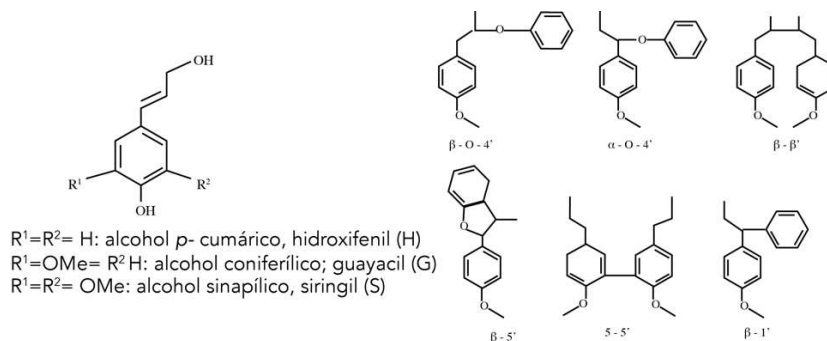


Figura 2. Bloques de construcción de lignina y enlaces comunes entre unidades de fenilpropano.

Enzimas fibrolíticas exógenas

La hidrólisis de estos polímeros constituidos en su mayoría por diversos carbohidratos a productos solubles requiere de la acción diversos tipos de enzimas, denominadas glucosilhidrolasas. (Cooper-Bribiesca, 2013).

Celulasas

Las celulasas, consisten en tres grandes grupos que tienen una acción sinérgica para hidrolizar la celulosa y son las endoglucanasas (EC 3. 2. 1. 4; figura 3a) que hidrolizan las uniones glicosídicas en las regiones amorfas de la celulosa, generando oligómeros de cadenas largas sin extremos reductores, las exoglucanasas y celobiohidrolasas (EC 3. 2. 1. 91, figura 3b) que actúan sobre las partes cristalinas de la celulosa y producen celo-oligosacáridos de cadenas cortas liberando celobiosa que posteriormente es hidrolizada a glucosa por las β -glucosidasas o celobiasas (EC 3.2.1.21; figura 3c ; Juturu y Wu, 2014; Bedford y Gary, 2001).

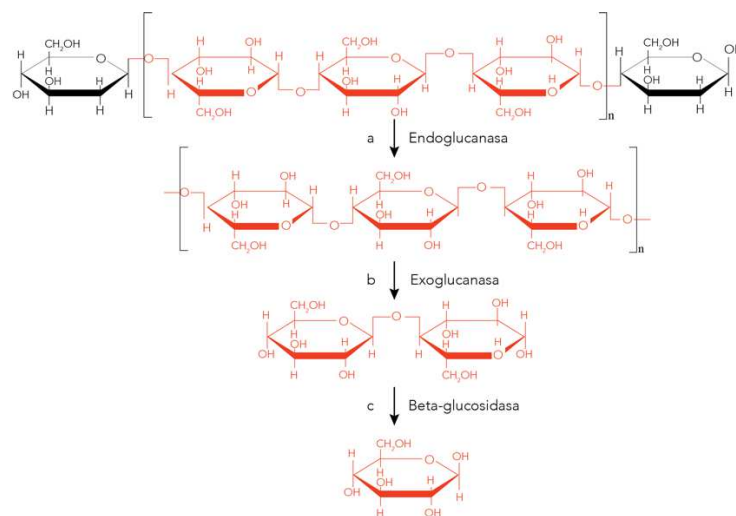


Figura 3. Estructura química del polímero de celulosa y el sitio de acción de las enzimas:

a) endoglucanasa, b) exoglucanasa y c) beta- glucosidasa.

Xilanasas

Debido a la heterogeneidad del xilano, componente menor a las celulosas, requiere de la acción de un sistema complejo de enzimas, denominadas generalmente xilanasas, cuya acción consiste en hidrolizar la cadena principal con las que

desprenden los grupos laterales unidos a los residuos de xilosa, las enzimas que actúan sobre la cadena principal son las endo- β -1,4-xilanasas (EC 3.2.1.8), que se adhieren aleatoriamente a la cadena principal del xilano, resultando en xilooligosacáridos ramificados. Las 1,4- β -D- xilosidasa (EC 3.2.1.37), enzimas que hidrolizan las cadenas laterales produciendo monómeros de xilosa, además de otras enzimas accesorias para la hidrólisis total, que incluyen la α -L- arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.55), acetilxilanestearasa y feruloilestearasa (EC 3.1.1.72 y EC 3.1.1.73, respectivamente) y alfa-D- glucuronidasa (EC 3.2.1.139), (figura 4).

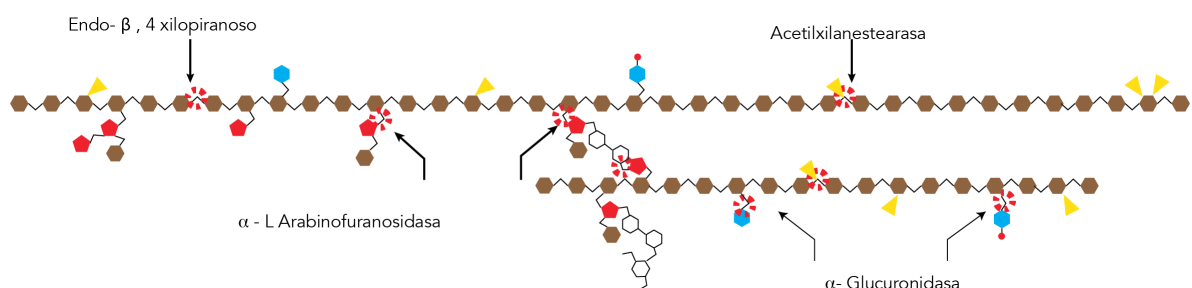


Figura 4. Principales enzimas xilanolíticas. (adaptado de Adesogan et al., 2014)

Ligninasas

La lignina, generalmente se degrada por una familia de peroxidadas ligninolíticas que incluyen lignina peroxidasa (LiP), peroxidasa de manganeso (MnP) y, más recientemente, peroxidadas versátiles (VP) (Mansour et al., 2016).

Valor en el mercado

La producción mundial de enzimas excede los 600 millones de toneladas por año con un volumen de ventas mayor a los 50 mil millones de dólares. El 60% de la oferta total mundial de enzimas se produce en Europa, y el 40% restante en Estados Unidos y Japón. El 75% de las enzimas industriales que se utilizan, son hidrolasas (Harris y Ramalingam, 2010). El mercado global de enzimas para alimentos se estimó en \$ 899.19 millones en 2014 y se espera que alcance cerca de \$ 1.3 mil millones para 2020, una tasa de crecimiento anual compuesta de 7.3% de 2015 a 2020 (Singh et al., 2016).

Microorganismos utilizados en la producción de celulasas y xilanasas

Tanto las celulasas como las xilanasas son expresadas por un amplio espectro de microorganismos como bacterias saprofitas y fitopatógenas, micorrizas, levaduras, hongos, actinomicetos, los cuales han sido aisladas de muestras de suelos, compostas, algas, estiércol y rumen bovino. (Juturu y Wu, 2014). Entre los microorganismos que se utilizan para producción comercial de enzimas para dietas de rumiantes destacan los hongos filamentosos que secretan las enzimas al medio, siendo sus rendimientos y actividad mucho mayores que las enzimas producidas por levaduras y bacterias (Harris y Ramalingam, 2010). Los géneros que más se utilizan son: *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Aureobasidium*, y *Talaromyces* sp (Godfrey et al., 1996; Juturu y Wu 2012; Juturu y Wu 2014; Ellilä et al., 2017) y entre las bacterias: *Bacillus* y *Cellulomonas* (Sujani y Seresinhe, 2015).

Género *Trichoderma*

El género *Trichoderma* spp, son hongos que han sido aislados en un gran número de países, generalmente del suelo. Las especies de *Trichoderma* (Hypocreales, Ascomycota) presentan un rápido crecimiento y alta tolerancia al estrés, algunas especies forman la base para productos comerciales aplicados al control biológico de hongos fitopatógenos, otras especies tienen efectos benéficos en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Y algunas otras especies, como *Trichoderma reesei* tienen importantes aplicaciones industriales como productoras de enzimas celulolíticas y hemicelulolíticas (Jiang et al., 2016).

La clasificación taxonómica actual lo ubica dentro del Reino de las plantas, División Mycota, Sub división Eumycota, Clase Deuteromicetes, Orden Moniliales, Familia Moniliaceae, Género *Trichoderma* con 27 especies conocidas como: *T. harzianum* Rifai, *T. viride* Pers., *T. polysporum* Link fr, *T. reesei* EG Simmons, *T. virens* , *T. longibrachatum* Rifai, *T. parceromosum* , *T. pseudokoningii* , *T. hamatum* , *T. lignorum* y *T. citroviride* .

Trichoderma reesei ha sido el modelo de microorganismo celulolítico por excelencia, fue aislado en las islas Salomón durante la Segunda Guerra Mundial como el agente causal de la infección masiva del material a base de algodón del ejército de los

Estados Unidos, identificado como *Trichoderma viride* y conservado en el Centro de Investigación y Desarrollo del Ejército de los Estados Unidos en Natick, Massachusetts. Su potencial como productor de celulasas fue reconocido por Mandels y Reese en 1957, posteriormente fue clasificado como una nueva especie y renombrado como *Trichoderma reesei* en honor al investigador del laboratorio de Natick, Elwyn T. Reese. Desde entonces, este microorganismo ha sido objeto de numerosas investigaciones (Bischof, et al., 2016).

Trichoderma participa en la biotransformación de celulosa (polímeros de glucosa de alto peso molecular), en la transformación de hemicelulosa (polisacárido que por hidrólisis libera hexosa y pentosa), en la mineralización del nitrógeno (reacciones hidrolíticas) y de algunas proteínas presentes en la degradación; en la descomposición de la lignina y el humus que al tener estructuras basadas en núcleos aromáticos son degradados por oxidación de cadenas laterales.

