

020723
2ej

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS
C.C.H. UNAM

TESIS DE MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

CARACTERIZACION PRELIMINAR DE UN
PROBIOTICO PRODUCIDO POR
FERMENTACION SOLIDA.

Rafael German Campos Montiel

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TUTORES

Dr. Gustavo Viniegra Gonzalez

Dr. Rolando Herrera-Saldaña

Dr. Mario Diaz Castañeda

JUNIO 1991



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCION	
Procesos Digestivos	3
Utilización de la Fibra en Rumiantes	4
Antibióticos	7
Probióticos	8
UTILIZACION DE LOS FERMENTOS FUNGICOS COMO PROBIOTICOS	
Efecto en la Población Microbiana	10
Efecto en la Digestibilidad de Nutrientes	11
Efecto en los Parámetros Fermentativos	12
Efecto del pH	13
Efecto en el Metano	14
Otros Posibles Efectos	14
Efecto en la Producción Animal	15
Referencias	20
HIPOTESIS	26

CUADROS DE LA INTRODUCCION

Microorganismos Usados en la Alimentación Animal	17
Cambios en la Población Microbiana por la Adición de Probióticos	18
Aumento en la Digestibilidad por la Adición de Probióticos	19
Efecto de los Probióticos en la Producción de Leche	20

CUADROS DEL PRIMER ARTICULO

Celulasas vs Digestibilidades de Materiales Fibrosos	39
Amilasas vs Digestibilidades de Materiales Amiláceos	40
Lipasas vs Digestibilidades de Materiales Grasosos	41
Proteasas Vs Digestibilidades de Materiales Protéicos	42

CUADROS DEL SEGUNDO ARTICULO

Composición de la Dieta Basal del Primer Experimento.	55
Características Bioquímicas de la Fermentación Ruminal	56
Efecto de los Tratamientos en la Digestibilidad de Nutrientes	57
Termoestabilidad del Factor o Factores Probióticos	58
Solubilidad del Principio o Principios Probióticos	59

RESUMEN

Los esfuerzos para producir alimentos de origen animal de manera más eficiente y de menor costo han estimulado la búsqueda y desarrollo de nuevos promotores de crecimiento de origen orgánico, como los probióticos, que incrementen la ingesta, la eficiencia, el crecimiento y la producción animal.

Los probióticos son compuestos químicos de origen microbiológico que estimulan el crecimiento de la microbiota benéfica para el hospedero, pero en la mayoría de los casos estos compuestos no han sido identificados, por lo tanto, no se conoce su forma de funcionamiento.

El objetivo de esta tesis fue la de caracterizar parcialmente los principios activos de un probiótico producido por fermentación sólida. Este se alcanzó mediante cuatro metas principales.

La primera fue determinar la correlación existente entre las diferentes actividades enzimáticas (celulasas, amilasas, lipasas y proteasas) de 5 probióticos con el aumento de digestibilidad *in vitro* de 12 diferentes sustratos, porque la mayoría de este tipo de promotores de crecimiento contienen enzimas. Los resultados obtenidos nos demostraron que no existía correlación entre las enzimas y incrementos en digestibilidad ($P < .05$).

La segunda meta fue determinar el efecto *probiótico in situ* de *Aspergillus niger* crecido en pulpa de café ya que los probióticos producidos por cultivo sólido solamente se habían probado en digestibilidades *in vitro*. Los resultados obtenidos mostraron un efecto significativo ($P < .05$) en los incrementos de digestibilidad de la materia seca y proteína cruda, no observando efectos significativos ($P > .5$) por tratamiento en la fibra detergente neutro y en los parámetros fermentativos como ácidos grasos volátiles, pH y nitrógeno amoniacal.

La tercer meta fue la de determinar la *termoestabilidad* de factor o factores probióticos mediante un ensayo sobre digestibilidades *in vitro*, encontrándose significativamente ($P < .05$) que era termolabil a 120°C .

La última meta fue la de determinar la *solubilidad* de este principio o principios activos utilizando el método de digestibilidades *in vitro* observándose significativamente ($P < .05$) que era soluble en agua a pH 7.

INTRODUCCION

PROCESOS DIGESTIVOS

La digestión comprende una serie de procesos en el tracto gastro-intestinal mediante los cuáles los alimentos son degradados para su posible absorción; ésto se logra mediante la combinación de procesos mecánicos y bioquímicos.

Los diferentes cambios del tracto digestivo se deben a adaptaciones evolutivas al tipo de alimentos que digieren los animales, como ejemplo : la molleja, que es un órgano muscular en pollos y pavos para moler semillas y granos duros y como los rumiantes, que a diferencia de otros mamíferos, tienen un estómago muy grande que consta de tres compartimientos estomacales adicionales (rumen, retículo y omaso) .

Gracias al rumen y al retículo, los rumiantes tienen la capacidad de retención de los alimentos para que los microorganismos del rumen pueden desdoblar carbohidratos complejos como la celulosa, la cual no pueden ser hidrolizada por las enzimas que excretan los mamíferos.

LA UTILIZACION DE LA FIBRA POR LOS RUMIANTES

Los ruminantes tienen una enorme ventaja sobre los monogástricos porque gracias a este compartimiento los animales de este tipo, utilizando sus microorganismos simbióticos, pueden desdoblar los carbohidratos complejos en nutrientes esenciales como aminoácidos, vitaminas del complejo B, ácidos grasos volátiles, etc.

El rumen de un vacuno adulto se puede considerar como un fermentado anaeróbico de 60 litros de capacidad donde la población microbiana es muy diversa y cuya densidad es de 10^{10} células por mililitro. Debido a la gran diversidad de microorganismos presentes todavía no se conocen todos los detalles relativos a sus actividades bioquímicas. Sin embargo el efecto neto es claro; la celulosa y demás carbohidratos complejos presentes en el forraje digerido son degradados a glucosa para posteriormente producir ácidos grasos volátiles (AGV) y gases (metano y bióxido de carbono). La población microbiana crece rápidamente y pasa con el material sin digerir a las regiones inferiores del tracto digestivo que segregan proteasas por las cuales los microorganismos son degradados y sus aminoácidos y vitaminas absorbidos por el animal.

Por esta razón, los requerimientos de nitrógeno protéico de los rumiantes son menores que los de otros grupos de animales. Ya que los microorganismos del rumen pueden convertir el nitrógeno no protéico en proteína .

Los ácidos grasos volátiles (AGV) son los compuestos utilizados por los rumiantes para obtener energía. Los principales AGV son el acético, propiónico y butírico . Las proporciones molares de éstos son por lo general 65:20:9, respectivamente, pero estas proporciones son alteradas por aditivos y modificaciones dietéticas . Por la producción de este tipo de ácidos a partir de la degradación de la fibra, se forma un exceso de hidrógeno y bióxido de carbono, el cual se utiliza para la producción de metano para mantener el equilibrio en el rumen. El metano no puede ser metabolizado por el animal por lo cual constituye una pérdida neta de energía del alimento. Algunos promotores de crecimiento actúan disminuyendo la producción de metano y aumentando la producción de propiónico.

PROMOTORES DE CRECIMIENTO

Son aquellos compuestos químicos que no son nutrientes esenciales, que se adicionan a los alimentos para incrementar la eficiencia, grado de crecimiento y el nivel de producción de los animales, entre los cuales encontramos a los antibióticos y los probióticos.

Huber (1988) consideró para que un compuesto biológico pueda ser considerado como promotor del crecimiento debe cumplir las siguientes características :

- 1) No ser patógeno
- 2) Estar libre de toxinas
- 3) Ser requerido en pequeñas cantidades
- 4) Incrementar la eficiencia animal en la utilización de nutrientes.

ANTIBIOTICOS

Son aquellos promotores de crecimiento sintetizados por microorganismos que impiden el crecimiento de otros microorganismos y cuya adición mejora notablemente el crecimiento de aves y cerdos. Los antibióticos empleados como aditivos son : bacitracina, clorotetracina, virginiamicina, flovomicina, avoparcina, avilamicina, neomicina, oxitetraciclina, oleandomicina, etc.

El modo de acción de este tipo de promotores de crecimiento es principalmente la disminución de bacterias patógenas tales como Streptococcus faecalis, Clostridium perfringens, Salmonella sp, Escherichia coli, etc. para posteriormente favorecer el desarrollo de microorganismos sintetizadores de vitaminas, aminoácidos, etc. Otro modo de acción de estos aditivos en pollos es la disminución de la pared del intestino delgado con lo que mejora el transporte de nutrientes . (Avila, 1989) .

El empleo inadecuado de los antibióticos en los años 50 provocó el desarrollo de poblaciones microbianas resistentes a ellos, por lo que el uso de antibióticos como promotores de crecimiento fue restringida a aquéllos que no se usaban en tratamientos contra enfermedades . La posibilidad de no usar antibióticos como estimuladores del crecimiento dió como resultado la búsqueda de otras alternativas como los probióticos (Fuller, 1989).

PROBIOTICOS

Son promotores de crecimiento que actúan estimulando el desarrollo de microorganismos que son benéficos para el hospedero. En la mayoría de los casos se desconoce el funcionamiento de los probióticos por la gran diversidad de compuestos existentes (Cuadro 1) y la gran gama de procesos para producirlos .

