

## Utilización de un aislado de *Trichoderma* sp. para la fermentación de residuos de papas (*Solanum tuberosum* L.) y harina de girasol (*Helianthus annuus* L.) en procesos de ensilaje

Vicente Parlione Arrayago, Lenis Matute Almeida\* y Hazel Román Rojas

Laboratorio de Biotecnología Agroindustrial, Instituto de Química y Tecnología, Facultad de Agronomía. Maracay. Universidad Central de Venezuela. Apto postal 4579. Maracay 2101A- Venezuela

### RESUMEN

Entre los residuos agroindustriales con mayor volumen de generación, se encuentran la harina de girasol (*Helianthus annuus* L.) y los residuos de papa (*Solanum tuberosum* L.). Debido a la composición y disponibilidad de estos materiales, se estudió su empleo como sustrato en procesos de ensilaje inoculados con *Trichoderma* sp., a fin de ofrecer una alternativa en la dieta del ganado bovino. El estudio se llevó a cabo bajo un diseño completamente aleatorizado, con 5 tratamientos y 4 repeticiones, variando las proporciones de las harinas de girasol (HG) y de residuos de papas (HP) a saber: (T1: HP, T2: 75% HP-25% HG, T3: 50% de cada harina, T4: 25% HP-75% HG y T5: HG), en las mezclas para ensilaje e inoculando las mismas con un aislado de *Trichoderma* sp. Los resultados demostraron que el tratamiento con 75% de HP y 25% de HG y un día de fermentación, identificado como T2D1, es un ensilaje de calidad, con las fracciones recomendadas para la alimentación de bovinos ( $P < 0,05$ ): 8,4% de proteína; 2,9% de cenizas; 4,3% de grasa; 42,22% de FDN; 14,85% de FDA y 0,5% de humedad. Asimismo, se determinó que este tratamiento presentó las mayores actividades en alfa-amilasas (19,1 UA/mL,  $P < 0,05$ ) y en beta-1,4-endoglucanasas (27,2 UI/mL,  $P < 0,05$ ). Mientras que la actividad de las xilanasas desarrollada en T2 con un día de ensilado (303,4 BXU) no se diferenció significativamente de la mayor actividad en esta enzima determinada en este estudio. Con base en estos resultados, puede considerarse a T2 con 24 horas de ensilaje, como una alternativa viable para complementar la alimentación del ganado bovino.

**Palabras clave:** amilasas, endoglucanasas, xilanasas, fermentación, bovinos

Use of an isolated of *Trichoderma* sp. for fermentation of potato waste (*Solanum tuberosum* L.) and sunflower meal (*Helianthus annuus* L.) on silage processes

### ABSTRACT

Among the agroindustrial wastes, sunflower flour (*Helianthus annuus* L.) and potato (*Solanum tuberosum* L.), waste generate the greatest volume. Due to the composition and availability of these materials, their use as substrate in silage processes inoculated with *Trichoderma* sp. was studied, to provide an alternative in the cattle diet. A completely randomized design with 5 treatments and 4 repetitions was used, varying the proportions of sunflower meal (HG) and potato waste (HP): (T1: HP, T2: 75% HP-25% HG, T3: 50% T4: 25% HP-75% HG y T5: HG), in the mixtures for silage and inoculating the same with an isolated of *Trichoderma* sp. The results demonstrated that the treatment with 75% of HP and 25% of HG and a day of fermentation, identified as T2D1, is a quality silage, with the fractions recommended for the feeding of bovines ( $P < 0,05$ ): 8.4% protein; 2.9% ash; 4.3% fat; 42.22% NDF; 14.85% ADF and 0.5% moisture. Also, it was determined that this treatment presented the highest activities in alpha-amylases (19.1 UA/mL,  $P < 0,05$ ) and beta-1,4-endoglucanases (27.2 UI/mL,  $P < 0,05$ ). While the activity of the xylanases developed in T2 with a day of ensiling (303.4 BXU) was not significantly different from the highest activity in this enzyme determined in this study. Based on these results, it can be considered T2 with 24 hours of silage, as a viable alternative to complement the feeding of the bovine.

\*Autor de correspondencia: Lenis Matute

E-mail: lenismat@gmail.com

HG) in mixtures for silage with *Trichoderma* sp. inoculation. The results showed that treatment with 75% HP, 25% of HG and one day fermentation, identified as T2D1, is a quality silage recommended for feeding cattle ( $P < 0.05$ ): 8,4% protein; 2.9% different ash; 4.3% fat; 42.22% NDF; 14.85% of ADF and 0.5% moisture. Also, it was determined that this treatment had the highest activities of alpha-amylase (19.1 AU/mL,  $P < 0.05$ ) and beta-1,4-endoglucanase (27.2 IU/mL,  $P < 0, 05$ ). While xylanase activity that developed in T2 with one day of silage (303.4 BXU) did not differed significantly from the higher activity of this enzyme. Based on these results, it can be considered that T2 with 24 hours of silage is an alternative viable for supplementation of cattle feed

**Key words:** amylase, endoglucanase, xylanase, fermentation, cattle

## INTRODUCCIÓN

La generación de residuos orgánicos provenientes de la agroindustria se ha incrementado en los últimos años, debido a la creciente demanda mundial de alimentos. En Venezuela, destaca el uso de la papa (*Solanum tuberosum* L.) como materia prima en la industria de los *snacks*, en donde se generan unas 39000 t de desechos anuales (Quemba et al., 2009; Morocoima et al., 2013; Fedegro, 2014); así como, la harina de girasol (*Heliantus annuus* L.) derivada de la extracción del aceite de su semilla, con una producción estimada de 5000 t anuales (FAO, 2010; Fedegro 2014). Por su composición, estos subproductos, son considerados fuentes alternativas de energía y proteínas (Soares et al., 2006; FAO, 2008; Jabbar et al., 2008; Betancourt et al., 2012), por lo que el empleo de la biotecnología en procesos como el ensilaje, posibilita transformarlos en productos de alto valor agregado que al incorporarlos en la dieta del ganado vacuno, permitan mejorar el rendimiento, tanto en volumen y calidad de la leche, peso y calidad de la carne, así como en la disminución de los costes de producción (Diorio et al., 2003; Orzua et al., 2009; Nuruddin et al., 2011; Garcés et al., 2004; FAO, 2013). Por ello, este trabajo tuvo como propósito emplear *Trichoderma* sp., conocido productor de enzimas celulolíticas y biocontrolador para la fermentación de harina de residuos de papa y de girasol en procesos de ensilaje.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Diseño experimental

En este trabajo, se utilizó un diseño completamente aleatorizado en el que se evaluaron cinco tratamientos con cuatro repeticiones. Los tratamientos fueron identificados como: T1 (solo harina de residuos de papas (HP)), T2 (75% HP y 25% harina de girasol (HG)), T3 (50% de cada harina), T4 (25% HP y 75% HG) y T5 (100% HG).