Los miembros del género *Trichoderma* tienen el potencial de sintetizar y liberar enzimas como celulasas, xilanasas y quitinasas, las cuales se han aprovechado en procesos industriales (Kubicek y Harman 1998, Verma et al. 2007). Comercialmente se emplean para producir detergente de ropa, aceite de oliva, vino, cerveza, jugos, alimentos para animales y en la producción de algunos combustibles (Reese y Mandels 1989, Verma et al. 2007). Por ejemplo, las celulasas de *Trichoderma reesei* se utilizan en el blanqueo de pulpa de papel, y son una alternativa amigable al convencional blanqueo con cloro, evitando el problema ambiental del cloro generado por dicho proceso (Buchert et al. 1994). Otra aplicación comercial es el uso de suplementos de celulasas y xilanasas de *T. reesei* y *T. viride* en la nutrición de rumiantes, para mejorar la digestibilidad de los carbohidratos estructurales en forrajes de alta calidad (Torres et al. 2013).

Suplementación

La suplementación es la práctica de proporcionar al animal nutrientes que son deficientes en su dieta basal y necesarios para su producción. En rumiantes, los productores, tradicionalmente, utilizaban suplementos en forma de concentrado convencional para mejorar el valor nutritivo de forrajes de mala calidad, pero sus

altos costos los hacían inaccesibles. En muchas partes del mundo, se han utilizado diferentes suplementos como:

- Arbustos y hojas de árboles o sus harinas, por su alto nivel de proteínas y por mejorar la utilización de residuos de cultivos (Anbarasu et al., 2004).
- Levaduras que se han utilizado como fuente natural para promover el crecimiento y actividad de los microorganismos que degradan la fibra (Tripathi y Karim, 2011).
- Taninos condensados, que protegen la proteína de la dieta de su degradación en el rumen (Devendra, 1990; Pathak et al., 2016).
- Enzimas exógenas para mejorar la digestibilidad de los rastrojos (García et al., 2019), etc.

Una manera fácil y económicamente viable para utilizar dichos suplementos, disponibles localmente para mejorar el valor nutritivo de los alimentos de baja calidad, es a través de su adición a bloques multinutricionales (Singh et al., 2015; Birbe et al., 2006).

Bloques nutricionales

Los bloques nutricionales son mezclas sólidas de ingredientes obtenidos a partir de subproductos agroindustriales de diversa calidad y su objetivo es complementar la alimentación con proteínas, vitaminas, minerales, etc. Aprovechando también los residuos y subproductos de cosecha de leguminosas y otros desperdicios agrícolas disponibles en cualquier región geográfica (FAO, 2007). En su formulación se incluyen uno o más aglutinantes (cal viva, cemento, bentonita, etc.), sal común como conservador, urea como fuente de nitrógeno no proteico y otros ingredientes como portadores de nutrientes, principalmente energía, nitrógeno y minerales (Singh et al., 2015), su objetivo es complementar a los rumiantes en forrajes de mala calidad (Birbe et al., 2006).

El uso de los bloques multinutricionales, ha sido una forma de alimentación estratégica durante la época seca, son resistentes a la intemperie y es consumido lentamente por lo que garantiza la dosificación de la urea (López-López y Méndez-Coleman, 2015). La implementación de bloques para el ganado ha sido usada en países y regiones tropicales, debido a la disponibilidad de melazas, urea,

subproductos de cosechas, etc. (Mejía et al., 2011), su uso es inmediato y puede ser suministrado en todo tiempo. Entre sus ventajas está el de poder elaborarse fácilmente con ingredientes locales de tamaño y peso adecuado para su manipulación y transporte, y además son de buena palatabilidad para los animales (Rodríguez-Molano, 2018). Sus características también han permitido su uso como vehículo de otros productos, conteniendo desparasitantes, antibióticos, ionóforos y hongos nematófagos, entre otros, cuyos efectos dependen fundamentalmente de la concentración de esos componentes dentro del bloque y del consumo animal (Birbe et al., 2006).

Tipos de bloques nutricionales

Existen diferentes tipos de bloques nutricionales:

Bloques minerales. Contienen macro y microelementos como sus principales componentes, incluyen melaza y cemento para controlar su dosificación.

Bloques terapéuticos (de tipo mineral o multinutricional). Contienen productos medicinales, sobre todo desparasitantes y estimulantes de crecimiento (Fariñas et al., 2009).

Bloques proteicos. Dan proteína al animal, contienen pastas o harinas de semillas (como algodón, girasol, cártamo, soya, etc.), gluten de maíz, urea, harina de pescado y otros productos altos en proteína. Además, se les agrega grano, grasa de origen animal o aceites en menor cantidad, como fuente de energía; los bloques energéticos, contienen principalmente, granos como sorgo, maíz, trigo, harinas, así también grasa animal o aceites vegetales (Raciél, 2003).

Bloques de entretenimiento. Tienen un contenido mayor de cemento (12 - 15%) que los bloques tradicionales (5 - 10%), de manera que el animal tiene que lamer mucho más para obtener algo de nutrientes, el propósito es más tranquilizar al animal en el momento del ordeño, y no tanto como fuente importante de nutrientes (Fariñas et al., 2009).

Para evaluar el efecto del bloque multinutricional en el desempeño productivo de los rumiantes se pueden utilizar métodos *in vivo*, *in situ* e *in vitro*. Dentro de los métodos *in vitro* se encuentra la técnica de producción de gases, la cual, no sólo determina

la extensión, sino también la cinética de degradación del alimento a través del volumen de gas liberado, directamente como un producto de la fermentación.

Técnica de producción de gas *in vitro*

La determinación *in vivo* de la digestibilidad es un proceso en el que se requieren grandes cantidades de alimento ya que sólo se pueden evaluar raciones totales, es laborioso, costoso y difícil de estandarizar (Bochi-Brum et al., 1999), por lo que Tilley y Terry (1963), propusieron una técnica con ligeras modificaciones. La más utilizada en la mayoría de los laboratorios, fue modificada por Goering y Van Soest (1970) para estimar la digestibilidad verdadera de la materia seca (Posada y Noguera, 2005), es decir, permite una valoración más rápida de los alimentos sin afectar negativamente a la precisión del valor obtenido (Bochi-Brum et al., 1999). La técnica de producción de gases es un método *in vitro* que permite determinar la extensión y la cinética de degradación del alimento a través del volumen de gas producido durante una fermentación, en esta técnica los componentes solubles del sustrato pueden ser cuantificados mientras se está llevando a cabo la fermentación (Posada y Noguera, 2005).

La energía para el crecimiento microbiano es derivada de la fermentación de los carbohidratos, principalmente almidón y celulosa, cuya digestión anaerobia produce ácidos grasos volátiles, succinato, formato, lactato, etanol, dióxido de carbono (CO_2), metano (CH_4), y trazas de hidrógeno (H_2); Sin embargo, también aportan esqueletos de carbono esenciales para la síntesis de biomasa microbiana (Posada y Noguera, 2005).

La técnica de producción de gas mide la cantidad de gas liberado directamente como un producto de la fermentación e indirectamente desde el fluido ruminal neutralizado. El gas es producido principalmente cuando el sustrato es fermentado hasta acetato y butirato. La fermentación del sustrato hasta propionato produce gas solamente desde la neutralización del ácido; por consiguiente, una menor producción de gas es asociada con la fermentación propiónica (Posada y Noguera, 2005).

Conclusión

Aunque las respuestas de la actividad enzimática de las diferentes cepas de *Trichoderma* fueron variables entre los forrajes evaluados, los resultados mostraron que *Trichoderma reesei* DBB356 cultivado en rastrojo de maíz tiene el potencial más alto para producir enzimas fibrolíticas, lo que se puede corroborar con los estudios *in vitro* que se llevaron a cabo, en los cuales se observó un incremento en la digestibilidad *in vitro* de materia seca con los bloques multinutricionales elaborados con *Trichoderma reesei* DBB356 y su sustrato de cultivo. Estos resultados indican que los bloques multinutricionales adicionados *Trichoderma reesei* DBB356 y su sustrato de cultivo, tiene potencial para mejorar la digestibilidad *in vitro* de materia seca. Para corroborar estos resultados es necesario hacer pruebas *in vitro* con diferentes forrajes tanto de alta como de baja calidad para comparar el efecto que las enzimas contenida en el bloque pueda tener sobre estos y para que pueda ser incorporado en los sistemas de producción, es necesario confirmar los resultados con una etapa de estudios *in vivo*.

Referencias

- Adesogan AT, Ma ZX, Romero JJ, Arriola KG. Ruminant Nutrition Symposium: Improving cell wall digestion and animal performance with fibrolytic enzymes 1. J. Anim. Sci. 2014; 92:1317–30.
- Anbarasu C, Dutta, N, Sharma K, Rawat M. Response of goats to partial replacement of dietary protein by a leafmeal mixture containing *Leucaena leucocephala*, *Morus alba* and *Tectona grandis*. Small Rum. Res. 2004; 51: 47-56.
- Arce-Cervantes, O.; Mendoza, G.; Miranda, L.A.; Meneses, M.; Loera, O. Efficiency of lignocellulolytic extracts from thermotolerant strain *Fomes* sp. EUM1: stability and digestibility of agricultural wastes. J Agr Sci Technol. 2013;15:229–40.
- Beauchemin KA, Colombatto D, Morgavi DP, Yang WZ. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. J Anim Sci. 2003;81:37–47.
- Bedford MR, Gary GP. Enzymes in Farm Animal Nutrition, 2nd edition, 2001 p.p.20.
- Bischof, R.H.; Ramoni, J.; Seiboth, B. Cellulases and beyond: the first 70 years of the enzyme producer *Trichoderma reesei*. Microb Cell Fact. 2016;15:106.