Originalmente los probióticos consistían en preparaciones viables de Lactobacilos particularmente Lactobacillus acidophilus pero actualmente la lista de ellos se ha expandido e incluye preparaciones viables y no viables de bacterias, hongos y levaduras (Zynn, 1988) .

En la actualidad los hongos más utilizados como probióticos en la nutrición de rumiantes, según Huber, (1988) son Saccharomyces cerevisiae y Aspergillus oryzae, pero Tapia, (1989) demostró mediante digestibilidades in vitro el efecto probiótico de otros géneros de hongos como: a) Trichoderma sp ; b) Penicillium sp .

Por lo general los probióticos están formados por una mezcla de biomasa, enzimas, vitaminas, minerales y nutrientes y/o otros factores de crecimiento no identificados que puedan tener un efecto benéfico en el desarrollo y producción animal. Huber (1988) .

Los mecanismos de acción de los probióticos que contienen bacterias son diferentes de los mecanismos de los probióticos que contienen hongos y/o levaduras .

Segun Zynn. (1988) los probióticos que incluyen bacterias como Lactobacillus acidophilus y Streptococcus faecium actuan de la siguiente manera :

- a) Colonizando el tracto digestivo .
- b) Compitiendo directamente con E. coli .
- c) Bajando el pH del intestino por la producción de ácido láctico.
- d) Neutralizando las enterotoxinas producidas por E. coli .

Los posibles mecanismos de acción de los probióticos del tipo fúngico reportados en la literatura son:

- a) Estimulando el crecimiento de la población microbiana encargada en la degradación de nutrientes.
- b) Incremento en la digestibilidad de los alimentos
- c) Cambios en las condiciones fisico-químicas en beneficio de la tasa de fermentación ruminal .
- d) Reducción de la producción de metano .

LA UTILIZACION DE FERMENTOS FUNGALES COMO PROBIOTICOS EN LA NUTRICION DE RUMIANTES

Efecto en la Población Microbiana del Rumen

En los últimos años se han experimentado con cepas de Aspergillus oryzae (Ao) y Saccharomyces cerevisiae (Sc) y se ha demostrado que este tipo de aditivos incrementan significativamente la población microbiana del rumen (Cuadro 2) .

Wiedmeir y col. (1987) encontraron en vacas lecheras un aumento del 56% y del 60% de las bacterias celulolíticas en el rumen cuando se adicionaron a la dieta pequeñas cantidades de (Ao) y (Sc), respectivamente. Dawson, (1987) reportó un incremento del 15-50% de las bacterias celulolíticas y un aumento del 51-461% de las bacterias anaeróbicas, suplementando con (Sc) . Fondevila y col, (1990) observaron en borregos un aumento del 126% en la población bacteriana con la adición de (Ao) .

Gómez y col. (1990) observaron una mayor producción microbiana de (15.5 vs 20.0 g/100g) de materia orgánica fermentada con la adición de (Ao), obteniéndose una mayor cantidad de proteína microbiana hacia el duodeno (355 vs 635 g/día) .

Por lo anterior se cree que este tipo de probióticos poseen un factor o factores nutricionales que estimulan el crecimiento de la población microbiana benéfica lo cual repercute en una mayor digestibilidad de los nutrientes.

Efecto en la Digestibilidad de Nutrientes

En la mayoría de los estudios se ha demostrado que este tipo de aditivos aumentan la digestibilidad de los nutrientes (Cuadro 3) . Van Horn y col. (1984) con (Ao) encontraron un aumento de 4.45 % en la digestibilidad de la materia seca y un incremento de 12.5 % en la digestibilidad de fibra detergente ácido. Gómez-Alarcón y col. (1987) hallaron un aumento en la digestibilidad en el rumen del 64% y 44.4% con (Ao) y (Sc) respectivamente . Wiedmeir y col. (1987) hallaron un aumento en la digestibilidad en la hemicelulosa del 5.6 % con los mismos mohos. Tapia y col. (1989) con pruebas in vitro, demostraron el efecto probiótico de aumentar la digestibilidad significativo ($P < .05$) con el doce forrajes diferentes con otros hongos como: Aspergillus niger, Trichoderma harzianum y Penicillium sp .

Por lo contrario solo existe un reporte donde hay una disminución en la digestibilidad de la fibra del 20% con (Sc) . (Harrison y col. 1988) .

En la digestibilidad de la proteína cruda Wiedmeir y col. (1987) encontraron un aumento del 2.6 % y 4.1% con (Ao) y (Sc) . Gómez y col. (1987) reportaron un aumento en la digestibilidad de nitrógeno del 7.7% con extractos de (Ao).

Estos incrementos observados de digestibilidad ruminal se pueden atribuir a los cambios en el tipo de microorganismos predominantes en el rumen estimulados por factores nutricionales que se encuentran como componentes en este tipo de probióticos .

Efecto en los Parámetros Bioquímicos de la Fermentación Ruminal

Por la mayor degradación de nutrientes debida a la adición de probióticos, los parámetros fermentativos como nitrógeno amoniacal y ácidos grasos volátiles de la fermentación ruminal tenderían a aumentar pero los resultados reportados de estos parametros son muy variados.

Acerca del nitrógeno amoniacal Harrison y col. (1988) reportaron una disminución del 43.8% por la adición de (Sc). Mientras Martin y col. (1990) reportaron un aumento significativo ($P < .05$) con (Ao).

Con respecto a los ácidos grasos volátiles, los resultados también son muy variados . Wiedmeir y col. (1987) no observaron cambios significativos en los ácidos grasos volátiles con la adición de (Ao) y (Sc). Harrison y col. (1988) reportaron resultados similares con (Sc). Mientras Arambel y col. (1987) reportaron un aumento significativo ($P < 0.05$) de los ácidos grasos volátiles con la adición y adaptación de (Ao) .

Efecto del pH en el Rumen

Newbold (1990) propone un modelo para explicar la acción de los cultivos fungales en el rumen. La hipótesis se basa que la producción de ácido láctico estabiliza el pH y de esta manera aumenta la población microbiana con una mejoría en la actividad metabólica del rumen, con los resultados consecuentes.

Algunos autores han notado una disminución en el pH como Harrison y col. (1988) (5.64 vs 5.4) con la adición de (Sc) y Gómez y col. (1987) con (Ao), quienes observaron también una disminución del pH (5.65 vs 5.5). Aunque estas disminuciones son muy pequeñas para tener efectos en la población microbiana. Por otro lado Martin y col. (1990) no observaron variaciones en el pH .

No existe evidencia que la disminución del pH sea la causa del aumento de la población microbiana . En un estudio hecho con Selenomonas ruminantium se observó un aumento en la utilización del lactato con la adición de los probióticos antes mencionados (Nisbet y col. 1989) .

Efecto en la Producción de Metano

Que el efecto probiótico se deba a la disminución de la concentración de metano en el rumen y que por esta causa exista una mayor producción animal, no es un concepto claro, pues en la actualidad existen pocos trabajos que reporten la concentración de metano y los pocos resultados también son muy variados. Mientras Frumholtz y col. (1989) reportaron una disminución de metano, Martin y col. (1990) encontraron un aumento significativo de (P.<.01) .

Otros Posibles Efectos

Otros posibles mecanismos de acción de los hongos y levaduras como los probióticos según Dylen, (1988) son :

a) Estimulación en la utilización de minerales, lo que influiría en la mejor eficiencia de utilización de los alimentos.

b) Facilitar que los cultivos microbiológicos durante sus procesos metabólicos puedan secretar enzimas y vitaminas, las que suplementarán a las producidas también en el rumen por bacterias y protozoarios .

c) Competencia contra agentes patógenos a nivel ruminal

Efecto en la Producción Animal

Anteriormente se discutieron la mayoría de los estudios realizados para explicar el efecto probiótico. Aunque no exista ninguna hipótesis concluyente que soporte y explique científicamente el funcionamiento de estos cultivos fungales en el tracto gastro-intestinal de los ruminantes, los resultados en la producción animal son muy satisfactorios.

En efecto diversos estudios han reportado aumento en el crecimiento del ganado al adicionarles probióticos (Adams y col. 1981; Wiedmeir, 1989; Edwards y col. 1990) .

La mayoría de los estudios se han realizado sobre la producción de leche. Los resultados (Harris y col. 1983; Huber y col. 1985; Wallentine y col. 1986; Marcus y col. 1986 y Kellms y col. 1987 y 1990) demostraron un aumento del 9.6% en esta producción con la adición de (Ao) en sus dietas (Cuadro 4). Además se observó que las vacas de lactación temprana respondieron mejor al probiótico (Huber, 1988).

Resultados similares reportó Dildey (1988) (Cuadro 5) con la suplementación de cultivos viables de levaduras en la dieta de vacas lecheras observando un aumento de 11.8% en la producción de leche .

Aunque los mecanismos de acción de estos aditivos no esta completamente dilucidados los resultados han demostrado que los probióticos fungales aumentan la producción en forma costeable para los productores principalmente en las granjas lecheras. Por lo tanto, la demanda de estos productos biotecnológicos se estan incrementando en forma significativa y empezando a importar a nuestro país .