### Microorganismo

Se utilizó un aislado de *Trichoderma* sp., obtenido de una muestra de suelo y perteneciente al cepario del Laboratorio de Biotecnología Agroindustrial del Instituto de Química y Tecnología de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela. Dicho aislado fue cultivado en cuñas de agar papa dextrosa (PDA) y conservado bajo refrigeración a 4 °C (Gómez, 2012).

### Precultivo

Se emplearon 10 g de harina de girasol/L de medio Czapek, cuya composición por litro de agua destilada fue de: 0,5 g de KCl; 0,01 g de  $\text{FeSO}_4$ ; 2 g de  $\text{NaNO}_3$ ; 1 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  y 0,5 g de  $\text{MgSO}_4$ ; ajustándose el pH de esta solución salina a un valor de 5 (Hanna 8417 Instruments®, México). El proceso fermentativo fue llevado a cabo en matraces de 500 mL de capacidad, esterilizados a 121 °C durante 15 minutos y fue inoculado, a temperatura ambiente, con esporas de *Trichoderma* sp., a razón de  $1 \times 10^6$  esporas/mL (Gómez, 2012), contabilizada a través de la cámara de Neubauer (French y Herbert, 1980). Este precultivo se mantuvo en incubación a 38 °C por 72 horas y 300 rpm de agitación constante (Gómez, 2012).

### Ensilaje

El proceso de ensilaje se llevó a cabo bajo la metodología de los microsilos (Bodega, 2010), empleando como sustrato fermentable, la harina resultante del secado y la molienda de los desechos de papas y harina de girasol (ambos materiales fueron obtenidos en el comercio local). Los microsilos estaban compuestos por 500 g de estos sustratos, los cuales fueron inoculados con el precultivo e incubados durante 5 días a 38 °C en condiciones de anaerobiosis. Asimismo, se tomaron muestras de los tratamientos ensilados cada 24 horas, comenzando el día 0 (inoculación) y finalizando el día 5 del cultivo, para efectuar los análisis bromatológicos y enzimáticos.

## Análisis bromatológicos

Los materiales empleados como sustratos y los tratamientos ensilados fueron analizados para conocer su composición bromatológica, en cuanto a: humedad, proteína bruta, cenizas y grasa (Covenin, 1983). Además, se determinaron los contenidos de fibra cruda por el método de Weendel (Hart y Fisher, 1991), fibra detergente neutra (FDN) y de fibra detergente ácida (FDA) por el método de Van Soest (Van Soest y Wine, 1967).

## Actividades enzimáticas

Se determinaron las actividades de las enzimas alfa-amilasas y beta-1,4 endoglucanasas, desarrollada en los tratamientos ensilados, de acuerdo con la metodología descrita por Olmos, (1987). Así como, la actividad de las xilanasas (Bailey *et al.*, 1991). Adicionalmente, se monitorizaron los valores de pH (Olmos, 1987), la concentración de la proteína soluble (Lowry *et al.*, 1951) expresada en mg de proteína/mL, y el contenido de nitrógeno amínico, de acuerdo con el método de Sørensen (Rodríguez y Martín, 1980).

## Actividad alfa-amilasas

La actividad de la alfa-amilasa se efectuó de acuerdo con el método empleado por Olmos, 1987, utilizando una solución con 0,5 mL de una *buffer* de cloruro-acetato 0,15 M a pH 5 y 0,5 mL de una disolución con almidón al 0,1%, a la cual se adicionó 10  $\mu$ L de extracto enzimático (muestra), incubándose durante 8 min a 37 °C. La reacción fue detenida con 4,5 mL de una solución  $I_2$ /IK. La absorbancia se midió a una longitud de onda de 580 nm, expresando la actividad de la alfa-amilasa en Unidades Amilolíticas por mililitro (UA/mL), las cuales se definen como la capacidad de hidrolizar 0,1 mg de almidón.

## Actividad beta-1,4-endoglucanasas

Se determinó la actividad de la enzima beta-1,4-endoglucanasa (celulasa) utilizando el método espectrofotométrico reportado por Olmos (1987), en el que a 1 mL de una solución de carboximetilcelulosa al 1% en *buffer* citrato-fosfato 0,05 M a pH 4,8 se le adicionó 1 mL de extracto enzimático (muestra) y se incubó, muestra y testigo (sin caldo enzimático), durante 30 min a 50 °C. La reacción fue detenida con 1 mL de ácido 3,5-dinitro-salicílico (DNS) (Miller, 1959). Luego de enfriar los tubos, se incorporaron 8

mL de agua destilada y se midió la absorbancia de los azúcares reductores liberados a una longitud de onda de 575 nm. La actividad celulolítica se expresó en Unidades Internacionales por mililitro (UI/mL), las cuales se definen como la cantidad de enzima que es capaz de liberar 1 micromol de glucosa por minuto por cada mililitro de extracto enzimático

## Actividad de las xilanasas

En el análisis de la actividad xilanásica se empleó una solución xilano *buffer* citrato a pH 5,3; luego se incubó a 50 °C durante 30 minutos y seguidamente se efectuó la determinación de azúcares por el método de DNS (Miller, 1959). Luego de enfriar los tubos, se incorporaron 8 mL de agua destilada y se midió la absorbancia de los azúcares reductores liberados a una longitud de onda de 540 nm. Finalmente, la actividad enzimática se expresó en unidades (BXU), las cuales expresan la cantidad de nanomoles de xilosa liberada por unidad de tiempo por mililitro de muestra (Bailey *et al.*, 1991).