Birbe B, Herrera P, Colmenares O, Martínez, N. El consumo como variable en el uso de bloques multinutricionales. X Seminario de Pastos y Forrajes.2006, p. 43-61.

Bochi-Brum O, Carro MD, Valdés C, González JS, López S. Producción D De, Universidad AI, León DL. Digestibilidad *in vitro* de forrajes y concentrados : efecto de la ración de los animales donantes de líquido ruminal. Arch. Zootec. 1999; 48: 51-61.

Buchert, J.; Ranua, M.; Siika-aho, M.; Pere, J; Viikari J. *Trichoderma reesei* cellulases in bleaching of kraft pulp. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1994;40, 941- 945.

Cooper-Bribiesca BL. Enzimas xilanolíticas bacterianas y sus aplicaciones industriales. Vertientes. Revista Especializada en Ciencias de la Salud. 2013;16(1): 19-22.

Devendra C. The use of shrubs and tree fodders by ruminants. In Shrubs and Tree Fodders for Farm Animals. Proceedings of a workshop in Denpasar, Indonesia. IDRC, Ottawa, Canada. 1990 pp. 42-60.

Druzhinina IS, Kubicek CP. Genetic engineering of *Trichoderma reesei* cellulases and their production. Microb. Biotechnol. 2017;10:1485–99.

Ellilä S, Fonseca L, Uchima C, Cota J, Goldman GH, Saloheimo M, Sacon V, Siika-aho M. Development of a low-cost cellulase production process using *Trichoderma reesei* for Brazilian biorefineries. Biotechnol. Biofuels. 2017; 10:30.

FAO. 2007. Feed supplementation blocks. Urea-molasses multivitamin blocks: simple and effective feed supplement technology for ruminant agriculture. Animal Production and Health Division.

Fariñas TM., Reyes B., Mena N., Cardona M., Pezo, D. Cómo preparar y suministrar bloques multi-nutricionales al ganado? Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza Managua, Nicaragua. Serie Técnica, Manual técnico. 2009; N°. 92, p. 7-54.

Friedrich T. Producción de alimentos de origen animal. Actualidad y perspectivas. Rev. Cuba. Cienc. Agrícola. 2014; 48(1): 5-6.

García RV, Loera CO, Montes HM, Mendoza GD. *Trichoderma reesei* stands out among other strains for its fibrolytic capacity. Rev Fac Uncuyo; 2019. En prensa

Godfrey T, West S. Industrial enzymology: the application of enzymes in industry. 1996. MacMillan, New York.

Goering HK, Van Soest PJ. Forage Fibre Analysis, Agriculture Handbook, Agricultural Research Services, United States Department of Agriculture, 1970.

Harris AD, Ramalingam C. Xylanases and its Application in Food Industry : A Review. J. Exp. Sci. 2010;1:1–11.

Jiang Y, Wang JL, Chen J, Mao LJ, Feng XX, Zhang CL, Lin, F. *Trichoderma* biodiversity of agricultural fields in East China reveals a gradient distribution of species. PLoS One. 2016;11:1–14.

Juturu V, Wu JC. Microbial cellulases: Engineering, production and applications. Renew. Sustain. Energy Rev. 2014; 33:188–203.

Juturu V, Wu JC. Microbial xylanases: engineering, production and industrial applications. Biotechnol. Adv. 2012; 30:1219–27.

Kubicek C.P. y Harman G.E. *Trichoderma* and *Gliocladium*: Basic biology, taxonomy and genetics. Trends Microbiol. 1998; 6:459-460.

Kubicek, C.P.; Messner, R.; Gruber, F.; Mach, R.L.; Kubicek-Pranz, E.M. The *Trichoderma* cellulase regulatory puzzle: from the interior life of a secretory fungus. Enzyme Microbiol. Technol. 1993; 15:90-99.

López López B, Méndez Coleman W. Evaluación del efecto de inclusión de harina de *Piscidium de marango* (*Moringa oleífera*) en la elaboración de bloques multinutricionales en ovinos en desarrollo en la finca Santa Rosa, Managua (Doctoral dissertation, Universidad Nacional Agraria, UNA). 2015.

Mansour A.; Da Costa A.; Arnaud T.; Lu-Chau T.; Fdz-Polanco M.; Moreira M. Review of lignocellulolytic enzyme activity analyses and scale-down to microplate-based assays. Talanta. Elsevier; 2016; 150:629–37.

Martinez D, Berka RM, Henrissat B, Saloheimo M, Arvas M, Baker SE, Chapman, Jarod, Chertkov O, Coutinho P, Cullen D, Danchin E, Grigoriev I, Harris P, Jackson M, Kubicek C, Han C, Ho I, Larrondo L, Lopez De Leon A, Magnuson J, Merino S, Misra M, Nelson B, Putnam N, Robbertse B, Salamov A, Schmoll, M; Terry A, Thayer N, Westerholm-Parvinen A, Schoch C, Yao J, Barabote R, Nelson M, Detter C, Bruce

D, Kuske C, Xie G, Richardson P, Rokhsar D, Lucas S, Rubin E, Dunn-Coleman N, Ward M, Brettin T. Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). Nat. bio-Technol. 2008; 26 (5):553–60.

Mejía Haro, J., Delgado Hernández, J. L., Mejía Haro, I., Guajardo Hernández, I., y Valencia Posadas, M. Efectos de la suplementación con bloques multinutricionales a base de nopal fermentado sobre la ganancia de peso de ovinos en crecimiento. Acta Universitaria. 2011; 21(1): 11-16.

Mendoza GD, Corral OL, Plata FXP, García PAH, Ramírez MM. Considerations on the Use of Exogenous Fibrolytic Enzymes to Improve Forage Utilization. Sci. world J. 2014, Vol. 2014. Doi: 10.1155/2014/247437.

Moreira LM, Leonel F de P, Vieira RAM, Pereira JC. A new approach about the digestion of fibers by ruminants. Rev. Bras. Saúde e Produção Anim. 2013;14:382–95.

Mubi AA, Kibon A, Mohammed ID. Effects of multinutrient blocks supplementation on the performance of grazing yankasa sheep in the wet season of Guinea Savanna Region of Nigeria. Int. J. Sust. Agric. 2011; 3(3): 103-106

Mubi AA, Mohammed ID, Kibon A. Effects of multinutrient blocks supplementation on the performance of Yankasa sheep fed with basal diet of rice straw in the dry season of Guinea Savanna Region of Nigeria. Arch. Appl. Sci. Res. 2013; 5(4):172-178

Pathak AK, Dutta N, Banerjee PS, Goswami TK, Sharma K. Effect of condensed tannins supplementation through leaf meal mixture on voluntary feed intake, immune response and worm burden in *Haemonchus contortus* infected sheep. J. Parasit. Dis. 2016;40:100–5.

Posada SL, Noguera RR. Técnica *in vitro* de producción de gases: Una herramienta para la evaluación de alimentos para rumiantes. Livestock Research for Rural Development. 2005; 17(4):36

Raciel LM. Suplementación para el ganado bovino en pastoreo con proteína. Boletín informativo. UGRNV. 2003;(100): 2-4.

Reese, E.T.; Mandels, M. Rolling with the times: production and applications of *Trichoderma reesei* cellulase. Annual Reports of Fermentative Processes. 1989 ; 7, 1-20.

Rodríguez-Molano CE., Pulido-Suárez NJ. Determinación del valor nutricional de bloques nutricionales con diferentes porcentajes de *Sambucus peruviana* y *Zea mays*. Ciencia y Agricultura. 2018; 15(1):93-100.

Romero-Arenas O, Lara HM, Damián HM, Domínguez HF, Arellano VA. The characteristics of *Trichoderma harzianum* as a limiting agent in edible mushrooms. Rev. Colomb. biotecnol. 2009; 11:143–51.

Salem AM, Gado HM, Colombatto D, Eghandour MY. Effect of exogenous enzymes on nutrient digestibility, ruminal fermentation and growth performance in beef steers. Livestock Science. 2013; 154:69–73.

Selinger LB, Forsberg CW, Cheng KJ. The rumen: a unique source of enzymes for enhancing livestock production. Anaerobe. 1996;2:263–84.

SIAP-SAGARPA. Estadísticas de producción agrícola, 2015.

Singh S, Pathak AK, Muzaffer K, Sharma RK. Multi-Nutrient Blocks with and without Tanniferous Leaf Meal Mixture: Formulation and Preparation under Sub-Tropical Environment of Jammu. J. Anim. Res. 2015; 5:7–14.

Singh R, Kumar M, Mittal A, Mehta PK. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. 3 Biotech. 2016; 6:174.

Sujani S, Seresinhe RT. Exogenous Enzymes in Ruminant Nutrition: A Review. Asian J. Anim. Sci. 2015; 9:85–99.

Tilley JM, Terry RA. A two stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. J. Br. Grassl. Soc. 1963; 18: 104-111.

Torres, N.; Mendoza, G.D.; Bárcena, R.; Loera, O.; González, S; Effects of Various Fibrolytic Enzyme Extracts on Digestibility and Productive Performance of Lambs Fed a Forage-Based Diet #. Anim. Nutr. Feed Technol. 2013;13:381–9.

Tripathi MK, Karim SA. Effect of yeast cultures supplementation on live weight change, rumen fermentation, ciliate protozoa population, microbial hydrolytic enzymes status and slaughtering performance of growing lamb. Livestock Science. 2011;135(1), 17-25.

Verma, M.; Brar, S.K.; Tyagi, R.D.; Surampalli; R.Y.; Valéro, J.R. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. *Biochem. Eng. J.* 2007; 37, 1-20.