El objetivo de Este Estudio

El objetivo de esta tesis fué caracterizar parcialmente un probiótico producido por fermentación sólida para tener una idea de que tipo de compuestos químicos que actuan como promotores del crecimiento estan formados el principio o principios activos de estos cultivos fungales.

Cuadro 1

Lista de microorganismos usados en la alimentación animal
presentada por la Asociación Americana de Ingredientes
Alimenticios en 1988

<i>Aspergillus niger</i> (a)	<i>Lactobacillus casei</i>
<i>Aspergillus oryzae</i> (a)	<i>Lactobacillus cellobiosis</i>
<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Lactobacillus curvatus</i>
<i>Bacillus lentus</i>	<i>Lactobacillus delbrueii</i>
<i>Bacillus licheniformis</i> (a)	<i>Lactobacillus fermentum</i>
<i>Bacillus pumilis</i>	<i>Lactobacillus lactis</i>
<i>Bacillus subtilis</i> (a)	<i>Lactobacillus plantarum</i>
<i>Bacteroides amylophilus</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>
<i>Bacteroides capillosis</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>Bacteroides ruminicola</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>Bacteroides suis</i>	<i>Pediococcus cerevisiae</i>
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
<i>Bifidobacterium capillosis</i>	<i>Propionibacterium shermanii</i>
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<i>Streptococcus cremoris</i>
<i>Bifidobacterium infantis</i>	<i>Streptococcus diacetylactis</i>
<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Streptococcus faecium</i>
<i>Bifidobacterium thermophilus</i>	<i>Sterptococcus intermedius</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Streptococcus lactis</i>
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	

a = Listados por la Asociación Americana de Control Oficial de Alimentos (AAFCO) para producción de enzimas por fermentación.

Cuadro 2

Cambios en la Población Microbiana por la Adicción de Probióticos

	Testigo	Sc	Ao	
8				
BVT (10/ml)	196.0	255.0	223.5	
8		*	*	* Wiedmeir y col. (1987)
BC (10/ml)	25.0	39.8	39.1	
9				
BA (10/ml)	*	*		
Heno	13.0	73.0	---	
Grano	104.0	157.0	---	
				Dawson. (1987)
9				
BC (10/ml)				
Heno	0.8	1.6	---	
Grano	13.8	16.0	---	
9				
BVT (10/ml)	7.76	12.12	---	
7				Harrison y col. (1988)
BC (10/ml)	6.6	12.0	---	
9	*		*	
BVT (10/ml)	1.41	---	3.2	Fondevila y col. (1989)
9				
BC (10/ml)	0.17	---	0.16	

Sc = Saccharomyces cerevisiae

Ao = Aspergillus oryzae

BVT= Bacterias viables totales

BC = Bacterias celulolíticas

* = Diferencias significativas entre las medias (P<.05) .

Cuadro 3

Aumento de la Digestibilidad de los Alimentos con la Adición de Probióticos

	Testigo	Sc	Ao	An	Ps	Th
DMS	58.4	---	61.0*	---	---	---
FDA	36.2	---	40.6	---	---	---
Van Horn y Col. (1984)						
DMS	66.1	66.8	67.7	---	---	---
Rumen DMS	26.1	42.9*	37.1*	---	---	---
Gómez y col. (1990)						
DMS	77.0	79.1*	79.8*	---	---	---
Hemicelulosa	76.3	80.5*	80.8*	---	---	---
PC	79.5	82.2	81.6	---	---	---
Wiedmeir y col. (1987)						
DMS (RM)	57.01	---	64.5*	62.5*	59.8	59.7
(<i>in vitro</i>)						
Tapia y col. (1989)						
DMS (HS)	65.45	---	70.9*	68.7	68.8	69.9

DMS = Digestibilidad de la materia seca.

PC = Proteína cruda .

RM = Rastrojo maíz .

HS = Harina de Sangre .

Sc = Saccharomyces cerevisiae.

Ao = Aspergillus oryzae .

An = Aspergillus niger .

Th = Trichoderma harzianum .

Ps = Penicillium sp .

Medias con * difieren ($P < .05$) del testigo .

Cuadro 4

Efecto de la Alimentación con extractos de *Aspergillus oryzae* (Ao) en la producción de leche .

Autores	Testigo (kg/día)	Ao (kg/día)	% de Aumento	No. de Animales
Harris y col. (1983)	24.13	26.67	10.5	34
Huber y col. (1985)	18.46	20.36	10.3	48
Wallentine y col. (1986)	30.11	33.6	11.6	50
Marcus y col. (1986)	28.70	30.16	5.1	205
Kellms y col. (1987)	35.06	38.82	10.7	32

Difieren estadísticamente a ($P < .05$) .

Cuadro 5

Cambios en la Producción de Leche por la Adición de Yea-Sacc (YC) en Raciones de Vacas Lecheras

Localidad	Testigo (kg/día)	YC (kg/día)	% de Aumento
Georgia	23.58	27.3	15.8
México	29.0	31.29	7.9
California	31.6	33.9	7.4
Inglaterra	9.8	12.2	24.6
Japón	13.3	13.8	3.4

REFERENCIAS

1. Adams D.C., Galvean M.L., Kiesling H.E., Wallace J.D. and Finker M.D. (1981). "Influence of viable yeast culture, sodium bicarbonate and monensin on liquid dilution rate, rumen fermentation and feedlot performance of growing steers and digestibility in lambs". J. Animl Sci. **53**:780.
2. Arambel M.J., Wiedmeier R.D. and Walters J.L. (1987) "Influence of donor animal adaptation to added yeast culture and/or *Aspergillus oryzae* fermentation extract on in vitro rumen fermentation". Nutrition Reports International. **35**:433.
3. Avila G.E. (1989). "El uso de antimicrobianos como promotores de crecimiento en aves". 1er. Ciclo de Conferencias sobre Microbiología Pecuaria. Universidad Autónoma de Chapingo.
4. Church D.C. (1984) "Livestock feeds and feeding". 2nd Ed. O&B Books Inc. Coverllis, OR. USA.
5. Dawson K.A. (1987). "Effects of yeast culture supplements on the grown and activities of rumen bacteria in continous culture". J. Animal Sci. 65 (Suppl.1):452 (Abstr.) .

6. Dildey D. (1988) "Getting paid for milk quality: Improving milk composition ALLtech's". Fourth Annual Symposium on Biotechnology in the feed Industry Nicholasville, Kentucky.
7. Edwards I.E., Mutsvangwa J.H., Topps J.H. and Paterson G.F.M. (1990). "Effect of supplemental yeast culture (YEASACC) on patterns of rumen fermentation and growth performance of intensively fed bulls". Animal Production **50**:579 (Abstr).
8. Fondevila M., Newbold C.J., Hotten P.M. and Orskov E. (1990). "A note on the effect of Aspergillus oryzae fermentation extract on the rumen of sheep fed straw" Animal Production (in press).
9. Frumholtz P.P., Newbold C.J., and Wallace R.J. (1989). "Influence of Aspergillus oryzae fermentation extract on the fermentation of a basal ration in the rumen simulation technique (Rusitec)". J. Agric. Sci. Cambridge **113**:169 .
10. Fuller R. (1989). "Probiotics in man and animals". J. of Applied Bacteriology. **66**:365 .

11. Gómez R., Huber J.T. (1987) "Effect of Aspergillus oryzae and yeast on feed utilization by Holstein cows". J. Dairy Sci. 70 (Suppl.1):218 (Abstr.) .

12. Gómez R., Huber J.T., Higginbotham and Wanderley (1990). "Influence of Aspergillus oryzae fermentation extract on rumen and total tract digestibility dietary components". J. Dairy Sci. 73:703 .

13. Harrison G.A., Hemken R.W., Dawson A., Harmon R.J. and Barker K.B. (1988) "Influence of addition of yeast culture supplement to diets of lactating cows on ruminal fermentation and microbial populations". J. Dairy Sci. 71:2967.

15. Huber J.T., (1988) "Fungal additives for lactating cows". Department of Animal Science. University of Arizona. Tucson Arizona.

16. Martin S.A. and Nisbet D.J. (1990) "Effects of Aspergillus oryzae fermentation extract on fermentation of amino acids bermudagrass and Starch by mixed ruminal microorganisms in vitro". J. Animal Sci. 68:2142 .

17. Maynard L.A., Loosli K.J., Hintz H.F. and Warner R.G. (1987). "Nutrición Animal". 6er. ED McGraw-Hill .
18. Nisbet D.J. and Martin S.A. (1989) "Factors Effecting lactate uptake by Selenomonas ruminantion HD4". 20 TH Binnial Conference on Rumen Finction. Chicago Illinois .
19. Tapia I.M., Herrera-Saldaña R., Gutierrez R.M. Roussos S. and Viniegra G.G. (1989) "The Effect of four fungal compounds as probiotics on in vitro dry matter disappearance of different feedstuffs". J. Animal Sci. 67 (suppl 1):521 (Abstr).
20. Van Horn B., Harris J.R., Taylor M.J., Bachman R.C. and Wilcox C.J. (1984) "By-Product Feeds for lactating dairy cows. Effect of cottonseed hulls, sunflower hulls, corrugated paper, peanut hulls, sugarcane baggase and whole cottonseed with additives of fat, sodium bicarbonated and Aspergillus oryzae product on milk production". J. Dairy Sci. 67:2933 .
21. Wiedmeir R.D., Arambel M.J. and Walters J.L. (1987) "Effect of Yeast and/or fungal culture on ruminal Characteristics and Nutrient Digestibility". J. Dairy Sci. 70:2063 .