## Análisis estadístico

Los resultados de las diferentes pruebas fueron sometidos a un análisis de varianza (ANAVAR) para determinar si las proporciones de los sustratos empleados en los ensilajes influyeron sobre la actividad enzimática. Asimismo, se aplicó la prueba de medias de las mínimas diferencias significativas de Fisher a un nivel de confianza del 95 %, para conocer la existencia de diferencias entre los tratamientos en el transcurso del tiempo de fermentación, en cuanto a las actividades enzimáticas y en la composición bromatológica de los mismos (Montgomery, 2005). Para el procesamiento de la data se empleó el programa de computación IBM® SPSS® Statistics 20.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

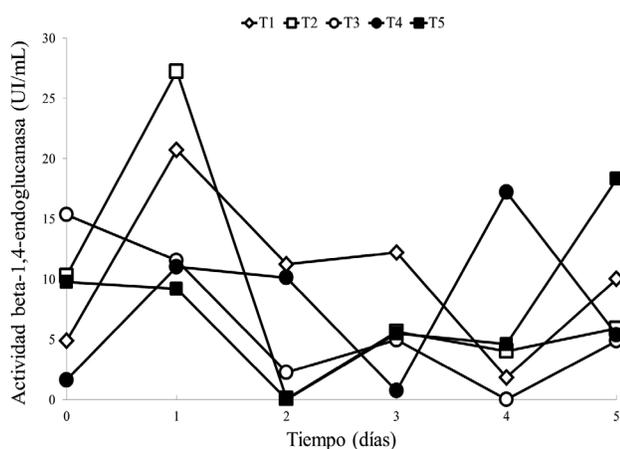
### Estudio de la actividad enzimática en los tratamientos ensilados

El análisis de la varianza (ANAVAR) aplicado a la data recolectada, demostró que las proporciones de los sustratos empleados en los tratamientos estudiados no influyeron significativamente sobre la inducción de las actividades enzimáticas de las alfa-amilasas y las xilanasas ( $p > 0,05$ ); por el contrario, la composición de estos tratamientos, si afectó significativamente la actividad de la enzima beta-1,4-endoglucanasa ( $p < 0,05$ ).

Asimismo, la prueba de las mínimas diferencias significativas de Fisher determinó, que el tiempo de ensilaje influyó significativamente sobre la actividad enzimática de la beta-1,4-endoglucanasa desarrollada en los tratamientos estudiados durante los 5 días de fermentación, destacando las 27,2 UI/mL registradas para T2 al primer día de incubación ( $p < 0,05$ ). (Figura 1).

Este resultado fue superior a las 0,38 UI/mL señaladas por Colina *et al.* (2009) al fermentar en sumergido paja de arroz, y las 0,178 UI/mL obtenidas por Manjarrés *et al.* (2011) con la fermentación en sólido de residuos de palma. La diferencia entre los resultados de este trabajo, y los publicados por los autores antes citados, podría atribuirse a las distintas composiciones lignocelulíticas de los residuos empleados en estos estudios; ya que se ha determinado, que a menor proporción de celulosa cristalina en el sustrato, será mayor la inducción de beta-1,4-endoglucanasa al existir una superficie más amplia y disponible para la acción enzimática (Alam *et al.*, 2009).

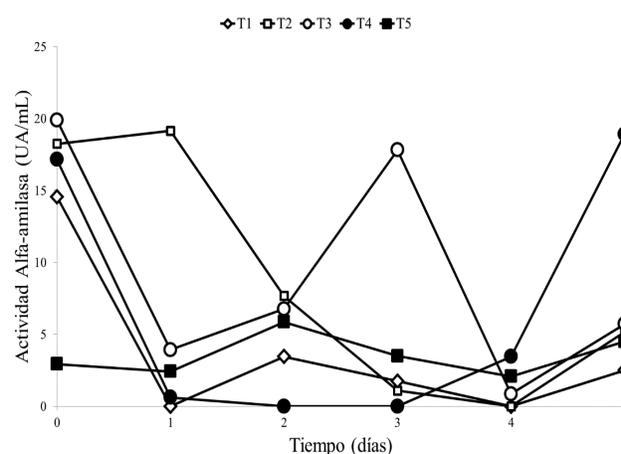
De igual forma, la actividad beta-1,4-endoglucanasa de T2 con un día de fermentación, fue mayor a la reseñada por Gómez (2012), al efectuar fermentaciones sumergidas con *Trichoderma* sp., empleando harina de girasol como sustrato (22,5 UI/mL). En general, este comportamiento puede deberse a que la fermentación en sólido le resulta “más natural” a los hongos, y con frecuencia ofrece mejores resultados si se le compara con los obtenidos en fermentación sumergida; aun cuando, se emplee el mismo sustrato



**Figura 1.** Comportamiento de la actividad enzimática beta-1,4-endoglucanasa en los tratamientos estudiados (T1: HP, T2: 75% HP-25% HG, T3: 50% de cada harina, T4: 25% HP-75% HG y T5: HG).

y microorganismo durante las fermentaciones (Papagianni *et al.*, 2001). Esto, debido a que la fermentación en estado sólido favorece la liberación de nutrientes cuando se trabaja con microorganismos que demandan de menor contenido de humedad en el medio, como es el caso de los hongos (Subramaniyam y Vimala, 2012).