Anexo A. Artículos producidos a partir de esta tesis

Fibrolitic activity of four *Trichoderma* strains grown on agro-industrial residues

Actividad fibrolíticas de cuatro cepas de *Trichoderma* crecidas en residuos agroindustriales

Vicky García ^{1*}, Octavio Loera ², María del Carmen Montes ³, Germán David Mendoza ¹

Originales: Recepción: 16/11/2017 - Aceptación: 17/10/2018

Nota científica

ABSTRACT

The aim of this study was to compare the cellulolytic and xylanolytic activities of two strains of *Trichoderma viride*, one of *Trichoderma reesei* and one of *Trichoderma harzianum* grown on four different substrates. Each substrate contained 20% wheat bran and 80% agro-industrial waste (corn stover (CS), sugarcane bagasse (SCB), *Yucca schidigera* fiber (YS), or compost elaborated from solid waste generated in the university cafeteria (CSW)). An interaction ($P < 0.01$) between the substrate and strain was detected for both cellulolytic and xylanolytic enzyme activities. The highest cellulolytic activity ($P < 0.01$) was obtained with *T. reesei* grown on YS, CS, and SBC, and the lowest was from the two *T. viride* strains grown on most of the substrates. The highest xylanolytic activities ($P < 0.01$) were detected for *T. harzianum* with YS and SCB and *T. reesei* with CSW and CS, while one *T. viride* strain exhibited intermediate and the other showed the lowest activity. In conclusion, *T. reesei* CDBB356 showed the highest fibrolytic activity for most of the tested substrates, a finding that suggests it has the highest potential for fibrolytic enzyme production. There is a potential application for *T. reesei* CDBB356 enzymes on ruminant feed supplements to improve forage digestibility.

Keywords

cellulolytic activity • xylanolytic activity • enzymes • agro-industrial waste • *Trichoderma*

1 Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco. Doctorado en Ciencias Agropecuarias. Calzada del Hueso 1100. Col. Villa Quietud, C. P. 04960. Delegación Coyoacán. D. F. México. * vickycha@gmail.com

2 Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. Departamento de Biotecnología. Av. San Rafael Atlixco 186. Colonia Vicentina. C. P. 09340. Delegación Iztapalapa. D. F. México.

3 Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Av. Instituto Politécnico Nacional 2508. C. P. 07300. México. D. F. México.

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue comparar las actividades celulolíticas y xilanolíticas de dos cepas de *Trichoderma viride*, una de *Trichoderma reesei* y una de *Trichoderma harzianum* cultivadas en cuatro diferentes sustratos. Cada sustrato contenía 20% de salvado de trigo más 80% de residuos agroindustriales (rastrajo de maíz (CS), bagazo de caña de azúcar (SCB), fibra de *Yuca shidigera* (YS) o composta, elaborada a partir de residuos sólidos de la cafetería universitaria (CSW)). Se detectó una interacción ($P < 0,01$) cepa por sustrato en las actividades enzimáticas celulolíticas y xilanolíticas. La mayor actividad celulolítica ($P < 0,01$) se obtuvo con *T. reesei* en YS, CS y BC y la más baja con las dos cepas de *T. viride*, en la mayoría de los sustratos. Las actividades xilanolíticas más altas ($P < 0,01$) se detectaron en *T. harzianum* con YS y SCB y *T. reesei* con CSW y CS, mientras que una cepa de *T. viride* fue intermedia y la otra tuvo las actividades más bajas. En conclusión, *T. reesei* CDBB356 mostró la actividad fibrolítica más alta en la mayoría de los sustratos, confirmando el mayor potencial para producir esas enzimas. Existe una aplicación potencial de las enzimas de *T. reesei* CDBB356 en suplementos alimenticios para rumiantes para mejorar la digestibilidad del forraje.

Palabras clave

actividad celulolítica • actividad xilanolítica • enzimas • residuo agroindustrial • *Trichoderma*

INTRODUCTION

Trichoderma reesei has important industrial applications because of its cellulolytic and hemicellulolytic enzymes (19). Among the cellulase-producing fungi, the genus *Trichoderma* shows a high capacity to produce both exoglucanases and endoglucanases, and media components along with the solid substrate used for culturing under solid-state fermentation help determine the type of enzyme(s) produced (9).

Trichoderma species are widely distributed and there is high biodiversity with a variety of biological activities in agricultural fields (16). In a study in east China, Jiang *et al.* (2016) identified 17 species, among which *Trichoderma harzianum* was dominant, whereas, in a similar study in central Europe, *Trichoderma viride* was the most abundant

among 15 species found. One of the most studied strains of *T. reesei* was originally isolated on the Solomon Islands in the US; this strain was modified by metabolic engineering, and mutants of this strain are used in several industrial bioprocesses (6).

Fibrolitic enzymes can be used to improve digestibility, an important need with regards to feed utilization for ruminant production. Several fibrolitic enzymes have been developed and commercially used (20), most of them based on cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma* and other fungi (5). The global market for feed enzymes was estimated at \$899.19 million in 2014 and is expected to reach nearly \$1.3 billion by 2020, a compound annual growth rate of 7.3% from 2015 to 2020 (28). In many

countries, commercial enzyme products have not been implemented as strategy to improve feed utilization because imported products are expensive and its inclusion is not profitable (20). A country that develops and produces its own fibrolytic enzymes represents an opportunity to improve forage digestibility at a low cost. Hence, identification of strains able to degrade agricultural lignocellulosic residues to develop new enzymatic products locally is important in underdeveloped countries. Thus, the objective of this study was to compare the cellulolytic and xylanolytic activities of two strains of *T. viride*, one of *T. reesei*, and one of *T. harzianum* grown on four agro-industrial wastes. Each culture was composed of 20% wheat bran and 80% corn stover (CS), sugarcane bagasse (SCB), *Yucca schidigera* fiber (YS), or compost elaborated from university cafeteria solid waste (CSW). This design produced four different substrates. Since the most extensively studied cellulose-secreting microorganism is the filamentous fungus *T. reesei*, and its fibrolytic activity has been characterized (28), the hypothesis was that *T. reesei* CDBB356 would exhibit the greatest potential to produce fibrolytic enzymes.

MATERIALS AND METHODS

Substrates and chemical composition

Composite representative samples of CS, SCB, and wheat bran were obtained from the experimental dairy farm at the University of Chapingo, Mexico; residual fiber from *Y. schidigera* (YS) from commercial production was obtained from Alltech de Mexico S.A. de C.V.; CSW was obtained from anaerobic and aerobic fermentation of organic residues from the Autonomous Metropolitan University

cafeteria. All samples were oven dried at 45°C and milled to pass a 2 mm screen using a Wiley Mill (Standard model 4; Arthur H. Thomas Co., Philadelphia, PA). The dry matter and ashes in substrates were analyzed according to the AOAC (2), and neutral detergent fiber (NDF) and acid detergent fiber (ADF) content was determined; analyses were conducted according to Van Soest *et al.* (1991). Nitrogen content was determined with the Dumas procedure using a Leco FP-428® instrument.

Microorganisms and inoculum preparation

T. viride 1 (Culture Collection of CINVESTAV, México), *T. viride* 2 (Culture Collection of UAM-Xochimilco Phytopathology, México), *T. harzianum* Rifai (Genetic Resource Center strain collection at the Science Institute BUAP Center of Agroecology, México), and *T. reesei* CDBB356 (Culture Collection of CINVESTAV, México) were cultivated in Petri dishes that contained potato-dextrose agar (PDA) and incubated for 7 days at 27°C. The spores were harvested and counted as described by Escamilla-Alvarado *et al.* (2013).

Solid fermentation and enzymatic activity

Substrates were milled to pass a 2.38 mm screen. Subsequently, a mixture of 80% each substrate and 20% wheat bran was assembled (3). Culture media were prepared by placing 3 g of each substrate (the mix of agro-industrial waste and wheat bran) separately in 250 ml Erlenmeyer flasks and then adding 12 ml sterile water. All culture media were autoclaved (121°C, 15 psi, 25 min) and inoculated with 1×10^6 conidia/g dry substrate (gds) for each strain tested (26). Cultures were incubated for 7 days. To obtain the crude enzymatic extracts (CEE), each flask was placed in an ice bath on top of a stirrer.

The flask contents were resuspended and filtered with medical gauze, centrifuged (4°C, 7740 g, 15 min), and the supernatants (CEE) were stored at 4°C until its use for enzymatic determinations (4).

Xylanase and cellulase activities were determined by reducing sugars release with 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) (21), using Birchwood xylan (0.5%; Sigma-Aldrich) and 1% carboxymethylcellulose (Sigma-Aldrich) in sodium citrate buffer (0.5 M, pH 5.3).

The reactions were performed as described by Loera and Córdova (2003), using xylose and glucose for a standard curve; readings were taken with a Cary spectrophotometer at 540 nm.

An enzyme unit (U) was defined as the amount of enzymatic extract that released 1 µmol of reduced sugars per min per gds (15). Protein concentrations of the extracts were assayed according to the Bradford method (7), using bovine serum albumin as a standard. All determinations were made in triplicate.

Statistical design

Results were analyzed as a completely randomized design with a 4 x 4 factorial arrangement, where the factors were *Trichoderma* strains and substrates.

Means were compared with the Scheffe test (30), and data was analyzed with JMP software (27).

RESULTS AND DISCUSSION

Table 1 presents the substrate chemical compositions. Lignocellulosic results showed a typical composition of high cell wall content and low protein from agricultural residues (1, 18), whereas CSW was similar to other restaurant wastes analyzed, with high water and protein content and usually low fiber content (14, 22).

An interaction between substrate and strain was detected for the enzyme activities (table 2, page 196; $P < 0.0001$). The highest cellulolytic activity was obtained with *T. reesei* grown in YS, CS, and SCB, while the lowest activity was for the two *T. viride* strains grown in most of the substrates. The cell wall composition in agro-industrial residues is usually high in cellulose and lignin (10, 33); lignin is the major factor in recalcitrance of cell walls to saccharification, particularly during enzymatic hydrolysis (10).

Table 1. Chemical composition (%) of the substrates used in solid-state fermentation.