22. Wiedmeir R. D. (1989). "Optimization of low quality forages through supplementation and chemical treatment". In 9th Annual Utah. Beef Cattle Field Day. Brigham Young University Provo. Utah.

23. Zinn R.A. (1988)" Probiotics in treceiving diets for feedlot cattle". In Proccedings of the southwest Nutrition and Management Conference. Tempe, Arizona.

En este artículo agradezco los consejos de:

Dr. Sebastianos Roussos en la determinación de las celulasas.

M. en C. Gerardo Rivera en la determinación de lipasas.

Dr. Sergio Revah en la determinación de proteasas.

Dr. Ernesto Favela por todo sus consejos en la resolución de mis dudas en la determinación de las actividades enzimáticas.

M. en C. Nancy Tapia en todas las digestibilidades in vitro.

HIPOTESIS

En esta tesis se plantearon dos hipótesis principales :

La primera en la que se basa el primer artículo que consiste en plantear si el aumento de la digestibilidad producido por los probióticos esta correlacionado con la enzimas que contienen los compuestos fúngicos.

La segunda hipótesis, que se plantea en el segundo artículo es que el principio o principios activos de los probióticos son termoestables a altas temperaturas e hidrosolubles.

¿ESTA RELACIONADO EL EFECTO PROBIOTICO DE LOS HONGOS EN RUMIANTES CON LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS DE ESTOS?

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue probar la hipótesis de que el efecto probiótico en la digestión del rumen se debe a las enzimas exógenas de los hongos actuando sobre nutrientes específicos . Cinco diferentes probióticos fueron colectados y evaluados sus perfiles enzimáticos : Penicillium sp (Ps), Trichoderma harzianum (Th), Aspergillus niger crecido en bagazo (Anb), Aspergillus niger crecido en yuca (Any) y Aspergillus oryzae (Ao). Por medio de ensayos de digestión in vitro sobre 12 diferentes forrajes . Estos fueron clasificados en 4 grupos como sustratos; a) Fibrosos: rastrojo de maíz, heno de ballico y heno de alfalfa. b) Amiláceos: granos de maíz y de sorgo y desechos de panificadora. c) Protéicos: harina de sangre, harinolina y harina de soya. d) Grasosos: cartamo, manteca vegetal y cebo. Las actividades celulolíticas, amilolítica, proteolítica y lipolídica fueron ensayadas para los fermentos fúngicos . Los resultados indicaron diferencias significativas ($P < .05$) entre los probióticos y su efecto en algunos sustratos fibrosos, lipídicos y protéicos no así con los amiláceos que no hubo efecto a ($P > .05$) .

Se observó que los forrajes menos degradables tendían a tener los mayores incrementos en la digestibilidad debidos a los probióticos. También el efecto probiótico de los diferentes fermentados sobre los sustratos no estuvo correlacionado con las diferentes enzimas colectadas (P.>.05). Aparentemente, el efecto probiótico de aumentar la digestibilidad de la materia seca esta relacionado con factores nutricionales no identificados que aumentan la actividad microbiana del rumen.

INTRODUCCION

Una manera de aumentar la producción ganadera es incrementando la eficiencia en la digestión de nutrientes en el rumen . Por esta razón hay continuas investigaciones sobre aditivos alimenticios que optimicen la actividad microbiana en las fermentaciones de los diferentes forrajes.

Algunos aditivos fungales (Probióticos) han mostrado que aumentan la digestión de la materia seca en rumiantes (1, 4, 14, 16 y 17). Aunque Harrison y col (1988) (5) reportaron una disminución en la digestibilidad al adicionar extractos de Saccharomyces cerevisiae en raciones de vacas . Estos autores opinan que el resultado negativo se podría explicar por las diferencias en el periodo de adaptación o las diferentes dietas.

Los aditivos fungales estan hechos en su mayoría de mezclas de biomasa, enzimas, vitaminas, minerales y otros factores nutricionales no identificados. (Huber. 1988) (6) . Algunas investigaciones sugieren que la adición de enzimas pueden ser las responsables en el aumento en la digestibilidad de los alimentos (2, 3 y 8) pero Leatherwood y col (1960) (9) indicaron que adición de celulasas de hongos no tenian efecto en la utilización del alimento . Los resultados in vitro hasta este momento sobre esta materia no han sido concluyentes (Arambel y col., 1987) (1) .

Este estudio tratará de encontrar si el aumento de la digestibilidad de la materia seca en pruebas in vitro de diferentes tipos de forrajes tienen una correlación definida con el perfil enzimático de diferentes fermentos fúngicos (Probióticos) . La hipótesis plantea que un probiótico rico en un tipo especial de enzimas (celulasas, amilasas, lipasas y proteasas) deberían tener un aumento diferencial respectivo al tipo de forrajes ricos en celulosa, almidón, proteína y lípidos, según el caso

MATERIALES Y METODOS

Aditivos

Los componentes fúngicos fueron residuos secos de fermentos producidos por cultivo sólido y un producto comercial como testigo, los probióticos usados fueron : 1) Penicillium sp (Ps) crecido en pulpa de café. (Roussos y col. 1989) (13); 2) Trichoderma harzianum (Th) crecido en 80% de bagazo y 20% de salvado de trigo (Roussos, 1985) (12); 3) Aspergillus niger (Anb) crecido en bagazo. (E. Favela, comunicación personal); 4) Aspergillus niger (Any) crecido en harina de yuca con corteza con (Huerta y col. 1987) (7) y Amaferm (Ao), que es un extracto del cultivo líquido de Aspergillus oryzae, donado por Biozyme Enterprises Inc. (St. Joseph. Mo. U.S.A.). Los cultivos sólidos secos fueron molidos y pasados por una malla de 1 mm para se usados como probióticos.

Forrajes

Los sustratos utilizados en las pruebas de digestibilidad de materia seca in vitro fueron los siguientes : a) *Materiales Fibrosos*: rastrojo de maíz, heno de ballico y heno alfalfa. b) *Materiales Amiláceos*: grano de maíz molido, sorgo molido y desechos de panificadora. c) *Materiales Protéicos*: pasta de soya, pasta de algodón (Harinolina) y harina de sangre. d) *Materiales Grasos*: cartamo, manteca vegetal y cebo mezclados con alfalfa en una concentración del 5 % . Los cuáles estaban secos, molidos y pasados por una malla de 1 mm.

Ensayos Enzimáticos

Las actividades enzimáticas ensayadas fueron las siguientes: Amilasas y Celulasas por la incubación de un 1 g del probiótico con 1 ml de una solución de 1% de carboximetilcelulosa o 0.3% de almidón respectivamente. Las actividades fueron estimadas mediante azúcares reductores usando el reactivo del 3-5 dinitrosalicílico (11). El tiempo de reacción de ambas fue de 30 minutos utilizando un amortiguador de citrato-fosfato (0.05 M) con un pH de 6.5, las reacciones enzimáticas fueron detenidas calentando a 95° C por 5 minutos.

Proteasas ensayadas incubando un 1 g del probiótico con 1 ml de caseína al 2% (Sigma Chem., Co.); la medición de la actividad fué realizada mediante el reactivo Folin (10) el cual mide los residuos de tirosina en el sobrenadante. El tiempo de reacción y amortiguador utilizado fueron los mencionados anteriormente. La reacción de las proteasas fue detenida por la adición de 2 ml de una solución fría de ácido tricloroacético (0.04 M).

Lipasas medidas por el cambio potenciométrico de un amortiguador (0.02 M Succinato de sodio) por la liberación de ácidos carboxílicos; la incubación se realizó con 1 g del probiótico con 0.5 ml de tributirina y el amortiguador necesario para obtener un volumen final de 14 ml, con un tiempo de reacción de 15 minutos.

Todas las actividades fueron medidas a 39° C y un pH de 6.5, por triplicado para estimarles los promedios y las desviaciones estandar .

Prueba in vitro

Los ensayos in vitro fueron realizados utilizando líquido ruminal de un vaca Holstein fistulada con un peso aproximado de 550 Kg alimentada con una dieta basal consistente en : ensilado de maíz suplementado con heno de alfalfa y concentrado. Las muestras fueron obtenidas 3.5 horas después de la alimentación de la mañana . Los experimentos in vitro fueron realizados en tubos de 250 ml de acuerdo a la primera fase del método de Tilley y Terry (1963) (15) pero usando muestras de 0.04 g de materia seca adicionándole a un nivel 3% del probiótico . Los probióticos son adicionados a un nivel del 3% porque fue lo recomendado por Tapia y col . (1989) (14). Las incubaciones fueron realizadas a 48 h usando un baño de agua a 39° C .