Con respecto a la actividad de la enzima alfa-amilasa, se puede observar en la Figura 2, la cinética de la misma en los tratamientos estudiados. Los resultados mostraron que en todos los tratamientos se desarrolló actividad alfa-amilásica, siendo la mayor la medida en T2 con 19,1 UA/mL en un día de ensilaje ( $p < 0,05$ ). Estos resultados confirman lo señalado por Valenzuela *et al.* (2001), Mohamed *et al.* (2011), Raja *et al.* (2011), Ülker *et al.* (2010) y Sali *et al.* (2014), quienes afirman que aunque los hongos del género *Trichoderma*, son conocidos por su capacidad para producir enzimas celulolíticas, también tienen potencial para sintetizar amilasas. De igual forma, Ramachandran *et al.* (2007), Agamez *et al.* (2008), Deshpande *et al.* (2008), Mohamed *et al.* (2011) e Irfan *et al.* (2012), señalan que la composición del sustrato empleado como fuente de carbono puede inducir la actividad enzimática de celulasas y alfa-amilasas en *Trichoderma*, como consecuencia de la disponibilidad de fibra, almidón y azúcares, por lo que se han empleado diversos residuos agroindustriales en procesos de fermentación, tales como: afrechillo de trigo, residuos de arroz, residuos de cítricos, residuos de papas, harina de girasol, entre otros, para lograr obtener estas enzimas (Cuadro 1).



**Figura 2.** Comportamiento de la actividad enzimática alfa-amilasa en los tratamientos estudiados (T1: HP, T2: 75% HP-25% HG, T3: 50% de cada harina, T4: 25% HP-75% HG y T5: HG).

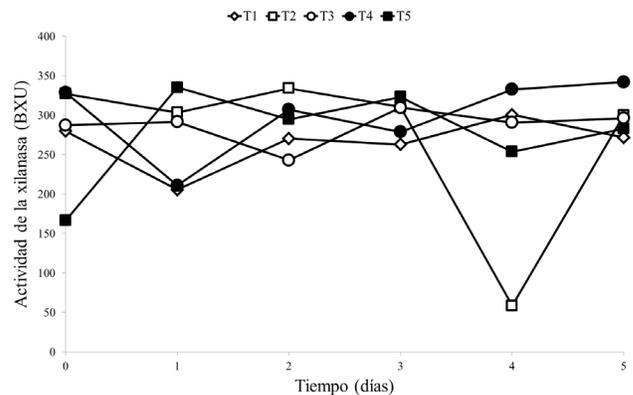
**Cuadro 1.** Composición bromatológica de la harina de residuos de papa (HP) y harina de girasol (HG) empleadas en el estudio

| Componente (%)                | HP    | HG    |
|-------------------------------|-------|-------|
| Humedad                       | 0,28  | 0,38  |
| Materia seca                  | 99,72 | 99,62 |
| Proteína cruda                | 15,70 | 15,73 |
| Grasa cruda                   | 1,50  | 8,50  |
| Fibra cruda                   | 6,32  | 12,40 |
| Ceniza                        | 3,90  | 5,33  |
| Almidón                       | 81,30 | 0,30  |
| Fibra detergente neutra (FDN) | 31,65 | 64,06 |
| Fibra detergente ácida (FDA)  | 6,14  | 25,89 |

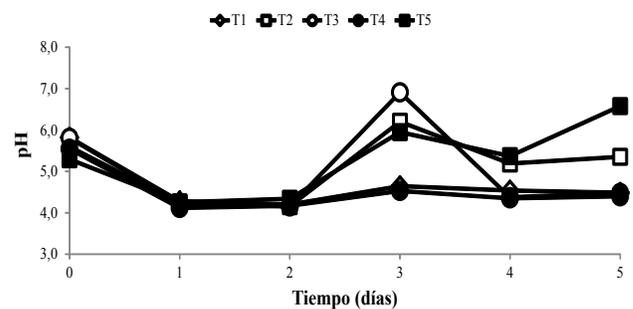
En cuanto a la actividad enzimática de las xilanasas, se observa en la Figura 3 que todos los tratamientos presentaron actividad en esta enzima en el transcurso del ensilaje, siendo la mayor actividad la que se obtuvo en T4 al quinto día de ensilaje con 341,82 BXU ( $p > 0,05$ ).

En general, se ha considerado a *Trichoderma* como un hongo capaz de producir enzimas hemicelulolíticas como la xilanasas, ya que se ha señalado que estas enzimas son inducibles y afectadas por la naturaleza del sustrato, atribuyendo una mayor productividad de la xilanasas en sustratos con proteína, hemicelulosa y azúcares fermentables en su composición (Pang *et al.*, 2006).

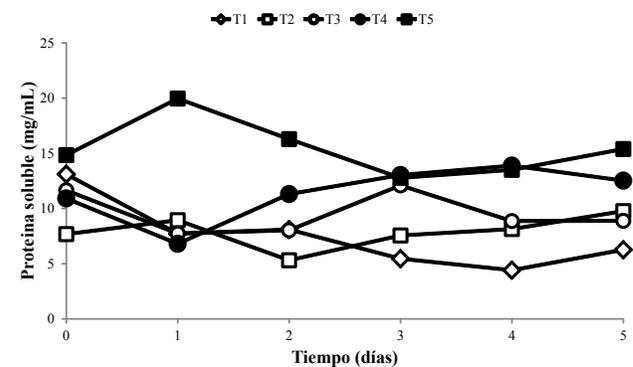
Por otra parte, los indicadores empleados en este trabajo, es decir: la variación del pH, la concentración de proteína soluble y del nitrógeno amínico en los tratamientos estudiados durante el proceso de ensilaje (Figuras 4, 5 y 6), demuestran la actividad del *Trichoderma* sp. sobre el sustrato (Kim, 2004; Vásquez *et al.*, 2008). Los valores de pH disminuyeron en todos los tratamientos durante el primer día de ensilaje (Figura 4), manteniéndose dentro del rango de 4 a 5 en todos los tratamientos a excepción de los procesos en T3 (6,9), T2 (6,2) y T5 (5,9) a las 72 horas de fermentación. Al cuarto y quinto día de incubación T2 y T5, continuaron con valores de pH superiores a 5. De acuerdo con Kim (2004) y Vásquez *et al.* (2008), este comportamiento es provocado por la degradación del sustrato a causa de la actividad proteolítica del hongo sobre el mismo, liberándose grupos aminos que ocasionan el aumento del pH. Este señalamiento parece ser confirmado por los resultados mostrados en las Figuras 5 y 6, en donde se constata la variabilidad en el