Tabla 1. Composición química (%) de sustrato usado en fermentación sólida.

Item	CS	SCB	YS	CSW	Wheat bran
Dry matter	95.65 ± 0.15	97.66 ± 0.01	96.31 ± 0.39	26.8 ± 0.761	93.71 ± 1.22
Ash	7.12 ± 0.38	1.8 ± 0.025	2.35 ± 0.5	3.35 ± 0.160	5.38 ± 0.79
Crude protein	3.29 ± 0.20	-----	0.75 ± 0.01	15.35 ± 1.72	15.9 ± 0.3
NDF	79.66 ± 1.62	86.41 ± 6.11	67.5 ± 3.17	82.73 ± 1.86	53.39 ± 2.78
Hemicellulose	25.91 ± 0.92	17.2 ± 2.46	10.35 ± 0.65	16.99 ± 0.43	33.49 ± 1.38
ADF	53.75 ± 2.05	69.21 ± 3.86	57.15 ± 2.85	65.74 ± 1.52	19.90 ± 2.87

NDF: neutral detergent fiber; ADF: acid detergent fiber.

NDF: fibra detergente neutro; ADF: fibra detergente ácido.

Table 2. Comparison of enzymatic activities and crude extract protein content of four *Trichoderma* strains after fermentation with four substrates.**Tabla 2.** Comparación de las actividades enzimáticas y contenido de proteína del extracto crudo de cuatro cepas de *Trichoderma* después de la fermentación con cuatro sustratos.

Strain	Substrate	Activity		Protein, mg/ mL
		Cellulolytic, U/gds	Xylanolytic, U/gds	
<i>T. harzianum</i>	YS	36.09 ^{de}	385.01 ^b	0.263 ^{cde}
	SCB	71.49 ^{de}	358.56 ^{bc}	0.758 ^e
	CSW	48.81 ^{de}	306.03 ^c	0.384 ^{bcd}
	CS	94.95 ^{cd}	186.43 ^{de}	0.744 ^{ab}
<i>T. viride 1</i>	YS	33.18 ^{de}	132.53 ^{efg}	0.187 ^e
	SCB	39.10 ^{de}	65.83 ^{ghi}	0.156 ^e
	CSW	19.00 ^e	33.26 ⁱ	0.721 ^{abc}
	CS	71.50 ^{de}	329.67 ^{bc}	0.26 ^{de}
<i>T. viride 2</i>	YS	43.60 ^{de}	145.78 ^{def}	0.393 ^{bcd}
	SCB	63.35 ^{de}	91.56 ^{fghi}	0.278 ^{cde}
	CSW	31.79 ^{de}	43.05 ^{hi}	0.15 ^e
	CS	69.01 ^{de}	314.3 ^{bc}	1.12 ^a
<i>T. reesei</i>	YS	215.99 ^a	213.47 ^d	0.711 ^{abcd}
	SCB	191.74 ^{ab}	111.3 ^{fgh}	0.095 ^e
	CSW	134.78 ^{bc}	460.18 ^a	0.468 ^{bcd}
	CS	205.40 ^a	474.86 ^a	0.454 ^{bcd}
SEM		3.54	4.14	0.025
<i>P</i> -value interaction		0.0001	0.0001	0.0001
<i>P</i> -value strain		0.0001	0.0001	0.0008
<i>P</i> -value substrate		0.0001	0.0001	0.0001

Different letters within a row indicate significant differences ($P < 0.01$).

SEM: Standard error of the mean; gds: grams dry substrate; CSW: cafeteria solid waste.

Diferentes letras dentro de una fila indican diferencias significativas ($P < 0,01$).

SEM: error estándar de la media; gds: gramos de sustrato seco; CSW: residuos sólidos de cafetería.

The highest cellulolytic activity can be associated with cellulose content; for example, SCB contains at least 33% cellulose (33) and YS contains more than 40% (11). The cellulose content in CS is also high and varies from 35 to 42% (31).

The highest cellulolytic activities obtained from *T. reesei* (table 2) are similar to those reported by Vyas and Vyas (2005) for *T. viride* cultivated on

groundnut shell waste, higher or similar to values reported with *Trichoderma asperellum* grown on agricultural straws (wheat straw, rice bran, wheat bran, and corn cob). Some of the values were greater than 145 U/gds (9), higher than cellulolytic activities found in commercial products used for ruminants (20, 25).

The highest xylanolytic activities were detected in *T. harzianum* grown on YS and SCB and *T. reesei* cultured with CSW and CS. Both *T. viride* strains showed low xylanolytic activity; strain 2 activity was slightly higher than strain 1. SCB and CS are characterized by high hemicellulose content (30, 32); however, xylanolytic activity was higher when the fungus was grown with YS, even though this substrate has a lower hemicellulose content (table 1, page 195).

The complex cell wall structure may induce different types of enzymes simultaneously. Indeed, studies with enzymes and treatments indicate that xylan and lignin removal enhances cellulose availability (5). *T. reesei* strains can modify their enzymatic activity according to the sugar(s) present as carbon sources, as demonstrated by Dondelinger *et al.* (2016) using different combinations of lactose, glucose, xylose, and a hemicellulosic hydrolysate.

Sipos *et al.* (2010) compared xylanolytic activities in *T. reesei* Rut C30 using different carbon sources (Solka Floc 200, lactose, and steam-pre-treated CS); some sources of lactose and Solka Floc 200 resulted in low specific activities, whereas CS promoted the highest activity.

In addition to substrates, there are differences in strains; an enzymatic extract obtained by solid-state fermentation of peach palm waste by *Trichoderma stromaticum* had an activity of 1440 U/g (8).

The highest xylanase activities in the present study were in the same range as commercial enzymes used for ruminants, values that have spanned from 134 to 222 UI/g (25).

The interaction between substrate and strain can be explained because the cell wall composition is different when grown in each substrate. Therefore, fungi are stimulated for different metabolic pathways. Dondelinger *et al.* (2016) used various carbon sources (lactose, glucose, xylose, and hemicellulosic hydrolysate) with two *T. reesei* strains, and the enzymatic activities were as different as those observed in this study. Raghuwanshi *et al.* (2014) also showed that a mutant *T. asperellum* strain duplicated enzymatic activities compared with the wild strain. Enzyme production can be optimized by changing pH, wheat bran level, protein sources, substrate concentration, and other factors (9). Ortiz Robledo, *et al.* (2017) concluded that the cutting age of the substrates also influences its fermentative characteristics. This results confirmed that the *Trichoderma* strains evaluated, especially *T. reesei* CDBB356, generate competitive levels of xylanolytic and cellulolytic activities compared to previous reports and even the enzymatic activities reported for commercial products. Moreover, since *Trichoderma* species grow fast enough to prevent contamination in solid-state cultures and produce enzymes that can break down the complex cell wall (35), the strains investigated in this work can be used as reference for further investigations that focus on elaborate enzymatic products as ruminant feed supplements. In special applications, the addition of supplementary enzymes such as α -xylosidase, endo-arabinase, and pectinases enhances the ability to degrade *Trichoderma* extract lignocellulose, since these enzyme activities only occur at low levels in this fungus (6).

CONCLUSIONS

The *Trichoderma* strains used in this study showed versatility to produce fibrolytic enzymes in solid fermentation in all the evaluated substrates, with a marked variation in enzymatic profiles according to the combination of strain and type of substrate.

T. reesei CDBB356 stood out with the highest cellulolytic activity on CS and YS,

while the highest xylanolytic activity was obtained on CSW and CS. Considering the relative low cost of the substrates used and the fact that *Trichoderma* species grow fast enough to prevent contamination in solid-state cultures, there is a potential application of *T. reesei* CDBB356 enzymes on ruminant feed supplements to improve food digestibility.

REFERENCES

1. Aceves, O. J.; Ortega, C. M. E.; Mendoza, M. G.; Herrera, H. J.; Zetina, C. P.; Bárcena, G. R. 2014. Nutritional evaluation of wheat straw upgraded by *Pleurotus ostreatus* in growing lambs. *Anim Nutr Feed Technol.* 14: 593.
2. AOAC. 2012. Official Methods of Analysis. 17th ed. Arlington: Association of Official Analytical Chemists.
3. Arce-Cervantes, O.; Mendoza, G.; Miranda, L. A.; Meneses, M.; Loera, O. 2013. Efficiency of lignocellulolytic extracts from thermotolerant strain *Fomes* sp. EUM1: stability and digestibility of agricultural wastes. *J Agr Sci Technol.* 15: 229-40.
4. Arce-Cervantes, O.; Saucedo-García, M.; Leal-Lara, H.; Ramírez-Carrillo, R.; Cruz-Sosa, F.; Loera, O. 2015. Alternative supplements for *Agaricus bisporus* production and the response on lignocellulolytic enzymes. *Sci Hortic.* 192: 375-80.
5. Beauchemin, K. A.; Colombatto, D.; Morgavi, D. P.; Yang, W. Z. 2003. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. *J Anim Sci.* 81: 37-47.
6. Bischof, R. H.; Ramoni, J.; Seiboth, B. 2016. Cellulases and beyond: the first 70 years of the enzyme producer *Trichoderma reesei*. *Microb Cell Fact.* 15: 106.
7. 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: 248-54.
8. Carvalho, E. A.; dos Santos, Góes L. M.; Uetanabaro, A. P. T.; da Silva, E. G. P.; Rodrigues, L. B.; Pirovani, C. P.; da Costa, A. M. 2017. Thermoresistant xylanases from *Trichoderma stromaticum*: application in bread making and manufacturing xylo-oligosaccharides. *Food Chem.* 221: 1499-506.
9. Chakraborty, S.; Gupta, R.; Jain, K. K.; Kuhad, R. C. 2016. Cost-effective production of cellulose hydrolysing enzymes from *Trichoderma* sp. RCK65 under SSF and its evaluation in saccharification of cellulosic substrates. *Bioproc Biosyst Eng.* 39: 1659-70.
10. Chen, F.; Dixon, R. A. 2007. Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production. *Nat Biotechnol.* 25: 759-61.
11. Davis, S. C.; Dohleman, F. G.; Long, S. P. 2011. The global potential for *Agave* as a biofuel feedstock. *GCB Bioenergy.* 3: 68-78.
12. Dondelinger, E.; Aubry, N.; Ben. Chaabane, F. B.; Cohen, C.; Tayeb, J. 2016. Contrasted enzymatic cocktails reveal the importance of cellulases and hemicellulases activity ratios for the hydrolysis of cellulose in presence of xylans. *AMB Express.* 6: 24.
13. Escamilla-Alvarado, C.; Poggi-Varaldo, H. M.; Ponce-Noyola, M. T. 2013. Use of organic waste for the production of added-value holocellulases with *Cellulomonas flavigena* PR-22 and *Trichoderma reesei* MCG 80. *Waste Manag Res.* 31: 849-58.
14. García, A. J.; Esteban, M. B.; Márquez, M. C.; Ramos, P. 2005. Biodegradable municipal solid waste: characterization and potential use as animal feedstuffs. *Waste Manage.* 25: 780-7.