RESULTADOS Y DISCUSION

Perfiles Enzimáticos de los Probióticos

Los perfiles enzimáticos de los componentes fúngicos están relacionados con el sustrato utilizado para su producción. La actividad celulolítica fue alta en Any crecido en harina de yuca con corteza (712U/g) y Th crecido en bagazo y salvado de trigo (605 U/g), resultados mostrados en (Cuadro 1). La actividad amilolítica solamente fue determinada en Any (2149 U/g) y Ao crecido en cultivo líquido (586 U/g) actividades indicadas en el (Cuadro 2) . La actividad lipolítica estuvo presente en todos los probióticos y los resultados se muestran en el (Cuadro 3). Las proteasas fueron encontradas únicamente en Ps crecido en pulpa de café, (58 U/g) . Es de notarse que los diferentes componentes fúngicos tuvieron diferentes perfiles enzimáticos de acuerdo al microorganismo y sustrato utilizado para su cultivo.

Digestión de Forrajes Fibrosos

La adición de probióticos aumentó la digestibilidad de los forrajes fibrosos (rastrojo de maíz, heno de ballico y heno de alfalfa) y que fué inversamente proporcional a la digestibilidad del control con un coeficiente de correlación entre ambas variables de $R = -0.92$ (ver los datos en el cuadro 1). Estas observaciones sugieren que los probióticos tienen un efecto en la digestión de los forrajes poco degradables como se demostró con rastrojo de maíz y por lo contrario, se tuvo un efecto menos significativo con heno de alfalfa, por su alta digestibilidad.

El análisis de varianza (dos vías: probióticos y forrajes) mostró que el aumento en la digestibilidad de forrajes fué significativa ($p < .01$) pero la diferencia entre los probióticos no fué significativa a ($P > .01$). La correlación entre el nivel de celulasas y los incrementos en la digestibilidad fué pobre ($r < 0.66$) para rastrojo de maíz; $r < 0.42$, para el heno de ballico y $r < 0.22$, para el heno de alfalfa. Por lo que no se sostiene la hipótesis que los probióticos actúan en la fibra por medio de sus celulasas (Cuadro 1). Aunque sí se notó una diferencia significativa entre las celulasas contenidas en los diferentes probióticos.

Digestión de los Forrajes con Almidón

Como en el caso anterior, el efecto del probiótico fué inversamente proporcional a la digestibilidad del testigo, como ejemplo : hay un aumento del 3% en el sorgo con 82% de digestibilidad, contra el 2% de aumento en el grano de maíz y el desecho de panificadora que fué de 94 y 95 % de digestibilidad respectivamente. Unicamente la digestibilidad del sorgo tuvo un aumento significativo por la acción de los probióticos . Pero otra vez no hubo una correlación clara (Cuadro 2) entre las amilasas y los incrementos en la digestibilidad. Aunque se observaron diferencias significativas ($P < .01$) entre las amilasas de los diferentes probióticos .

Digestión de los Forrajes con Lípidos

La adición de los probióticos con lípidos (cartamo, manteca vegetal y cebo) demostró un incremento significativo en los ensayos de digestibilidad in vitro pero mostró claramente la relación del efecto, con el nivel de digestibilidad. Tal vez porque se usó el mismo forraje (heno de alfalfa) para todas las determinaciones. El más alto nivel de significancia fué para la manteca vegetal ($P < .01$) pero no hubo una clara correlación entre las lipasas y el efecto probiótico .

Digestión de los Forrajes con Proteínas

Los probióticos tienen un alto efecto en la digestibilidad in vitro de los sustratos protéicos (P.<01) (pasta de soya, pasta de algodón y harina de sangre). Aunque a 4 de los probióticos no se les encontró actividad proteolítica, todos tuvieron un efecto significativo sobre la digestibilidad.

CONCLUSIONES

Los resultados aquí presentados, no apoyan la hipótesis de que las actividades enzimáticas de los probióticos sean directamente responsables en el aumento de la digestibilidad en el rumen de diferentes forrajes . Debe notarse la falta de correlación entre la digestión de diferentes tipos de forrajes (celulosa, almidón, protéicos y lipídicos) y las diferentes actividades enzimáticas (celulasas, amilasas, proteasas y lipasas) y el tipo de probiótico producido en la fermentación . Aunque , sin embargo, se notó un efecto probiótico significativo en varios componentes fúngicos utilizados en este estudio. Aparentemente , el efecto podría estar en un compuesto no específico que se encontrase en varios tipos de biomasa fúngica. Tal vez un factor nutricional activo que actúa sobre los microorganismos del rumen, para la digestión de sustratos hidrocarbonados (forrajes y granos). Además el efecto probiótico fue inversamente proporcional al nivel de digestibilidad, esto es, la digestión de sustratos de poca digestibilidad mostraron los mayores efectos probióticos . Por lo tanto se favorece la idea de utilizar a los probióticos en forrajes poco degradables.

Cuadro 1.

*

La Actividad Celulolítica (U/g) y la Digestibilidad de la
Materia Seca in vitro en % de los Materiales Fibrosos

	CELULASAS		RASTROJO MAIZ		HENO BALLICO		HENO ALFALFA	
	(U/g)		% DIGESTIBILIDAD DE LA MATERIA SECA					
	X	D.E	X	D.E	X	D.E	X	D.E
To	a 0	0	a 57.01	0.52	a 72.18	0.93	a 74.55	0.27
Ps	b 156	27	ab 59.78	1.30	ab 73.26	2.01	ab 76.49	2.40
Th	d 605	55	ab 59.75	1.16	bc 76.18	0.61	ab 76.63	0.62
Anb	c 422	38	bc 61.39	0.62	bc 76.50	0.10	ab 78.02	1.07
Any	e 712	43	bc 62.45	0.16	c 77.30	0.31	b 80.44	0.51
Ao	b 130	29	c 64.46	0.59	c 79.56	0.27	ab 78.39	2.26

COEFICIENTES DE CORRELACION

r	0.2152	0.4202	0.6613
R	-0.928		

*U= Una unidad esta definida como la cantidad de enzima requerida para liberar un micromol de glucosa por minuto a las condiciones de ensayo.

r= Coeficientes de correlación entre las celulasas y el incremento de la digestibilidad.

R= Coeficiente de correlación entre la digestibilidad de los sustratos testigos (no probióticos) y el incremento de la digestibilidad (probióticos).

Ps = *Penicillium sp*

Th = *Trichoderma harzianum*

Anb= *Aspergillus niger* en bagazo

Any= *Aspergillus niger* en yuca

Ao = *ASpergillus oryzae* (Amaferm)

To, = Testigo sin Probiótico

a,b,c,d y e Medias en la misma columna con diferente sobreíndice difieren (P<.05).

Cuadro 2

*
La Actividad Aminolítica (U/g) y la Digestibilidad de la
Materia Seca *in vitro* en % de los Materiales con Almidón

ADITIVOS	AMILASAS		DESECHOS PANIFICADORA		GRANOS SORGO		GRANOS MAIZ	
	(U/g)		% DIGESTIBILIDAD DE LA MATERIA SECA					
	X	D.E	X	D.E	X	D.E	X	D.E
To	0 ^a	0.0	95.55	0.34	82.20	0.71	94.28	0.52
Ps	0 ^a	0.0	97.25	0.76	82.91	0.71	97.43	1.64
Th	0 ^a	0.0	96.23	1.09	86.58	0.65	94.83	1.36
Anb	0 ^a	0.0	96.73	1.84	84.83	0.68	94.60	1.88
Any	2149 ^c	84.0	97.02	0.23	84.79	0.23	94.86	0.01
Ao	586 ^b	47.0	95.09	1.12	84.56	1.40	96.11	0.04

COEFICIENTES DE CORRELACION

r		0.22		0.15		-0.12
R	-0.894					

*U= Una unidad esta definida como la cantidad de enzima requerida para liberar un micromol de glucosa por minuto a las condiciones de ensayo.

r= Coeficientes de correlación entre las amilasas y el incremento de la digestibilidad.

R= Coeficiente de correlación entre la digestibilidad de los sustratos testigos (no probióticos) y el incremento de la digestibilidad (probióticos).

Ps = *Penicillium sp*

Th = *Trichoderma harzianum*

Anb= *Aspergillus niger* en bagazo

Any= *Aspergillus niger* en yuca

Ao = *Aspergillus oryzae* (Amaferm)

To = Testigo sin Probiótico

a, b, y c Medias en la misma columna con diferente sobreíndice difieren (P<.05).

Cuadro 3

*
La Actividad Lipolítica (U/g) y la Digestibilidad de la
Materia Seca in vitro en % de los Materiales Grasosos

ADITIVOS	LIPASAS		ACEITE CARTAMO		CEBO		MANTECA VEGETAL	
	(U/g)		% DIGESTIBILIDAD DE LA MATERIA SECA					
	X	D.E	X	D.E	X	D.E	X	D.E
To	0 ^a	0.0	72.48	0.76	74.52	0.28	74.02	0.62
Ps	14 ^b	3.0	75.17	1.32	76.07	2.79	76.83	0.02
Th	42 ^c	3.7	73.99	1.27	76.29	0.62	72.79	2.97
Anb	57 ^c	9.0	74.66	1.34	73.84	0.18	76.05	2.40
Any	43 ^c	7.5	75.39	0.69	77.39	0.04	78.18	0.03
Ao	41 ^c	5.6	75.62	0.33	79.86	2.02	79.39	0.01

COEFICIENTES DE CORRELACION

r	0.54	0.30	0.19
R	0.806		

*U= Una unidad esta definida como la cantidad de enzima requerida para realizar un cambio de pH equivalente a un micromol de ácido butírico por minuto a las condiciones de enzayo.

r= Coeficientes de correlación entre las lipasas y el incremento de la digestibilidad.