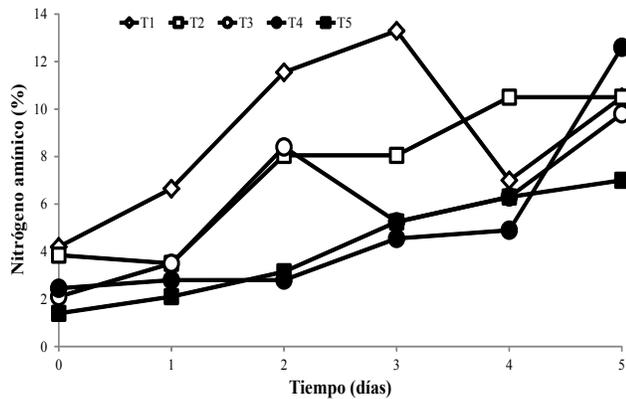
**Figura 3.** Comportamiento de la actividad enzimática de la xilanasas en los tratamientos estudiados (T1: HP, T2: 75% HP-25% HG, T3: 50% de cada harina, T4: 25% HP-75% HG y T5: HG).



**Figura 4.** Variación del pH en los tratamientos estudiados (T1: HP, T2: 75% HP-25% HG, T3: 50% de cada harina, T4: 25% HP-75% HG y T5: HG).



**Figura 5.** Variación de la concentración de proteína soluble en los tratamientos estudiados (T1: HP, T2: 75% HP-25% HG, T3: 50% de cada harina, T4: 25% HP-75% HG y T5: HG).



**Figura 6.** Variación de la concentración de nitrógeno amínico en los tratamientos estudiados (T1: HP, T2: 75% HP-25% HG, T3: 50% de cada harina, T4: 25% HP-75% HG y T5: HG).

contenido de proteína soluble en las mezclas ensiladas estudiadas, y el incremento en la concentración del nitrógeno amínico a lo largo del proceso fermentativo. Al respecto, Anupama y Ravindra (2001) y Kumar y Prakash (2013), señalan que la variación en el contenido de proteínas solubles durante la fermentación, sugiere la capacidad del hongo de utilizar los nutrientes disponibles en el sustrato, y por tanto la forma de la curva (Figura 5) sería el resultado de dos procesos opuestos; el consumo de proteínas sustrato y la producción de proteína de biomasa (crecimiento del hongo).

En cuanto a la concentración de nitrógeno amínico en el sustrato, Bertsch *et al.* (2009) señalan que el incremento en el contenido de nitrógeno amínico es indicativo de la degradación de las proteínas existentes en el medio de cultivo como consecuencia de la actividad proteolítica desarrollada en el mismo. Esto coincidiría con lo publicado por Kredics *et al.* (2005), quienes indican que los estudios que han examinado los perfiles de la enzima proteolítica de cepas de *Trichoderma* revelaron que el sistema de la proteasa de este hongo es complejo y contiene un gran conjunto de enzimas. Asimismo, se demostró que las proteasas de *Trichoderma*, están implicadas en su acción micoparasitaria, nematocida, colonizadora y que ciertas proteasas, parecen estar asociadas también con la agresividad de los grupos de *Trichoderma* hacia otros hongos, basándose principalmente en su capacidad saprófita.

Los resultados obtenidos en el análisis estadístico señalan que el tratamiento T2 con un día de ensilaje (T2D1), presentó las mayores actividades en alfa-

amilasas y beta-1,4-endoglucanasa ( $p < 0,05$ ), entre los tratamientos estudiados. Asimismo, se constató que aun cuando, T4 con cinco días de ensilaje fue el tratamiento con la más alta actividad de xilanasas (341,82 BXU), este resultado no se diferencia estadísticamente ( $p > 0,05$ ) del registrado para T2 con 24 horas de incubación (303,36 BXU), superándolo en sólo en 11,3%. Asimismo, los indicadores fermentativos empleados en este trabajo, permitieron confirmar la degradación del medio ensilado a causa de la excreción del hongo *Trichoderma* de enzimas con actividad proteolítica.

### Estudio del efecto de las condiciones de fermentación utilizadas sobre la calidad de los ensilajes

En el Cuadro 2, se puede observar la composición bromatológica de los tratamientos que presentaron las mayores actividades enzimáticas. El ANAVAR confirmó la existencia de diferencias altamente significativas ( $p < 0,01$ ) en lo que se refiere a la composición bromatológica de los tratamientos estudiados en los días en los cuales se presentaron las más elevadas actividades enzimáticas. Mientras la prueba de medias de las mínimas diferencias significativas de Fisher, demostró la existencia de diferencias significativas entre las fracciones que componen estos ensilados ( $p < 0,05$ ), a excepción del contenido de humedad.

Dichos tratamientos presentaron un contenido de materia seca mayor al 90%, lo cual coincide con los resultados señalados por Guerra *et al.* (2007). Por otra parte, los análisis revelaron que sólo el tratamiento T2 con un día de ensilado presentó pH de 4,2, el cual es el valor recomendado en los procesos de ensilaje para una adecuada conservación de los mismos y se considera característico de un ensilaje de calidad (Cárdenas *et al.*, 2003; Clavero y Razz, 2008; Wagner *et al.*, 2013). Con base en este resultado, se revisará únicamente al tratamiento T2 como una posible alternativa para complementar la dieta de bovinos.