15. Hernández, P. A.; Bárcena, J. R.; Mendoza, G. D.; Montes, M. C.; González, S. S.; Rojo, R. 2011. Xylanase activity from *Cellulomonas flavigena* extracts as affected by temperature and its degradation under in vitro ruminal conditions. *Afr J Microbiol Res.* 5: 961-4.
16. Jiang, Y.; Wang, J. L.; Chen, J.; Mao, L. J.; Feng, X. X.; Zhang, C. L.; Lin, F. 2016. *Trichoderma* biodiversity of agricultural fields in East China reveals a gradient distribution of species. *PLoS One.* 11: 1-14.
17. Loera, O.; Córdova, J. 2003. Improvement of xylanase production by a parasexual cross between *Aspergillus niger* strains. *Braz Arch Biol Technol.* 46: 177-81.
18. Manríquez, O. M.; Montano, M. F.; Calderon, J. F.; Valdez, J. A.; Chirino, J. O.; Gonzalez, V. M.; Zinn, R. A. 20016. Influence of wheat straw pelletizing and inclusion rate in dry rolled or steam-flaked corn-based finishing diets on characteristics of digestion for feedlot cattle. *Asian-Australas J Anim Sci.* 29: 823-9.
19. Martinez, D.; Berka, R. M.; Henrissat, B.; Saloheimo, M.; Arvas, M.; Baker, S. E.; Chapman, J.; Chertkov, O.; Coutinho, P.; Cullen, D.; Danchin, E.; Grigoriev, I.; Harris, P.; Jackson, M.; Kubicek, C.; Han, C.; Ho, I.; Larrondo, L.; De Leon, A.; Magnuson, J.; Merino, S.; Misra, M.; Nelson, B.; Putnam, N.; Robbertse, B.; Salamov, A.; Schmoll, M.; Terry, A.; Thayer, N.; Westerholm-Parvinen, A.; Schoch, C.; Yao, J.; Barabote, R.; Nelson, M.; Detter, C.; Bruce, D.; Kuske, C.; Xie, G.; Richardson, P.; Rokhsar, D.; Lucas, S.; Rubin, E.; Dunn-Coleman, N.; Ward, M.; Brettin, T. S. 2008. Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). *Nat Biotech.* 26: 553-60.
20. Mendoza, G. D.; Loera-Corral, O.; Plata-Pérez, F. X.; Hernández-García, P. A.; Ramírez-Mella, M. R. 2014. Considerations on the use of exogenous fibrolitic enzymes to improve forage utilization. *Sci World J.* 2014: 247437.
21. Miller, G. L; 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem.* 31: 426-8.
22. Myer, R. O.; Brendemuhl, J. H.; Johnson, D. D. 1999. Evaluation of dehydrated restaurant food waste products as feedstuffs for finishing pigs. *J Anim Sci.* 77: 685-92.
23. Ortiz Robledo, F.; Reyes Estrada, O.; Carrete Carreón, F. O.; Sánchez Arroyo, F.; Herrera Torres, E.; Murillo Ortiz, M.; Rosales Serna, R. 2017. Nutritional and fermentative quality of maralfalfa (*Pennisetum* sp.) silages at different cutting ages and ground corn levels. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza. Argentina.* 49(2): 345-353.
24. Raghuvanshi, S.; Deswal, D.; Karp, M.; Kuhad, R. C. 2014. Bioprocessing of enhanced cellulase production from a mutant of *Trichoderma asperellum* RCK2011 and its application in hydrolysis of cellulose. *Fuel.* 124: 183-9.
25. Ramirez, L.; Aranda, E.; Mendoza, G.; Landois, L.; Miranda, L.; Crosby, M. 2005. Characterization of commercial fibrolitic products for ruminant diets. *Vet Méx.* 36: 1-9.
26. Sainos, E.; Díaz-Godínez, G.; Loera, O.; Montiel-González, A.; Sánchez, C. 2006. Growth of *Pleurotus ostreatus* on wheat straw and wheat-grain-based media: biochemical aspects and preparation of mushroom inoculum. *Appl Microbiol Biotechnol.* 72: 812-5.
27. Sall, J.; Lehman, A.; Stephens, M. L.; Creighton L. 2012. JMP start statistics: a guide to statistics and data analysis using JMP. SAS Institute.
28. Singh, R.; Kumar, M.; Mittal, A.; Mehta, P. K. 2016. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech.* 6: 174.
29. Sipos, B.; Benkő, Z.; Dienes, D.; Réczey, K.; Viikari, L.; Siika-aho, M. 2010. Characterisation of specific activities and hydrolytic properties of cell-wall-degrading enzymes produced by *Trichoderma reesei* Rut C30 on different carbon sources. *Appl Biochem Biotech.* 161: 347-64.
30. Steel, R. G. D.; Torrie, J. H.; Dickey, D. A. 1997. Principles and procedures of statistics: A Biological Approach. New York: McGraw-Hill.
31. Templeton, D. W.; Sluiter, A. D.; Hayward, T. K.; Hames, B. R.; Thomas, S. R. 2009. Assessing corn stover composition and sources of variability via NIRS. *Cellulose.* 16: 621-39.

32. Van Soest, P. J.; Robertson, J. B.; Lewis, B. A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci.* 74: 3583-97.
33. Vargas- Betancur, G. J.; Pereira, N. 2010. Sugar cane bagasse as feedstock for second generation ethanol production. Part I: diluted acid pretreatment optimization. *Electron. J Biotechnol.* 13: 1-9.
34. Vyas, A.; Vyas, D. 2005. Production of fungal cellulases by solid state bioprocessing of groundnut shell wastes. *J Sci Ind Res India.* 64: 767-70.
35. Zeilinger, S.; Gruber, S.; Bansal, R.; Mukherjee, P. K. 2016. Secondary metabolism in *Trichoderma*-Chemistry meets genomics. *Fungal Biol Rev.* 30: 74-90.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the University of Chapingo and Alltech in Mexico for providing substrate samples.

Multi-nutritional blocks for ruminants formulated with *Trichoderma reesei* to improve *in vitro* digestibility

Vicky García R,¹ M.Sc, Octavio Loera C,^{2*} Ph. D, María del Carmen Montes O,³ Ph. D, Germán David Mendoza M,¹ Ph. D.

¹ Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco, Doctorado en Ciencias Agropecuarias. Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, C.P. 04960 Alcaldía Coyoacán, CDMX, México.² Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Departamento de Biotecnología. Av. San Rafael Atlixco 186, Colonia Vicentina, C. P. 09340. Alcaldía Iztapalapa, CDMX, México.³ Instituto Politécnico Nacional, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, CP 07300, CDMX, México.

*Correspondencia: loera@xanum.uam.mx; móvil: +52(55)59094744

ABSTRACT

Objective. To determine the effect of incorporating *Trichoderma reesei* and its culture substrate into a multi-nutritional block for ruminants after 7 and 49 days of storage. **Materials and methods.** Multi-nutritional blocks that included *T. reesei* and its culture substrate were manufactured and assessed using in vitro batch culture to measure kinetic degradation parameters including gas production and dry matter digestibility (IVDMD). The study was conducted as a completely randomized block (2 runs) design with factorial arrangement of treatments; 2 levels of enzyme (with and without) x 2 block storage times (7 and 49 days) x 5 block percentages (100, 60, 40, 20, and 100). **Results.** There was an increase on IVDMD ($P < 0.0001$) when *T. reesei* and its culture substrate (corn stover) were incorporated (61.6 vs. 58.6%), with no interactions between the evaluated factors. The IVDMD declined linearly as the block proportion increased in both treatments; alfalfa with *T. reesei* and its culture

substrate (IVDMD, % = $-0.0853X + 63.687$; $R^2 = 0.787$, $P < 0.05$) and control corn stover (IVDMD, % = $0.0549X + 64.882$. $R^2 = 0.77$, $P < 0.05$), where X was the percentage of block. The parameters of gas production kinetics and IVDMD were greater in the blocks that had the longest storage time (49 days). **Conclusions.** The addition of *T. reesei* to a multi-nutritional block improved the *in vitro* digestibility. The incorporation of *T. reesei* to the multi-nutritional blocks retained its positive effect for 49 days.

Key words: Enzymatic activity, *in vitro* digestibility, forage, filamentous fungi (Sources: AGROVOC, MeSH).