R= Coeficiente de correlación entre la digestibilidad de los sustratos testigos (no probióticos) y el incremento de la digestibilidad (probióticos).

Ps = Penicillium sp

Th = Trichoderma harzianum

Anb= Aspergillus niger en bagazo

Any= Aspergillus niger en yuca

Ao = Aspergillus oryzae (Amaferm)

To = Testigo sin Probiótico

a, b, y c Medias en la misma columna con diferente sobreíndice difieren (P<.05) .

Cuadro 4

*
La Actividad Proteolítica (U/g) y la Digestibilidad de la
Materia Seca in vitro en % de los Materiales Protéicos

ADITIVOS	PROTEASAS		HARINA SANGRE		HARINOLINA		HARINA SOYA	
	(U/g)		% DIGESTIBILIDAD DE LA MATERIA SECA					
	X	D.E	X	D.E	X	D.E	X	D.E
To	0	0	65.45	0.37	72.30	0.74	97.11	0.79
	a		a				a	
Ps	58	12	68.80	0.64	72.65	1.13	98.65	0.66
	b		ab				ab	
Th	0	0	69.91	2.69	74.83	0.68	99.19	0.85
	a		ab				ab	
Anb	0	0	67.47	0.65	74.35	1.56	99.28	0.68
	a		ab				ab	
Any	0	0	68.72	0.64	74.85	0.52	99.37	0.27
	a		b				b	
Ao	0	0	70.91	0.08	75.95	0.99	99.6	0.16

COEFICIENTES DE CORRELACION

r		-0.11		-0.52		0.065
R	-0.927					

*U= Una unidad esta definida como la cantidad de enzima requerida para realizar un cambio de color equivalente a un micromol de tirosina por minuto a las condiciones de ensayo.

r= Coeficientes de correlación entre las proteasas y el incremento de la digestibilidad.

R= Coeficiente de correlación entre la digestibilidad de los sustratos testigos (no probióticos) y el incremento de la digestibilidad (probióticos) .

Ps = Penicillium sp

Th = Trichoderma harzianum

Anb= Aspergillus niger en bagazo

Any= Aspergillus niger en yuca

Ao = Aspergillus oryzae (Amaferm)

To = Testigo sin Probiótico

a y b Medias en la misma columna con diferente sobreíndice difieren (P<.05) .

REFERENCIAS

1. Arambel M.J., Wiedmeier R.D. and Walters J.L. (1987) "Influence of donor animal adaptation to added yeast culture and/or Aspergillus oryzae fermentation extract on in vitro rumen fermentation". Nutrition Reports International. 35:433.
2. Autey K.M., Mcaskey, T.A. and Little J.A. (1975) "Cellulose Digestibility of Fibrous Materials treatment with Trichoderma viride cellulase". J. Dairy Sci. 58:67.
3. Daniels L.B. and Hashim R.B. (1977) "Evaluation of fungal cellulase in rice Hull base diets for ruminats". J. Dairy Sci. 60:1563.
4. Gómez R., Huber J.T. (1987) "Effect of Aspergillus oryzae and yeast on feed utilization by Holstein cows". J. Dairy Sci. 70 (Suppl.1):218 (Abstr.) .
5. Harrison G.A., Hemken R.W., Dawson A., Harmon R.J. and Barker K.B. (1988) "Influence of addition of yeast culture supplement to diets of lactating cows on ruminal fermentation and microbial populations". J. Dairy Sci. 71:2967.

6. Huber J.T., (1988) "Fungal additives for lactating cows". Department of Animal Science. University of Arizona. Tucson Arizona.
7. Huerta S., Gutierrez M. Lopez R. Massuco E. and Viniestra G. (1987) "Caracterización técnica de un fermentador dinámico para sustratos sólidos en planta piloto". Academia Nacional de Ingeniería. 5:No. 2 .
8. Kercher C.J. William E. and Corbridge M. (1966) "Digestibility of enzyme-supplement rations by sheep" J. Dairy Sci. 25:105 .
9. Leatherwood J.M., Morchirie R.D. and Thomas W.E. (1960) "Some Supplementary Cellulase Preparation on feed utilization by ruminants . J. Dairy Sci. 43:1460 .
10. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randal R.J. (1951). "Protein measurement with the folin phenol reagent". J. Biol. Chem. 193:265 .
11. Miller G.L. (1959) "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analyt Chem. 31:426 .

12. Roussos S. (1985) "Croissance de Trichoderma harzianum par fermentation en milieu solide: Physiologie, sporulation et production de cellulase". These d'Etat Universite Provence, Editado por ORSTOM, Paris Francia.

13. Roussos S., Aquiahuatla A., Cassaigne J., Gutierrez M., Hannibal L., Huerta S., Nava G., Raimbault M., Rodriguez W., Salas J., Sanchez R., Trejo M., y Viniegra G. (1989) "Destoxificación de la pulpa de café por fermentación sólida". I Seminario Internacional sobre Biotecnología en la Agroindustria Cafetalera . Xalapa Ver., México.

14. Tapia I.M., Herrera-Saldaña R., Gutierrez R.M. Roussos S. and Viniegra G.G. (1989) "The Effect of four fungal compounds as probiotics on in vitro dry matter disappearance of different feedstuffs". J. Animal Sci. **67** (suppl 1):521 (Abstr).

15. Tilley M.M.A. and Terry R.A.A. (1963) Two Staged Technique for the in vitro digestion of forage crops". J. Brit Grad. Soc. **18**:104 .

16. Van Horn B., Harris J.R., Taylor M.J., Bachman R.C. and Wilcox C.J. (1984) "By-Product Feeds for lactating dairy cows. Effect of cottonseed hulls, sunflower hulls, corrugated paper, peanut hulls, sugarcane baggase and whole cottonseed with additives of fat, sodium bicarbonated and Aspergillus oryzae product on milk production". J. Dairy Sci. 67:2933 .

17 Wiedmeir R.D., Arambel M.J. and Walters J.L. (1987) Effect of Yeast and/or fungal culture on ruminal Characteristics and Nutrient Digestibility". J. Dairy Sci. 70:2063 .

En este artículo agradezco en forma muy particular a :

Sr. Andres Lee por su ayuda en el trabajo de Laboratorio.

Biologa Guadalupe Hernández por la ayuda en la cromatografía de gases.

Mónica Martínez Paredón por toda su ayuda en la determinación de la termoestabilidad y solubilidad de los principios activos.

Y a todas las personas de una manera o de otra estuvieron ayudandome en la realización de mi tesis.

EXTRACCION PRELIMINAR Y FRACCIONAMIENTO DE Aspergillus niger CULTIVADO POR FERMENTACION SOLIDA EN RESIDUOS DE PULPA DE CAFE

RESUMEN

Se utilizó una prueba in situ para determinar el efecto de Aspergillus niger (An) y Aspergillus oryzae (Ao, Amaferm, extracto de fermentación) sobre la digestibilidad de MS, PC, y FDN en rastrojo de maíz, así como los parámetros fermentativos (pH, NH₃H y AGV). En un cuadro latino 3X3 (7 días de adaptación, 2 de colección y 7 de limpieza) fueron usadas tres vacas Holstein fistuladas y no lactantes. La alimentación de los animales consistió en un dieta basal de concentrado y forraje (60:40) y se evaluaron los siguientes tratamientos: a) 200g/d de An; b) 3g/d de Ao y c) no adición de probiótico (testigo) . La digestibilidad de la materia seca y proteína cruda aumentaron significativamente (P<.05) con la adición de An o Ao . Aunque FDN y los parámetros fermentativos no fueron afectados (P>.05) .

En el segundo estudio, An se realizaron diferentes tipos de extracciones para determinar el componente activo que produce el efecto probiótico. Agua y éter fueron las soluciones utilizadas para la extracción a diferentes pH.

Los resultados mostraron que los filtrados de agua obtenidos a pH de 7 y de 9 tuvieron un efecto probiótico aumentando la digestibilidad de la MS in vitro del rastrojo de maíz (P<.05).

Estos resultados sugieren la existencia de un componente activo hidrosoluble que podría ser de naturaleza protéica por su sensibilidad al calor . El residuo sólido extraído con agua o con éter no tuvo efecto probiótico apreciable (P>.05)

INTRODUCCION

Durante algunos años los extractos fúngicos especialmente Aspergillus oryzae y Saccharomyces cerevisiae han sido vendidos como aditivos alimenticios o probióticos para rumiantes (Huber, 1988) (7) . Este tipo de aditivos fúngicos han sido producidos por cultivo sumergido y se ha demostrado que aumentan la digestibilidad de la materia seca, de proteína cruda y de las paredes celulares de diferentes forrajes. Tapia y col. (1989) (9) también informaron que residuos de sustratos cultivados en medios sólidos de Aspergillus sp, Penicillium sp y Trichoderma sp mostraron efecto probiótico en la digestibilidad in vitro de rastrojo de maíz y harina de sangre.