En este sentido, el contenido de proteína cruda en T2D1, se encuentra dentro del rango indicado por Queiroz *et al.* (2013), para esta fracción (7,91 a 8,62%) en ensilajes de forraje de maíz y por Cárdenas *et al.* (2003) en ensilajes mixtos de gramíneas y especies arbóreas (7,2 a 9,9%). De igual forma, se determinó que los valores de proteína cruda de este tratamiento son menores a los indicados para los sustratos bases (HP y HG, Cuadro 1). Esto parece indicar que

**Cuadro 2** Caracterización bromatológica de los tratamientos estudiados en los días en los que presentaron mayor actividad enzimática (valores expresados en base seca)

|              | T1D3                    | T2D1                    | T3D5                    | T4D5                    | T5D5                   |
|--------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|
| MS (%)       | 97,77±0,85              | 99,50±0,10              | 99,54±0,01              | 99,65±0,07              | 99,22±0,90             |
| pH           | 4,6±0,12 <sup>b</sup>   | 4,2±0,42 <sup>d</sup>   | 4,4±0,11 <sup>bc</sup>  | 4,4±0,28 <sup>cd</sup>  | 6,5±0,92 <sup>a</sup>  |
| Proteína (%) | 9,50±0,00 <sup>d</sup>  | 8,40±0,00 <sup>e</sup>  | 11,85±0,00 <sup>c</sup> | 12,99±0,01 <sup>b</sup> | 13,1±0,01 <sup>a</sup> |
| Ceniza (%)   | 3,26±0,03 <sup>d</sup>  | 2,90±0,07 <sup>e</sup>  | 4,40±0,70 <sup>c</sup>  | 4,84±0,04 <sup>b</sup>  | 5,2±0,15 <sup>a</sup>  |
| Grasa (%)    | 1,36±0,11 <sup>e</sup>  | 4,30±0,07 <sup>d</sup>  | 4,80±0,14 <sup>c</sup>  | 10,80±0,13 <sup>a</sup> | 7,6±0,28 <sup>b</sup>  |
| FDN (%)      | 27,25±0,18 <sup>d</sup> | 42,22±0,55 <sup>a</sup> | 40,31±0,22 <sup>c</sup> | 39,82±0,13 <sup>c</sup> | 40,8±0,13 <sup>b</sup> |
| FDA (%)      | 7,01±0,01 <sup>e</sup>  | 14,85±0,11 <sup>d</sup> | 20,28±0,08 <sup>c</sup> | 31,41±0,42 <sup>a</sup> | 27,4±0,29 <sup>b</sup> |
| Humedad (%)  | 2,23±1,45               | 0,50±0,18               | 0,46±0,01               | 0,35±0,04               | 0,78±0,72              |

\*T= Tratamiento (T1: HP, T2: 75% HP-25% HG, T3: 50% de cada harina, T4: 25% HP-75% HG y T5: HG); D= Días de ensilaje o incubación

\*\* Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ( $P < 0,05$ ) de acuerdo con la Pruebas de medias de las mínimas diferencias significativas de Fisher.

el contenido de proteína del sustrato pudo inducir la excreción de enzimas con actividad proteolítica por parte de *Trichoderma* sp. (Vásquez *et al.*, 2008; Murthy y Naidu, 2010), por lo que se cuantifican valores de proteína soluble desde el principio de proceso en todos los tratamientos (Figura 5), la cual es considerada, un indicador tanto del crecimiento del microorganismo como del empleo del sustrato por el hongo (Anupama y Ravindra, 2001; Kumar y Prakash, 2013).

Adicionalmente, T2, con un día de fermentación tiene un contenido de grasa menor a 5%, que de acuerdo con Tobía y Villalobos (2004), Acevedo *et al.* (2010) y McDonald *et al.* (2011), es el valor apropiado para ensilajes usados como suplementos en la dieta de rumiantes, ya que la incorporación de más de 5% de grasa a la dieta de estos animales, podría reducir la digestión de la fibra e incluso, reducir el consumo de materia seca.

Asimismo, se ha señalado que la fracción de fibra tiene la mayor influencia en la digestibilidad y que además, la cantidad y la calidad de la fibra son importantes, ya que contribuyen a estimular la rumia para mejorar la fermentación y a aumentar el flujo de saliva hacia el rumen (McDonald *et al.*, 2011). En tal sentido, T2D1 presenta más de 40% de FDN y menos de 15% de FDA, lo que en general, favorece la digestibilidad de los alimentos y por consiguiente, su aporte de energía (Palladino *et al.*, 2006).

En síntesis, los resultados obtenidos indican que T2 con un día de incubación, es un ensilaje de calidad en su composición, y presenta las fracciones en las proporciones adecuadas para complementar la dieta de los rumiantes.

## CONCLUSIONES

Bajo las condiciones en las que se llevó a cabo este trabajo, se determinó la capacidad de *Trichoderma* sp. de desarrollar actividad enzimática alfa-amilasa, beta-1,4-endoglucanasa y xilanasas en los tratamientos estudiados. El estudio estadístico apuntó a que T2D1 fue el tratamiento que presentó las mayores actividades enzimáticas y con la más adecuada composición bromatológica para complementar la alimentación de rumiantes, por lo que podría favorecer a la ganancia de peso, la producción de leche, y la calidad de la carne y la leche obtenidas del ganado vacuno.

## AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen el apoyo económico al FONACIT mediante el proyecto N° 2013001640.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acevedo, I.; O. García; J. Contreras; I. Acevedo; R. Morales. 2010. Composición química de *Amaranthus* ensilado. Rev. UNELLEZ. Cienc. Tec. 28: 9-15.