Introduction

Exogenous fibrolytic enzymes potentially increase rumen degradability of feed and thereby improve their nutritional value (1,2). However, responses in ruminants have been variable depending upon the source and dose of enzyme, diet composition, and rumen pH (3). Furthermore, purified enzymes are costly, thus cost-benefit analysis does not often support their use in ruminant diets given their variable responses. Because the primary use of most commercial enzymes is in food and textile production (4,5), the products are purified and stabilized, which adds to their cost of production. One way to reduce enzyme costs for ruminant applications could be local production (6) and use of crude non-purified enzyme preparations. We hypothesized that adding the source organism together with its fermentation culture to a multi-nutritional block would avoid the extraction and purification step used in enzyme production while improving fibre digestibility.

Therefore, the objective of this work was to evaluate the effect of incorporating different percentages of a block containing *Trichoderma reesei* and its culture medium to a forage based diet for ruminants by assessing the effects on batch culture *in vitro* gas production and dry matter (DM) degradability. *T. reesei* was used in the study because it is an approved

source organism acceptable for use in ruminant feed and is frequently used to produce commercial enzymes (5). There is no information about the effect of storage time of a multinutritional-block containing a fibrolytic microorganism as *Trichoderma* so the storage time of the block (7 and 49 days) it was also evaluated.

Materials and methods

Overview of the experiment

A batch culture *in vitro* study was performed to evaluate the effect of adding increasing percentages of a multi-nutritional block containing *T. reesei* and its culture medium to an alfalfa diet for ruminants. *In vitro* gas production and digestibility were assessed. The study was conducted as a completely randomized block (2 runs) design with factorial arrangement of treatments; 2 levels of enzyme (with and without) x 2 block storage times (7 and 49 days) x 5 block percentages (100, 60, 40, 20, and 100). **Growth and preparation of the microorganism**

The strain used in this experiment was *T. reesei* CDBB356 (CINVESTAV Crop Collection, Mexico), which was obtained from solid-state fermentation using a substrate of 80% corn stover and 20% wheat bran. The incubation was maintained at 35°C for 7 days.

Cellulolytic activity was assessed using medium-viscosity carboxymethylcellulose substrate (1% in 0.5 M sodium citrate buffer, pH 6.0). Activity was 205.40 ± 3.54 U/grams of dry substrate ($\mu\text{mol glu/min grams of dry substrate (gds)}$). Xylanolytic activity using birchwood xylan (0.5%, Sigma- Aldrich) was 474.86 ± 4.14 U/gds ($\mu\text{mol xil/min gds}$) based on measurements from a previous study (7).

Preparation and storage of blocks

The multi-nutritional blocks were made manually by mixing and compacting the ingredients (Table 1) into a 250 ml plastic bottle with 10 cm diameter, ensuring that corn stover was the last ingredient added, that way the result of the fermentation won't have a reaction with the other ingredients. Control (corn stover) and treatment blocks (corn stover obtained from solid-state fermentation with *T. reesei* CDBB356) were prepared and left to dry in a ventilated room maintained at 20°C. Two batches of each multi-nutritional block were prepared, one was left for 7 days before its use, and the other one for 49 days, after this time and before the *in vitro* batch culture, the blocks were dried (55°C, 48 h) and ground to a particle size of 2 mm using a Wiley Mill.

Batch culture *in-vitro* fermentation.

The samples used to perform the *in-vitro* fermentation consisted in 0.5 g of different percentages of dried and grounded alfalfa: multinutritional- block (20:80, 40:60, 60:40, 80:20, and 100:0), this samples were weighed and added into 125 mL glass bottles, then, 90 mL of a mixture of ruminal liquid and buffer solution were poured on it under constant CO₂ flow. Each treatment was performed in triplicate.

The ruminal liquid was collected before feeding from two sheep fed a diet consisting of (DM basis) 70% alfalfa and 30% concentrate. Then it was filtered through four layers of cheese cloth and mixed in a proportion of 9:1 (v:v) with buffer solution. The buffer was prepared according to Osorio-Teran et al. 2017, (8) as follows: (mineral solution I. K₂HPO₄ 6 g/L; mineral solution II. KH₂PO₄ (6 g/L), (NH₄)₂SO₄ (6 g/L), NaCl (12 g/L), MgSO₄ (2.45 g/L), CaCl₂ (1.6 g/L), Na₂SO₄, L-cysteine and one drop of rezarsurin. The bottles were then sealed with a rubber stopper and incubated at 39 °C.

The *in- vitro* gas production technique was performed according to Menke and Steingass,1988 (9).The gas pressure produced in the headspace of the vials was recorded

at 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20, 24, 30, 36, 42, 48, 60 and 72 h using a manual pressure gauge (scale 0-1 kg/cm²). The readings were transformed to gas volume with the linear equation of Ørskov and McDonald (10), $\text{Volume} = \text{pressure (Kg/cm}^2) / 0.019$ ($R^2 = 0.988$). The gas production kinetic variables including maximum volume of gas produced (V_{max}) and gas production rate (S), were obtained using the Pitt et al. (1999) logistics model (11).

IVDMD evaluation. After 48 h of incubation, the content of each bottle was filtered through filter paper (Waltham No. 41), rinsed to ensure the recovery and dried at 55°C in a forced air stove for 48 h to determine *in vitro* DM digestibility (IVDMD).

Statistical analysis. The statistical analysis of each parameter was performed using the PROC GLM using a completely randomized model ($Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + C_k + AB_{ij} + AC_{ik} + BC_{jk} + ABC_{ijk} + \epsilon_{ijk}$) that included A= %multinutritional block, B= addition of *Trichoderma* and its culture medium, C= storage time, the interactions and the experimental error (ϵ). Main effects of 2 levels of enzyme (with and without) x 2 block storage times (7 and 49 days) x 5 alfalfa:block percentages (100:20, 60:40, 40:60, 20:80, and 0:100). The differences between means were compared using a Tukey test and a p -value of 0.05. The linear effect of block:alfalfa hay, within block type, was determined using regression. The data were analysed with JMP software (12)

Results

There were no interactions between the factors. An increase of approximately three percentage points ($p < 0.001$) was observed in the IVDMD of substrate containing *T. reesei* and its culture substrate, compared to control (Table 2). However, there were no differences ($p < 0.05$) in gas production kinetic parameters.

There was an effect of substrate (alfalfa:block percentage on IVDMD, $p = 0.05$). Linear regression equations that describe the relationship between substrate on IVDMD for control

and enzyme substrates are shown in Figure 1. It was observed that as the percentage of multi-nutritional block was decreased, the IVDMD linearly decreased ($p < 0.05$), with greater slope of decline for control blocks. As shown in Table 3 increasing the storage time from 7 to 49 days increased the gas production kinetics and IVDMD parameters ($p \leq 0.006$).

Discussion

The increase on IVDMD on blocks with *T. reesei* and its culture substrate, was because it contained fibrolytic enzymes that acted on the bonds of the cell walls of the potentially fermentable fibre (7), making it more available for ruminal microorganisms, increasing the chemotactic response similar to that of primary colonizers release from substrates hydrolysis products, enabling the bacterial colonization of feed particles (13, 14). The culture of *T. reesei* with corn stover also could provide enzymes attached to the cell wall of the fungus that it excreted during its cultivation (15, 16) and the β -glucosidase-attached to the mycelium along with other cellulolytic enzymes contributed to the substrate degradation (17). The lack of response in gas production parameters when adding *T. reesei* and its culture substrate, but in DIVMS leads to the assumption that the greatest amount of carbon released from degradation was metabolized to generate microbial biomass (18, 19), enzymes produced as a result of fermentation of *T. reesei* may have led to a change in the densities of a certain group of bacteria (20).

Considering that associative effects are detected as a nonlinear response when combining two substrates (21), these were not found when mixing the blocks to alfalfa (Figure 1), and DIVMS was decreased because the digestibility of the block is less than that of alfalfa (substitute effect). Different studies have shown that adding fibrolytic exogenous enzymes to forage diets can improve the digestibility of fibre (1,22). The results of this study show that the action of *T. reesei* fibrolytic enzymes had an effect from 7 days after being added to the multi-nutritional block and even the response improved by 3.68 percentage units after 49

days (table 3), which it can be explained by physical changes in the block when dehydrated, in addition to the intrinsic stability of enzymes produced by *T. reesei*. Changes in internal equilibrium humidity have been reported after the multi-nutritional blocks (23) are being developed, conditions within 49 days are likely to have been favourable for better activity of fibrolytic enzymes. Gandarilla et al (24) isolated fungi of the genus *Aspergillus* from multi-nutritional blocks at 45 days of storage, concluding that these microorganisms could positively influence the digestibility of the substrate used in fermentations. The effectiveness of enzymes over time has been verified in other studies, Gutierrez et al (25) reported that the effect of *Bacillus licheniformis* and *Aspergillus niger* enzymes, did not affect after being sprayed for up to 30 days before incubation. Beauchemin et al (5), assessed the effect of the temperature and pH of two commercial enzymes for the use of corn forage silage additives in storage for 120 days, concluding that storage time is not a factor influencing the digestibility of forages.

In conclusion, the addition of *T. reesei* with its culture substrate in a multi-nutritional block improves *in vitro* digestibility. The positive effect of incorporating *T. reesei* with its growing substrate to the blocks, remained until 49 days.

Acknowledgments

To the national council of science and technology (CONACYT) and the doctoral program in agricultural sciences of the Autonomous Metropolitan University, Xochimilco unit.