Este efecto tuvo poca correlación con el tipo de enzimas presentes en los componentes fúngicos como amilasas, celulasas, lipasas y proteasas (Campos y col. en preparación, 1991).

En el presente estudio tratará de extraer el componente o componentes activos y determinar en forma preliminar la naturaleza de este principio o principios activos relacionados con el efecto probiótico en el rumen, en esta vía podría ser posible elaborar un extracto que podría ser utilizado como aditivo comercial en dietas.

MATERIALES Y METODOS

El primer experimento. Se utilizaron tres vacas Holstein no preñadas y no lactantes con un peso promedio de 500 kg, se fistularon cada una con una cánula en el rumen y se les asignó al azar uno de los tres tratamientos en un cuadro latino 3X3 (7 días de adaptación, 2 de colección y 7 de limpieza por periodo). Los tratamientos fueron : 1) testigo negativo (C) sin probiótico; 2) Aspergillus niger (An, 200g/día/vaca) cultivado por fermentación sólida sobre residuos de pulpa de café (E. Favela comunicación personal); 3) Aspergillus oryzae (Ao, 3g/día/vaca) extracto de fermentación proveniente de Biozyme Enterprises ST Joseph. MO. (EUA) llamado Amaferm . Las vacas fueron alimentadas con una dieta basal forraje:concentrado (40:60) diariamente suministrando al 2% de su peso corporal (Cuadro 1). Los animales tenían acceso libre al agua limpia y al suplemento mineral .

Las vacas tuvieron siete días de adaptación y en el octavo día se les introdujeron las bolsas de dacron (20X10 cm, con un poro promedio de 40 micrones) conteniendo 5 g de rastrojo de maíz secos que fueron incubados por 48 horas en cada vaca. El líquido ruminal fué extraído de tres animales testigos en el octavo y noveno día, tres horas después del alimento matutino. Las muestras fueron colectadas y el pH fué determinado inmediatamente usando un potenciómetro portátil (Corning. model G104; Medfielde, MA.) para posteriormente analizar los niveles de nitrógeno amoniacal (NH_3H) y de ácidos grasos volátiles (AGV). Después del periodo de incubación las bolsas fueron removidas del rumen y secadas con aire forzado por 72 hrs. a una temperatura de 60°C a los residuos secos no digeridos recuperados de las bolsas se les cuantificó: la materia seca (MS), proteína cruda (PC) y fibra detergente neutro (FDN) ; según la técnica Goering y Van Soest, (1970). Los AGV fueron evaluados en una mezcla de 5 partes del líquido ruminal con una parte de ácido metafosfórico al 25%. La mezcla fué clarificada por centrifugación (2500 rpm, 20 minutos) y analizada por cromatografía de gases según la técnica de Gómez-Hermández, (1983) . El nitrógeno amoniacal fué determinado por un método colorimétrico (Jacobs, 1985). Se realizó un análisis de varianza del diseño latino y las medias comparadas por la prueba de Tukey .

El segundo experimento. consistió en evaluar la termoestabilidad de An por dos tratamientos calentando a 60° C por 72 horas y calentando 120° C por 5 minutos usando una autoclave. El efecto probiótico fué determinado por ensayos in vitro usando la primera fase del método de Tilley y Terry (1963). En todos los casos se empleo rastrojo de maíz (malla 1 mm) como sustrato y se adicionó el nivel 3% (w/w) del fermento fúngico .

Al probiótico conteniendo An se le hicieron los siguientes tratamientos:

Extracciones con agua: tres muestras de 200 g del fermento fúngico de An fueron mezclados cada uno con 300 ml del agua destilada amortiguada a tres pH diferentes (5,7 y 9).

Las muestras fueron lavadas por dos veces con el mismo volúmen y con el mismo amortiguador a presión con un cilindro metálico a dos diferentes presiones, dos veces a 1000 psi y una vez a 1500 psi y concentrando a 60° C en un rota-vapor .

Extracción con éter fué usando el mismo procedimiento pero bajo temperatura de 4° C.

Los filtrados y a las tortas se les observó el efecto probiótico con ensayos in vitro con rastrojo de maíz descrito arriba.

El diseño experimental del ensayo in vitro fué completamente al azar por triplicado. Las medias fueron comparadas mediante la prueba de Tukey .

RESULTADOS Y DISCUSION

Demostración del Efecto Probiótico in situ

El efecto in situ de la adición de Ao y An en la dieta basal en los parámetros de la fermentación esta mostrada en el (Cuadro 2) . No se observa diferencia alguna ($P > .05$) entre los tratamientos en términos de la concentración del pH, AGV y NH_3H en el rumen de las vacas fistuladas. Estos resultados sugieren que la adición de los probióticos no producen efectos notables en la bioquímica de la fermentación ruminal y son similares a los reportados por Wiedmeir y col. (1987) y Harrison y col. (1988). Con respecto a la digestibilidad de nutrientes los resultados se muestran en el (Cuadro 3). En las digestibilidades in situ de MS y PC se observó un incremento del 4.6% por la adición de ambos tipos de probióticos ($P < .05$) comparados con el control. Estos resultados fueron semejantes a Van Horn y col. (1984) y Wiedmeir y col. (1987) Probablemente los probióticos fungales tengan efecto estimulador sobre las bacterias del rumen aumentando así la digestibilidad . No se observó cambio significativo ($P > .05$) en la digestibilidad FDN de ningún probiótico aunque hubo un incremento del 4.8%, ésto se debió a la alta variabilidad. La magnitud de los incrementos fué similar a los reportados por Tapia y col. (1989) en digestibilidades in vitro .

Efecto del Calor en los Probióticos

El efecto del calor a 60° C y 120° C Sobre An es mostrada en el (Cuadro 4). Calentando a 120° C se observó un efecto inhibitorio del probiótico cuando se determino por la técnica in vitro. En cambio el Ao sin calentar fué usado como control positivo y el An calentado a 60° C produjeron un aumento significativo ($P < .05$) en la digestibilidad de la materia seca comparado con el testigo negativo (sin la adición de probiótico). Aparentemente la desnaturalización por calor del probiótico tuvo un efecto significativo ($P < .05$) a 120° C . Por lo tanto se sugiere la existencia de un factor activo termolabil asociado al efecto probiótico > tal vez algunas proteínas relacionadas a los factores probióticos son dañados por la exposición corta a altas temperaturas (120° C) .

Efecto de la Extracción Acuosa y Orgánica sobre el Probiótico de An

El efecto con la extracción con agua y éter sobre la actividad probiótica de residuos de An > Todas las tortas (T) obtenidas con agua, éter, los filtrados de eter y los filtrados de pH 5 mostrados en el (Cuadro 5) no tuvieron efecto probiótico ($P < .05$) cuando se mezclaron con rastrojo de maíz en los ensayos in vitro de la digestibilidad de la materia seca.

En cambio los filtrados con pH 7 y 9 incrementaron la digestibilidad significativamente a ($P < .05$) sobre el testigo (Sin probiótico) . Los resultados apoyan la presencia de componentes activos solubles en agua extraídos a pH neutro y ligeramente alcalino que serían los responsables del efecto probiótico .

CONCLUSIONES

De acuerdo con los datos evaluados, se podría concluir que la adición de An y Ao tienen un efecto al aumentar la digestibilidad de la MS y PC en la prueba in situ de forrajes de poca calidad . Este efecto es aparentemente producido por componentes activos extraídos a pH neutro o ligeramente alcalino . Estos componentes podrían ser de naturaleza protéica dada su sensibilidad al calor. Se requieren más estudios para completar la identificación del componente activo y evaluarlo in vitro y en ensayos de producción .

Cuadro 1

La composición de la Dieta Basal de las Vacas Fistuladas en el Primer Experimento

Nutrientes	Basal	Basal+An	Basal+Ao
	----- % -----		
Sorgo	35.0	35.0	35.0
Harinolina	12.0	12.0	12.0
Heno de alfalfa	20.0	20.0	20.0
Rastrojo de maíz	20.0	20.0	20.0
Melaza	10.0	10.0	10.0
Urea	1.0	1.0	1.0
Bicarbonato de sódio	0.5	0.5	0.5
	----- g/día/vaca -----		
An	0.0	200.0	0.0
Ao	0.0	3.0	0.0

An = *Aspergillus niger* crecido en pulpa de café.

Ao = *Aspergillus oryzae* extracto de fermentación, donado por Biozyme Enterprises, Inc. St. Joseph. MO.

Raciones contienen 1.1% de fosfato dicalcico, 0.5% trazas de sales y (4 a 5 millones de unidades/t) de vitamina A.