- Agamez, E.; R. Zapata; L. Oviedo; J. Barrera. 2008. Evaluación de sustratos y procesos de fermentación sólida para la producción de esporas de *Trichoderma* sp. Rev. Col. Biotec. 10(2): 23-34.
- Alam, M.; A. Mamun; I. Qudsieh; S. Muyibi; H.M. Salleh; N.M. Omar. 2009. Solid state bioconversion of oil palm empty fruit bunches for cellulase enzyme production using a rotary drum bioreactor. Biochem. Eng. J. 46: 61-64.
- Anupama; P. Ravindra. 2001. Studies on production of single cell protein by *Aspergillus niger* in solid state fermentation of rice brand. Braz. Arch. Biol. Technol. 44(1): 79-88.
- Bailey, M; P. Biely; K. Poutanen. 1991. Interlaboratory testing methods for assay of xylanase activity. J. Biotechnol. 23: 257-270.
- Bertsch, A.; N. Coello; I. Díaz. 2009. Biodegradación de pelos y cerdas de porcino por *Kocuria rosea*. Rev. Fac. Agron. (UCV). 35(2): 43-48.
- Betancourt, J.; H. Cuastumal; S. Rodríguez; J. Navia; E. Insuasty. 2012. Alimentación de vacas Holstein con suplemento de papa de desperdicio (*Solanum tuberosum*) y acacia negra (*Acacia decurrens*) y su efecto en la calidad de leche. Rev. Investig. Pecu. 1(2): 41-51.
- Bodega, J. 2010. Silaje de papa para alimentación animal. Producir XXI. Buenos Aires, Argentina. 18(224): 32-38.
- Cárdenas, J.; C. Sandoval; F. Solorio. 2003. Composición química de ensilajes de gramíneas y especies arbóreas. Téc. Pecu. Méx. 41(3): 283-294.
- Clavero, T.; R. Razz. 2008. Dinámica de la fermentación inicial de ensilaje de *Albizia lebeck*. Rev. Fac. Agron. (LUZ). 25: 665-673.
- Colina, A.; A. Ferrer; L. Urribarri. 2009. Cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30 from different cellulosic substrates. Rev. Téc. Ing. Univ. Zulia. 2(32): 152-159.
- Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). 1983. Normas Venezolanas 1883. Alimentos para Bovinos. Ministerio de Fomento. Fondonorma. Caracas, Venezuela. 10 p.
- Deshpande, S.; M. Bhotmange; T. Chakrabati; P. Shastar. 2008. Production of cellulase and xylanase by *Trichoderma reesei* (QM9414 mutant), *Aspergillus niger* and mixed culture by soil state fermentation (SSF) of water hyacinth (*Eichornia crassipes*). Indian J. Chem. Technol. 15(1): 449-456.
- Diorio, L. A.; F. Forchiassin; V. Papinutti; D. Sueldo. 2003. Actividad enzimática y degradación de diferentes tipos de residuos orgánicos por *Saccobolus sacco boloides* (Fungi, Ascomycotina). Rev. Iberoam. Micol. 20: 11-15.
- FEDEAGRO (Confederación de Asociaciones de Productores Agropecuarios). 2014. Confederación de Asociaciones de Productores Agrícolas. Venezuela. Disponible en: <http://www.fedeagro.org/produccion/default.asp>. Consultado: 16 de Abril de 2015.
- French, E.; T. Herbert. 1980. Métodos de investigaciones fitopatológicas. Editorial IICA. pp. 174-175.
- Garcés, A.; L. Berrio; S. Alzate; J. Serna; A. Builes. 2004. Ensilaje como fuente de alimentación para el ganado. Rev. Lasallista Investig. 1(1): 66-71.
- Gómez, M. 2012. Caracterización de la actividad enzimática del monocultivo y el cocultivo de *Aspergillus niger* y *Trichoderma* sp. utilizando harina de girasol (*Helianthus annuus*) como sustrato fermentable. Trabajo de Grado. Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela. 64 p.
- Guerra Liera, J. E.; B. J Riveros Acosta; M. A. Gastelum Delgado; A. Córdova Izquierdo; J. Rodríguez García; L. E. Soto Angulo; J. Moreno Quiroz; L. A. López Juárez; J. L. Corrales Aguirre; S. Baca Martínez. 2007. Chemical composition and energetic value of corn and Sudan grass silage added with molasses and bovine faeces. ISAH, Tartu, Estonia. 1: 127-131.
- Hart, L.; H. Fisher. 1991. Análisis moderno de alimentos. Edit. Acribia. Zaragoza, España. 236 p.
- Irfan, M.; M. Nadeem; Q. Syed. 2012. Influence of nutritional conditions for endoglucanase production by *Trichoderma viride* in SSF. Global J. Biotech. & Biochem. 7(1): 07-12.
- Jabbar, M; S. Ahmad; S. Riffat. 2008. Effect of replacing cotton seed cake with sunflower meal in the ration of lactating crossbred cows. Veterinary and Animal Sciences J. 1: 11-13.
- Juhász, T.; Z. Szengyel; K. Réczey; M. Siika-Aho; L. Viikari. 2005. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. Process Biochem. 40(2005): 3519-3525.