References

1. He ZX, Yang LY, Yang WZ, Beauchemin KA, Tang SX, Huang JY, *et al*. Efficacy of exogenous xylanases for improving *in vitro* fermentation of forages. J Agric Sci. 2014;153(3):538–53. Doi.10.1017/S0021859614000860

2. Díaz A, Ranilla MJ, Giraldo LA, Tejido ML, Carro MD. Treatment of tropical forages with exogenous fibrolytic enzymes: effects on chemical composition and *in vitro* rumen fermentation. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 2014; 99(2):345–55. Doi: 10.1111/jpn.12175
3. Gameda B, Hassen A, Odongo N. Effect of fibrolytic enzyme products at different levels on *in vitro* ruminal fermentation of low-quality feeds and total mixed ration. *J. Anim. Plant Sci.* 2014, 24(5):1293-1302
4. Aboagye I, Lynch P, Church J, Baah J, Beauchemin K. Digestibility and growth performance of sheep fed alfalfa hay treated with fibrolytic enzymes and a ferulic acid esterase producing bacterial additive. *Anim Feed Sci and Tech*, 2015; 203: 53-66.
5. Beauchemin K, Colombatto D, Morgavi D, Yang W. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. *J Anim Sci.* 2003, 81(14 suppl 2): 37-47.
6. Kovács K, Szakacs G, Zacchi G. Comparative enzymatic hydrolysis of pretreated spruce by supernatants, whole fermentation broths and washed mycelia of *Trichoderma reesei* and *Trichoderma atroviride*. *Bioresource Technol.* 2009;100(3):1350–7. Doi: 10.1016/j.biortech.2008.08.006
7. García R, Loera C, Montes H, Mendoza G. *Trichoderma reesei* stands out among other strains for its fibrolytic capacity. *Rev Fac Uncuyo*; 2019.
8. Osorio-Teran, Amada Isabel, et al. "Effect of calcium propionate and monensin on *in vitro* digestibility and gas production." *Revista Brasileira de Zootecnia* 46.4 (2017): 348-353.
9. Menke, K. H., and Steingass, H. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Animal Research Development Journal* 27: 7–55.

10. Orskov ER, McDonald I. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *J. Agric. Sci.* 1979; 92:499–503. Doi: 10.1017/S0021859600063048
11. Pitt RE, Cross TL, Pell AN, Schofield P, Doane PH. Use of *in vitro* gas production models in ruminal kinetics. *Math. Biosci. an Int. J.* 1999; 159:145–63. Doi: 10.1016/S0025-5564(99)00020-6
12. Sall J, Lehman A, Stephens ML, Creighton L. *JMP start statistics: a guide to statistics and data analysis using JMP*. SAS Institute; 2012.
13. Togtokhbayar N, Cerrillo MA, Rodriguez GB, Elghandour MY, Salem AZM, Urankhaich C, et al. Effect of exogenous xylanase on rumen *in vitro* gas production and degradability of wheat straw. *Anim Sci J.* 2015;86(8):765–71. Doi: 10.1111/asj.12364
14. Rehman AU, Nisa MU, Shazad A, Sarwar M, Khan OA, Sharif M. Chemical composition and digestion kinetics of urea-molasses treated wheat straw ensiled with fibrolytic enzyme in ruminally cannulated buffalo bulls. *J. Anim. Plant Sci.* 2013. 24: 36-39.
15. Druzhinina IS, Kubicek CP. Genetic engineering of *Trichoderma reesei* cellulases and their production. *Microb Biotechnol* 2017;10(6):1485–99.
16. Antonov E, Schlembach I, Regestein L, Rosenbaum MA, Büchs J. Process relevant screening of cellulolytic organisms for consolidated bioprocessing. *Biotechnol Biofuels.* 2017; 10:106 Doi:10.1186/s13068-017-0790-4
17. Ellilä S, Fonseca L, Uchima C, Cota J, Goldman GH, Saloheimo M, et al. Development of a low-cost cellulase production process using *Trichoderma reesei* for Brazilian biorefineries. *Biotechnol Biofuels.* 2017; 10:30. Doi:10.1186/s13068-017-0717-0

18. Morsy TA, Kholif AE, Kholif SM, Kholif AM, Sun X, Salem AZM. Effects of two enzyme feed additives on digestion and milk production in lactating Egyptian buffaloes. *Ann Anim Sci* 2016; 16:209–22. Doi: 10.1515/aoas-2015-0039
19. Thien N, Giang T, Wanapat M, Phesatcha K, Kang S. Level of *Leucaena leucocephala* silage feeding on intake, rumen fermentation, and nutrient digestibility in dairy steers. *Trop Anim Health Prod.* 2016;1057–64.
20. Chung YH, Zhou M, Holtshausen L, Alexander TW, McAllister TA, Guan LL, *et al.* A fibrolytic enzyme additive for lactating Holstein cow diets: Ruminal fermentation, rumen microbial populations, and enteric methane emissions. *J. Dairy Sci.* 2012; 95:1419–27.
21. Niderkorn V, Baumont R. Associative effects between forages on feed intake and digestion in ruminants. *Animal.* 2009;(3)7: 951-960. Doi: 10.1017/S1751731109004261
22. Gandra JR, Miranda GA, Goes RHTB, Takiya CS, Del Valle TA, Oliveira ER, *et al.* Fibrolytic enzyme supplementation through ruminal bolus on eating behavior, nutrient digestibility and ruminal fermentation in Jersey heifers fed either corn silage- or sugarcane silage-based diets. *Anim Feed Sci Technol.* 2017. 231:29-37 Doi: S0377840116310665
23. Birbe B, Herrera P, Colmenares O, Martínez, N. El consumo como variable en el uso de bloques multinutricionales. X Seminario de Pastos y Forrajes.2006, p. 43-61.
24. Gandarilla B, Fernandez A, Pedraza R. Influencia del tiempo de almacenamiento sobre las características microbiológicas y químicas de tres variantes de bloques multinutricionales. *Rev Prod Anim.* 1991;6(3):241–7.
25. Gutierrez C, Mendoza G, Pinos-rodríguez J, Ricalde R, Aranda E, Miranda L. Effect of storage time and processing temperature of grains with added amylolytic enzymes on In situ ruminal starch digestion. *J Appl Anim Res.* 2005;(27):39–44.

Table 1. Multi-nutritional block formulation

Ingredient	%
Corn stover*	25
Cane molasses	15
Soybean paste	8
Corn	8
Calcium propionate	6
Glycerol	5
Cement	5
Calcium oxide	5
Urea	4
Mineral premix ^a	3
Optimentionin ^b	3
Optilisin ^c	3
Phosphoric acid	3
Sodium sulfate	2
Biocolin ^d	2
Magnesium sulfate	1
Peptasan ^b	1
BHT Antioxidant	1

^aCommercial mineral salt, Vitasal fatten ovinosplus ®

^bCommercial metionin Nuproxa ®, ^cLisin, ^dColin, ^dherbal mix

* With or without the product of fermentation of corn stover with *T. reesei*

Table 2. Main effect of the addition of a multi-nutritional block with *T. reesei* and its culture substrate (Enzyme) compared with multi-nutritional block with corn stover alone (Control), on the kinetics of *in-vitro* gas production and *in vitro* DM digestibility

Variable	Enzyme	Control	SEM	<i>p</i> -value
Maximum volume, mL g ⁻¹ DM	213.3	212.7	10.94	0.84

Gas production rate, h ⁻¹	0.034	0.033	0.0023	0.084
<i>In vitro</i> DM digestibility, %	61.6	58.5	3.63	0.001

DM: dry matter, SEM: standard error of the mean

Figure 1. Effect of the percentage of block incorporation with (▲) corn stover with its culture substrate and (■) corn stover, on *in vitro* dry matter digestibility

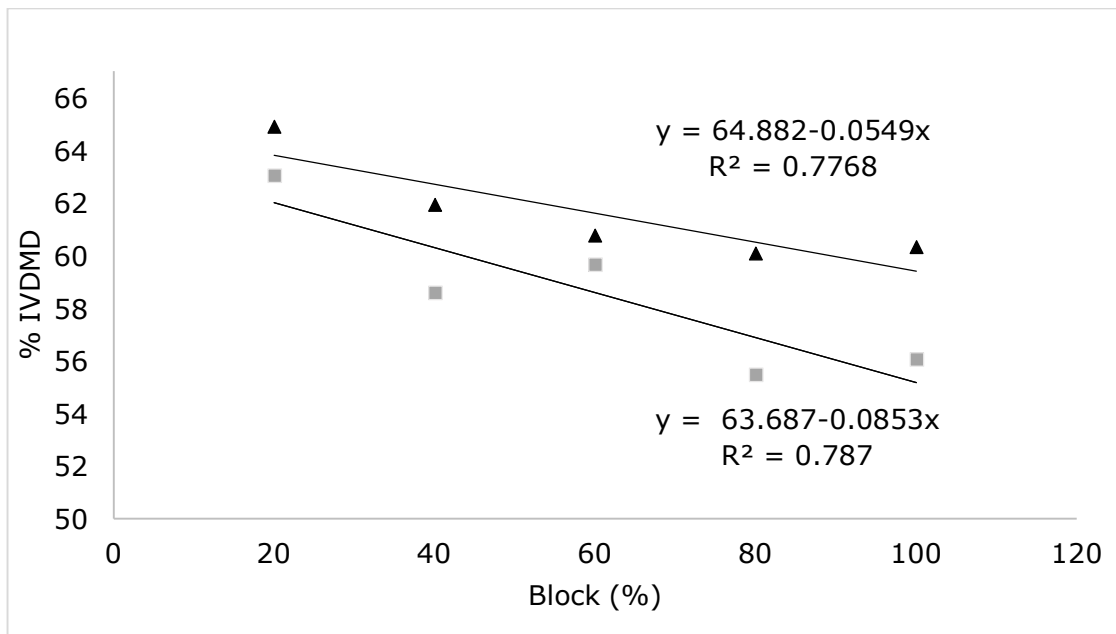


Table 3. Main effects of storage time of multi-nutritional blocks with *T. reesei* and its culture substrate on gas production kinetics and *in vitro* dry matter digestibility

Variable	Storage time		SEM	P-value
	7 d	49 d		
Volume, mL g ⁻¹ DM	208	217	10.9	0.047
Gas production rate, h ⁻¹	0.033	0.035	0.0023	0.005
<i>in vitro</i> , dry matter digestibility%	59.7	63.4	3.63	0.006

DM: Dry matter, h: hours, SEM: Standard error of the mean