Cuadro 2

Efecto de los Tratamientos en las Características de la Fermentación Ruminal

Item	Tratamiento					
	Testigo		An		Ao	
	X	D.E.	X	D.E.	X	D.E.
pH	6.8	0.3	6.9	0.8	7.0	0.8
NH ₃ -N (mg/dl)	8.8	5.1	12.3	2.2	11.1	1.6
AGV (nmol/l)	120.0	35.0	134.5	56.0	118.0	41.5
Acetato (molar %)	61.0	13.0	67.0	7.0	64.0	14.0
Propianato	20.0	0.2	18.0	4.3	19.0	2.6
Butirato	19.0	2.1	15.0	2.5	17.0	1.7
Acetato/Propianato	3.2	0.7	3.8	1.3	4.4	0.6

Testigo = Sin probiótico .

An = Aspergillus niger crecido en pulpa de café.

Ao = Aspergillus oryzae (Amaferm) Biozyme, Inc., St.

Joseph, MO.

Cuadro 3

Efecto de los Tratamientos en la Digestibilidad
de los Nutrientes

Item	Tratamientos					
	Testigo		An		Ao	
	X	D.E.	X	D.E.	X	D.E.
Materia seca	65.0 ^a	0.8	68.0 ^b	1.7	68.0 ^b	1.6
Protéina Cruda	50.5 ^a	0.3	59.3 ^b	2.0	59.0 ^b	0.9
FDN	61.2	2.7	64.4	1.8	64.2	1.6

Testigo= Sin probiótico.

An = Aspergillus niger crecido en pulpa de café.

Ao = Aspergillus oryzae (Amaferm). Biozyme, Inc, St. Joseph, MO.

^a y ^b Medias en la mismo renglon con diferente sobreíndice difieren ($P < .05$).

Cuadro 4

Digestibilidad de la Materia Seca in vitro en Rastrojo de Maíz para Determinar la Termoestabilidad del Factor o Factores Probióticos de Aspergillus niger.

I T E M		
Tratamientos	Digestibilidad de la Materia seca	
	X	D.E.
Testigo	34.6 ^a	0.7
An60	36.7 ^b	0.7
An120	33.4 ^a	1.5
Ao	37.8 ^b	0.7

Testigo= Sin probiótico

An60 = Aspergillus niger crecido en pulpa de café calentado a 60° C.

An120 = Aspergillus niger crecido en pulpa de café calentado a 120° C.

Ao = Aspergillus oryzae (Amaferm), Biozyme, INC. St, Joshep, MO.

a y b Medias en la misma columna con diferente sobreíndice difieren (P<.05) .

Cuadro 5

Digestibilidad de la Materia Seca *in vitro* en Rastrojo de Maíz Adicionado con Diferentes Tratamientos las Tortas y los Filtrados Obtenidos de Aspergillus niger

I T E M		
Digestibilidad de la Materia Seca		
	X	D.E.
Testigo	35.0 ^b	2.2
T5	35.3 ^b	1.5
T7	33.9 ^b	1.6
T9	33.6 ^b	0.7
TE	36.3 ^a	2.6
FE	23.3 ^{bc}	2.1
F5	36.9 ^d	0.7
F7	42.4 ^{cd}	2.2
F9	41.6	1.6

Testigo= Sin probiótico.

T5 = Torta de pH=5

T7 = Torta de pH=7

T9 = Torta de pH=9

TE = Torta de eter

FE = Torta de eter

F5 = Extracto de pH=5

F7 = Extracto de pH=7

F9 = Extracto de pH=9

^a, ^b, ^c y ^d Medias en la misma columna con diferente sobreíndice difieren (P<.05) .

REFERENCIAS

1. A.O.A.C. (1980) "Official of Analytical of the Association of Official Analytical Chemists". Washington, D.C.
2. Arambel M.J., Wiedmeier R.D. and Walters J.L. (1987) "Influence of donor animal adaptation to added yeast culture and/or Aspergillus oryzae fermentation extract on in vitro rumen fermentation". Nutrition Reports International. **35**:433.
3. Goering H.K. and Van Soest D.J. "Forage fiber analysis (apparatus, reagents, produres and some application)" USDA, Handbook No. 379. Us Gov. Printing Office, Washington D.C.
4. Gómez R., Huber J.T. (1987) "Effect of Aspergillus oryzae and yeast on feed utilization by Holstein cows". J. Dairy Sci. 70 (Suppl.1):218 (Abstr.) .

5. Gómez Hernández J. and Coronado Vega B. (1983). "Lactic acid production using animal wastes as Inoculum". Biotechnol Letters. 5:629 .
6. Harrison G.A., Hemken R.W., Dawson A., Harmon R.J. and Barker K.B. (1988) "Influence of addition of yeast culture supplement to diets of lactating cows on ruminal fermentation and microbial populations". J. Dairy Sci. 71:2967.
7. Huber J.T., (1988) "Fungal additives for lactating cows". Department of Animal Science. University of Arizona. Tucson Arizona.
8. Jacobs M.B., 1965 "The chemical analysis of food and food products". 3th ed. Van Nostrand Company. Toronto .
9. Tapia I.M., Herrera-Saldaña R., Gutierrez R.M. Roussos S. and Viniegra G.G. (1989) "The Effect of four fungal compounds as probiotics on in vitro dry matter disappearance of different feedstuffs". J. Animal Sci. 67 (suppl 1):521 (Abstr).

10. Tilley M.M.A. and Terry R.A.A. (1963) Two Staged Technique for the in vitro digestion of forage crops". J. Brit Grad. Soc. 18:104 .

11. Van Horn B., Harris J.R., Taylor M.J., Bachman R.C. and Wilcox C.J. (1984) "By-Product Feeds for lactating dairy cows. Effect of cottonseed hulls, sunflower hulls, corrugated paper, peanut hulls, sugarcane baggase and whole cottonseed with additives of fat, sodium bicarbonated and Aspergillus oryzae product on milk production". J. Dairy Sci. 67:2933 .

12. Wiedmeir R.D., Arambel M.J. and Walters J.L. (1987) Effect of Yeast and/or fungal culture on ruminal Characteristics and Nutrient Digestibility". J. Dairy Sci. 70:2063 .

DISCUSION

Los avances en este trabajo fue la de empezar la caracterización de la composición química del principio o principios activos de los probióticos. Notando que las enzimas no tienen una relación directa con el efecto probiótico de incrementar la digestibilidad de los nutrientes . Que la naturaleza química de este factor o factores es dañada a altas temperaturas y que es hidrosoluble en agua .

Nuestros resultados demuestran que las enzimas ensayadas no tienen relación directa con el aumento de la digestibilidad, como en el caso de las celulasas en los sustratos fibrosos . Donde el probiótico que contenía menos unidades de celulasas (A0) fué el que dio mayor incremento de la digestibilidad en rastrojo de maíz y heno de ballico . Estos resultados no concuerdan con la publicidad de algunos productos comerciales donde muestran que un principio activo de sus productos utilizados como probióticos son ciertas actividades enzimáticas.

Los resultados demuestran que el secado de estos principios activos pueden ser a 60° C sin perder su efecto lo que nos marca un parámetro en el proceso de fabricación .

Por ser hidrosoluble la manera de extraerlo será menos peligrosa que con solventes orgánicos y por los resultados obtenidos, la mayoría del principio o principios activos son extraídos ya que en ningún residuo sólido se encontró efecto.

Este trabajo no aportó nada nuevo sobre la acción de los probióticos en el funcionamiento del rumen sino corroboró el efecto de incrementar la digestibilidad de los nutrientes utilizando un producto producido por fermentación sólida Aspergillus niger crecido en pulpa de café mediante una prueba de digestibilidad in situ . Ya que los productos cultivados por fermentación sólida utilizados como probióticos solamente habían sido probados en digestibilidades in vitro . En este tipo de estudios falta hacer pruebas de producción y comportamiento in vivo .

Los siguientes estudios serán los de determinar a que grupo o grupos químicos pertenece este factor o factores probióticos para posteriormente poder marcarlos y determinar su acción en el tracto gastro-intestinal del rumiante .

CONCLUSIONES

Las observaciones antes descritas permiten concluir:

Que las actividades enzimáticas (celulasas, amilasas, lipasas y proteasas) que contienen los compuestos fungales no se encuentran correlacionados con los incrementos de la digestibilidad de la materia seca de los diferentes tipos de sustratos (fibrosos, amiláceos, grasos y protéicos) causados por estos probióticos fungales.

Que el efecto de aumentar la digestibilidad es más notable con los forrajes menos degradables.

La digestibilidad del rastrojo de maíz evaluada in situ se aumenta por la adición de una pequeña cantidad a la dieta de un producto cultivado en sustrato sólido (Aspergillus niger crecido en pulpa de café) el cual fué significativo ($P < .05$) en la materia seca y proteína cruda .

Que el principio activo o principios activos son termoestables a 60° C pero a 120° C se pierde el efecto probiótico significativamente ($P < .05$) .

El componente probiótico de Aspergillus niger en pulpa de café es hidrosoluble significativamente ($P < .05$) a pH 7.

Que los principios probióticos no se extraen en éter ni en medio acuoso a pH ácido .

En resumen se concluye que:

El principio o principios probióticos es (son) hidrosoluble(s) y termoestable(s) a 60° C y probablemente sea(n) de naturaleza protéica.