- Kim, J. 2004. Optimization of citric acid production by *Aspergillus niger* NRRL 567 in various fermentation systems. McGill University. Canada. 278 p.
- Kumar, C.; D. Prakash. 2013. Fungal protein production by small scale fermentation technology using *Aspergillus niger*. Global J. Res. Med. Plants & Indigen. Med. 2(9): 642-647.
- Kredics, L.; Z. Antal; A. Szekeres; L. Hatvani; L. Manczinger; C. Vágvolgyi; E. Nagy. 2005. Extracellular proteases of *Trichoderma* species – a review. Acta Microbiol. Immunol. Hung. 52(2): 169-184.
- Lowry, O.H.; N.J. Rosenbrough; A. Farr; U. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
- Manjarrés, K; Y. Piñeros; E. Rodríguez. 2011. Evaluación del complejo enzimático producido mediante cocultivo de *Aspergillus* sp. y *Trichoderma* sp. en fase sólida sobre residuos de palma. Bioagro 23(1): 19-26.
- McDonald, P; R. A. Edwards; J. F. D. Greenhalgh; C. A. Morgan; L. A. Sinclair; R. G. Wilkinson. 2011. Animal Nutrition. Seventh Edition. Pearson Eds. England. 692 p.
- Miller, G. 1959. Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31(3): 426-428.
- Mohamed, S.; E. Azhar; B. Morooj; T. Nisreen; K. Taha. 2011. Production, purification and characterization of alpha-amylase from *Trichoderma harzianum* grown on mandarin peel. Afr. J. Microbiol. Res. 5(9): 1018-1028.
- Montgomery, D. 2005. Diseño y análisis de experimentos. Grupo Editorial Iberoamérica, S.A. Ciudad de México, México. 589 p.
- Morocoima, J.; A. Bertsch; G. Domínguez; C. Mazzani; I. Díaz. 2013. Optimización del cultivo de *Aspergillus niger* y *Saccharomyces cerevisiae* para la obtención de etanol a partir de los residuos del procesamiento agroindustrial de la papa (*Solanum tuberosum*). Interciencia 38(4): 305-309.
- Murthy, P.; M. Naidu. 2010. Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation utilizing coffee by-products. World Appl. Sci. J. 8(2): 199-205.
- Nuruddin, M.; A. Chowdhury; S.A. Haque; M. Rahman; S.F. Farhad; M. Sarwar; A. Quaiyyum. 2011. Extraction and characterization of cellulose microfibrils from agricultural wastes in an integrated biorefinery initiative. Cell. Chem. Technol. 45(5-6): 347-354.
- Olmos, A. 1987. Reportes de biotecnología. Biotecnología 5: 36-39.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 2008. Año internacional de la papa 2008. Nueva luz sobre un tesoro enterrado. 136 p.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 2010. Sunflower crude and refined oils. Agribusiness Handbook. Roma. Italy. pp. 14-90.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 2013. Utilization of fruit and vegetable wastes as livestock feed and as substrates for generation of other value-added products. RAP publication 2013/04. Roma. Italy. 56 p.
- Orzua, M.; S. Mussatto; J. Contreras Ezequiel; R. Rodríguez; H. de la Garza; J. Teixeira; C. Aguilar. 2009. Exploitation of agro industrial wastes as immobilization carrier for solid-state fermentation. Ind. Crop. Prod. 30: 24-27.
- Palladino, A; M. Wawrzekiewicz; F. Bargo. 2006. La Fibra. Departamento de producción animal, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires. Disponible en: [www.produccion-animal.com.ar](http://www.produccion-animal.com.ar). Consultado: 09 de Noviembre de 2014.
- Pang, P. K.; I. Darah; L. Poppe; G. Szakacs; C.O. Ibrahim. 2006. Xylanase production by a local isolate, *Trichoderma* spp. FETL c3-2 via solid state fermentation using agricultural wastes as substrates. Malays. J. Microbiol. 2(1): 7-14.
- Papagianni, M.; S. Nokes; K. Filer. 2001. Submerged and Solid-State Phytase fermentation by *Aspergillus niger*. Effects of agitation and medium viscosity on phytase production, fungal morphology and inoculum performance. Food Technol. Biotechnol. 39(4): 319-326.
- Perdomo, M.; J. Peña; C. Guédez; C. Castillo; L. Cásales. 2007. *Trichoderma harzianum* para el control de la enfermedad “sanchocho” en semilleros de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). Academia 6(12): 52-61.

- Queiroz, O. C. M.; K. G. Arriola; J. L. P. Daniel; A. T. Adesogan. 2013. Effects of 8 chemical and bacterial additives on the quality of corn silage. *J. Dairy Sci.* 96(9): 5836–5843.
- Quemba, R.; L. Moreno; D. Puentes; F. Avella; W. Alza. 2009. Elaboración de un concentrado de uso avícola a partir de residuos revalorizados de la industria alimentaria. *Rev. Luna Azul* (28): 40-45.
- Raja, J.; T. Mohan; G. Immanuel; S. Jeeva; C. Packia. 2011. Studies on amylase and cellulase enzyme activity of the fungal organisms causing spoilage in tomato. *Eur. J. Exp. Biol.* 1(3): 90-96.
- Ramachandran, S.; S. Kumar Singh; C. Larroche; C. Soccol; A. Pandey. 2007. Oil cakes and their biotechnological applications – A review. *Bioresour. Technol.* 98(2007): 2000–2009.
- Rodríguez, L.; E. Martín. 1980. Análisis de alimentos. Tomo I. Edit. OBE. Universidad Central de Venezuela. 393 p.
- Saili, N.; S. Siddiquee; C. Wong; M. González; S. Kumar. 2014. Lignocellulolytic activities among *Trichoderma* isolates from Lahad Datu, Sabah and Deception Island, Antarctic. *J. Microb. Biochem. Technol.* 6(5): 295-302.
- Soares, J.; P. de Figueiredo; P. Cecon; M. Setti; C. McManus; H. Louvandini. 2006. Desempenho de bovinos leiteiros em fase de crescimento alimentados com farelo de girassol. *Ci. Anim. Bras.* 7(3): 223-233.
- Subramaniyam, R.; R. Vimala. 2012. Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study. *Int. J. Sci. Nat.* 3(3): 480-486.
- Tobía, C.; E. Villalobos. 2004. Producción y valor nutricional del forraje de soya en condiciones tropicales adversas. *Agronomía Costarricense* 28(1): 17-25.
- Ülker, S.; A. Ozel; A. Colak; S. AlpayKaraoglu. 2010. Isolation, production, and characterization of an extracellular lipase from *Trichoderma harzianum* isolated from soil. *Turkish J. Biol.* 35(2011): 543-550.
- Valenzuela, E.; S. Leiva; R. Godoy. 2001. Variación estacional y potencial enzimático de microhongos asociados con la descomposición de hojarasca de *Nothofagus pumilio*. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 74: 737-749.
- Valiño, E.; A. Elías; V. Torres; T. Carrasco; N. Albello. 2004. Mejoramiento de la composición del bagazo de caña de azúcar por la cepa *Trichoderma viride* M5-2 en un biorreactor de fermentación en estado sólido. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola* 38(2): 145-153.
- Van Soest, P.; R. Wine. 1967. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV. Determination of plant cell-wall constituents. *J. of AOAC.* 50: 50-55.
- Vásquez, I.; A. Aguilera; L. Prado; C. Aguilar. 2008. Producción fúngica de proteasas inducidas con pelo de cerdo. *Información Tecnológica* 19(2): 33-40.
- Wagner, B.; V. Asencio; J. Caridad. 2013. Como preparar un buen ensilaje. Serie: Conservación de forrajes. Instituto Dominicano de Investigaciones Agropecuarias y Forestales. República Dominicana. 15 p.